

Смирнова Д.И., Петруша О.А., Грачёва А.В., Волынская Е.А., Зверев В.В.,
Файзулов Е.Б.

БЫСТРАЯ ДИАГНОСТИКА ГЕНИТАЛЬНОГО ГЕРПЕСА МЕТОДОМ ПЕТЛЕВОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ ДНК С ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДЕТЕКЦИЕЙ

ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, 115088, г. Москва, Россия

Введение. В связи с высокой клинической значимостью герпесвирусных заболеваний актуален поиск быстрых и эффективных методов их диагностики.

Целью работы была оценка диагностической эффективности метода петлевой изотермической амплификации ДНК с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (LAMP-PB) с красителем SYTO-82 на модели инфекции вирусов простого герпеса (ВПГ).

Материалы и методы. Исследовано 44 урогенитальных соскоба, содержащих ДНК ВПГ 1-го и 2-го типа; 43 соскоба, не содержащих ДНК ВПГ, 33 из которых содержали ДНК цитомегаловируса, вируса Эпштейна–Барр и вируса герпеса 6-го типа. Для постановки LAMP-PB использовали ДНК-полимеразу Bst 2.0 WarmStart, краситель SYTO-82, праймеры для LAMP.

Результаты. Показана высокая эффективность использования красителя SYTO-82 для детекции ДНК ВПГ 1-го и 2-го типа в реакции LAMP-PB. В оптимальных условиях реакция LAMP-PB позволяла в 2–3 раза сократить время реакции по сравнению с полимеразной цепной реакцией в реальном времени (ПЦР-PB) – до 35 мин. Аналитическая чувствительность выявления ВПГ 1-го и 2-го типа в LAMP-PB составила 10^3 копий ДНК/мл. Диагностическая чувствительность и специфичность LAMP-диагностики ВПГ-инфекции составили 96 и 100% соответственно.

Обсуждение. Метод LAMP-PB обладает высокой, сопоставимой с ПЦР-PB чувствительностью и специфичностью, при этом риск получения ложноположительных результатов минимален.

Заключение. Реакция LAMP-PB с красителем SYTO-82 позволяет быстро, с высокой чувствительностью и специфичностью выявлять ДНК ВПГ в клиническом материале и может рассматриваться как перспективный метод диагностики герпесвирусных инфекций на месте лечения.

Ключевые слова: петлевая изотермическая амплификация ДНК; LAMP; SYTO-82; вирус простого герпеса; диагностика на месте оказания медицинской помощи.

Для цитирования: Смирнова Д.И., Петруша О.А., Грачева А.В., Волынская Е.А., Зверев В.В., Файзулов Е.Б. Быстрая диагностика генитального герпеса методом петлевой изотермической амплификации ДНК с флуоресцентной детекцией *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии (ЖМЭИ)*. 2019; (6):40-46.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-40-46>

Smirnova D.I., Petrusha O.A., Gracheva A.V., Volynskaya E.A., Zverev V.V.,
Faizulov E.B.

RAPID DIAGNOSTICS OF GENITAL HERPES BY LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION METHOD WITH FLUORESCENT DETECTION

I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 115088, Russia

Introduction. Due to the high clinical significance of herpesvirus diseases, the searching of fast and effective methods for their diagnosis remains relevant. The **aim** of the study was to evaluate the diagnostic efficiency of the loop-mediated isothermal amplification of DNA with real-time fluorescent detection (RT-LAMP) with SYTO-82 dye on a model of herpes simplex virus (HSV) infection.

Для корреспонденции: Файзулов Евгений Бахтиерович, канд. биол. наук, заместитель директора по научной работе ФГБНУ НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, 115088, г. Москва.
E-mail: faizulov@mail.ru

Materials and methods. A total of 44 urogenital swabs containing type 1 and type 2 HSV DNA and 43 swabs without HSV DNA, including 33 samples containing the DNA of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus and herpesvirus type 6, were studied. For RT-LAMP, Bst 2.0 WarmStart DNA polymerase, SYTO-82 dye, LAMP primers were used.

Results. The high efficiency of HSV DNA detection in the RT-LAMP reaction with SYTO-82 dye was shown. RT-LAMP in optimal conditions allowed to reduce reaction time for 2-3 times compared to real-time PCR (to 35 minutes). Analytical sensitivity of HSV type 1 and 2 detection in RT-LAMP was 10^3 copies of DNA/ml. The diagnostic sensitivity and specificity of the RT-LAMP diagnosis of HSV infection were 96% and 100%, respectively.

Discussion. RT-LAMP method has a high sensitivity and specificity comparable to RT-PCR, while the risk of false positive results obtaining is minimal.

Conclusion. Thus, the reaction of RT-LAMP with SYTO-82 dye allows quickly, with high sensitivity and specificity to detect HSV DNA in clinical material and can be considered as a promising point-of-care testing method.

Keywords: *loop-mediated isothermal amplification of DNA; LAMP; SYTO-82; herpes simplex virus; point-of-care testing.*

For citation: Smirnova D.I., Petrusha O.A., Gracheva A.V., Volynskaya E.A., Zverev V.V., Faizuloev E.B. Rapid diagnostics of genital herpes by loop-mediated isothermal amplification method with fluorescent detection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii (Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology, Russian journal)*. 2019; (6):40-46. (In Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-6-40-46>

For correspondence: Evgeny B. Faizuloev, PhD, Head of Molecular Virology Laboratory, I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 115088, Russia.
E-mail: faizuloev@mail.ru

Information about authors:

Smirnova D.I., <https://orcid.org/0000-0001-7325-0834>

Petrusha O.A., <https://orcid.org/0000-0002-5022-7962>

Gracheva A.V., <https://orcid.org/0000-0001-8428-4482>

Volynskaya E.A., <https://orcid.org/0000-0001-7739-9337>

Zverev V.V., <https://orcid.org/0000-0001-5808-2246>

Faizuloev E.B., <https://orcid.org/0000-0001-7385-5083>

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

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

Received 27 August 2019

Accepted 24 September 2019

Введение

Герпесвирусные инфекции представляют собой группу широко распространённых антропонозных инфекционных болезней, вызываемых вирусами семейства *Herpesviridae*. Вирусы этого семейства способны персистировать в тканях хозяина в латентной форме на протяжении всей жизни. В России ежегодно около 20 млн человек переносят инфекции, вызванные вирусами простого герпеса 1-го (ВПГ-1) и 2-го типа (ВПГ-2), что превышает соответствующий показатель для гепатитов В, С, D и ВИЧ-инфекции. В европейских странах инфицированность ВПГ-1 достигает 50–80%, ВПГ-2 – 10–25% [1–3]. Герпесвирусы могут быть причиной тяжёлой клинической патологии, в ряде случаев приводящей к летальному исходу, особенно у лиц с выраженными нарушениями иммунитета. Наибольшую угрозу для здоровья представляют герпетические нейроинфекции, включая менингит и энцефалит (летальность достигает 20%, частота инвалидизации – 50%), офтальмогерпес (развитие катаракты или глаукомы почти в 50% случаев), генитальный герпес (существенное снижение качества жизни), неонатальный герпес (уносит жизни до 80% инфицированных новорождённых) [2, 3]. ВПГ занимает важное место в группе возбудителей TORCH-инфекций, представляя серьёзную угрозу для репродуктивного здоровья населения [1, 2].

Для диагностики герпесвирусной инфекции можно использовать весь арсенал методов лабораторной диагностики: выделение вируса на чувствительных клеточных культурах, определение вирусного антигена с использованием различных иммунохи-

мических методов, выявление ДНК вирусов методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), определение специфических антител. Наиболее эффективно одновременное использование нескольких методов диагностики [1].

В то же время актуален поиск новых эффективных методов для быстрой и высокочувствительной диагностики на месте оказания медицинской помощи. В связи с этим заслуживают внимания методы изотермической амплификации нуклеиновых кислот, в том числе метод петлевой изотермической амплификации ДНК (LAMP), разработанный Т. Notomi и соавт. [4]. Среди модификаций метода LAMP наибольший интерес представляет LAMP-анализ с детекцией в режиме реального времени (LAMP-PB), поскольку он минимизирует риск контаминации ампликонами и позволяет оценивать количество исследуемой ДНК. Ранее И.П. Оскорбин и соавт. исследовали несколько интеркалирующих красителей ДНК на модельных образцах плазмидной, фаговой и бактериальной ДНК и показали, что в LAMP-PB краситель SYTO-82 обеспечивает наибольшее соотношение сигнал/фон и наименьшее время появления сигнала (time-to-threshold, Tt) [5]. Нам представилось целесообразным исследовать диагностическую ценность LAMP-PB с красителем SYTO-82 на клинических образцах от пациентов с генитальной герпесвирусной инфекцией.

Целью настоящей работы была оценка диагностической эффективности метода LAMP с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (LAMP-PB) с красителем SYTO-82 на модели инфекции ВПГ.

Материалы и методы

Клинические образцы (урогенитальные соскобы) от пациентов с ВПГ-инфекцией ($n = 44$) и пациентов контрольной группы ($n = 43$) предоставлены клинично-диагностической лабораторией «ДиаЛаб Плюс» (Россия). Во всех образцах контрольной группы методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР-PB) не была выявлена ДНК ВПГ, но 33 образца содержали ДНК одного из герпесвирусов – цитомегаловируса, вируса Эпштейна–Барр или вируса герпеса 6-го типа. Выделяли ДНК из клинических образцов с помощью набора реагентов «Мультиген-Реалекс» («Генлаб», Россия). Лабораторные штаммы ВПГ-1 (штамм VR3) и ВПГ-2 (штамм MS2) получены из коллекции вирусов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова.

Для дифференциального выявления ДНК ВПГ-1 и ВПГ-2 в ПЦР-PB использовали праймеры и зонды к гену белка gB, описанные в статье L. Namvag и соавт. [6]. Амплификацию проводили с использованием набора реагентов «2,5x реакционная смесь для ПЦР-PB» (ООО «Синтол», Россия). Реакционная смесь объёмом 25 мкл содержала по 5 пмоль каждого праймера и 5 пмоль зонда. Температурно-временной режим: 95 °С – 90 с (1 цикл), 95 °С – 20 с, 58 °С – 50 с (45 циклов).

Для постановки реакции LAMP были использованы наборы праймеров к гену gG (гликопротеин G) ВПГ-1 и ВПГ-2, описанные Y. Enomoto и соавт. (далее – наборы праймеров EN1 и EN2 соответственно) [7]; к гену UL2 (урацил-ДНК-гликозилаза), описанные Н. Kaneko и соавт. (далее – наборы праймеров KN1 и KN2 соответственно) [8] и краситель SYTO-82 (Invitrogen, США). Реакционная смесь объёмом 25 мкл содержала 8 ед. ДНК-полимеразы Bst 2.0 WarmStart (BioLabs, Великобритания), 2,5 мкл 10x буфера для Bst полимеразы, MgSO₄ – 8 мМ, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов – 2 мМ каждого (ООО «Синтол», Россия), смесь праймеров – по 5 пмоль праймеров F3 и B3, по 50 пмоль праймеров F1P и B1P, по 20 пмоль LPF и LPB, краситель SYTO-82 (1 мкМ). Температурно-временной режим: 65 °С – 60 мин; 80 °С – 10 мин. Для регистрации флуоресценции красителя SYTO-82 использовали цветовой канал HEX.

ПЦР-PB и LAMP-PB проводили в амплификаторе ДТ-96 («ДНК-технология», Россия). Значения Tt и порогового цикла в ПЦР-PB определяли автоматически с помощью программы RealTime_PCR v.7.7 («ДНК-Технология», Россия) на основе математического анализа формы кривой амплификации (метод геометрический). Все праймеры и зонды синтезированы в ООО «Синтол» (Россия). Визуальную детекцию результатов LAMP и ПЦР-PB проводили методом электрофореза в 1,5% агарозном геле с бромидом

стым этидием, а для LAMP также путём добавления 10 мкл раствора SYBR Green I (разведение 1 : 100) (кат. № S9430, Sigma-Aldrich) к 10 мкл продуктов реакции амплификации. Для достижения большей контрастности содержимое пробирок разбавляли водой в 5 раз.

Для оценки аналитической чувствительности LAMP и ПЦР анализировали последовательные 10-кратные разведения ДНК ВПГ-1 и ВПГ-2 с известной концентрацией: от 1×10^8 до 1×10^1 копий/мл. Диагностическую чувствительность LAMP рассчитывали, определяя долю положительных результатов LAMP для клинических образцов, в которых методом ПЦР-РВ была обнаружена ДНК ВПГ. Диагностическую специфичность LAMP рассчитывали определением доли отрицательных результатов LAMP для клинических образцов, в которых методом ПЦР-РВ не была обнаружена ДНК ВПГ.

Достоверность различий между двумя независимыми результатами определяли по *t*-критерию Стьюдента.

Результаты

Ранее в работах Y. Enomoto и соавт. [7] и H. Kaneko и соавт. [8] показана высокая эффективность метода LAMP с электрофоретической детекцией результата в диагностике заболеваний, вызванных ВПГ-1 и ВПГ-2. Мы исследовали эффективность выявления герпесвирусной ДНК в клинических образцах методом LAMP-РВ с применением интеркалирующего красителя ДНК SYTO-82.

На первом этапе были синтезированы наборы праймеров ЕН1, КН1, ЕН2, КН2 [7, 8] и проверены в реакции LAMP с электрофоретической детекцией. На **рис. 1** представлены результаты электрофоретического анализа ампликонов, полученных при LAMP-анализе ДНК лабораторных штаммов ВПГ-1 и ВПГ-2 с помощью разных наборов праймеров. Продукты реакции распределились в геле в виде характерной «лесенки», что свидетельствует о положительном результате LAMP-анализа образцов вирусной ДНК и корректной работе всех наборов праймеров. В качестве дополнительного референсного метода была использована визуальная детекция результата с красителем SYBR Green I (**рис. 2**). Ярко-зелёная флуоресценция свидетельствует о положительном результате реакции, тогда как при отрицательном результате свечение отсутствует.

На следующем этапе сравнивали эффективность LAMP-РВ-амплификации с красителем SYTO-82 и разными наборами праймеров: ЕН1, КН1, ЕН2, КН2. На основе LAMP-РВ-анализа контрольных образцов ДНК ВПГ-1 и ВПГ-2 было определено среднее значение *Tt*. Для ВПГ-1 с праймерами ЕН1 оно составило $8,17 \pm 0,09$ мин, с праймерами КН1 – $20,3 \pm 0,3$ мин (разница – 12,1 мин; $p < 0,0001$). Для ВПГ-2 с праймерами ЕН2 – $27 \pm 0,5$ мин, с праймерами КН2 – $37,03 \pm 2,1$ мин (разница – 10 мин; $p < 0,05$). В дальнейшей работе использовали только праймеры ЕН1 и ЕН2, позволившие на 10–12 мин сократить время выявления вирусной ДНК, и, следовательно, обеспечившие большую эффективность амплификации. Краситель SYTO-82 обеспечивал высокую эффективность разгорания флуоресцентного сигнала со значениями отношения сигнал–фон, достигающими 13–18 (**рис. 3**).

Для определения влияния температурного режима на эффективность амплификации была проведена LAMP-РВ при различной температуре – от 57 до 67 °С с шагом 0,85 °С. Чёткой корреляции между температурой амплификации и *Tt* не прослеживалось, однако отмечена тенденция к положительному влиянию повышения температуры на эффективность амплификации.

С целью определения аналитической чувствительности LAMP-РВ были проанализированы последовательные разведения образцов ДНК ВПГ-1 и ВПГ-2. Аналитическая чувствительность реакции LAMP-РВ с праймерами (ЕН1, ЕН2) была сопоставима с чувствительностью ПЦР-РВ и составила примерно 10^3 копий/мл. При этом время выявления герпесвирусной ДНК на пределе чувствительности составляло для LAMP-РВ 25–30 мин, тогда как для ПЦР-РВ – 75–80 мин. Таким образом, в реакции LAMP-РВ ответ может быть получен в 2,5–3 раза быстрее, чем в ПЦР-РВ.

Пробоподготовку клинических образцов для LAMP-диагностики проводили с по-

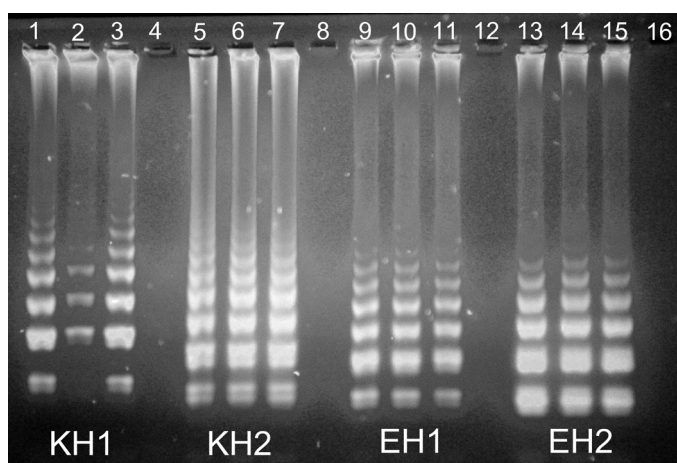


Рис. 1. Электрофоретический анализ LAMP-ампликонов в 1,5% агарозном геле.
Дорожки: 1–3 – ДНК ВПГ-1 с праймерами KH1; 5–7 – ДНК ВПГ-1 с праймерами KH2; 9–11 – ДНК ВПГ-2 с прайме-рами EH1; 13–15 – ДНК ВПГ-2 с праймерами EH2.

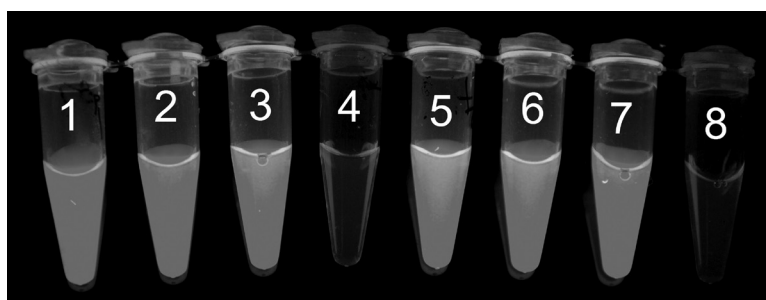


Рис. 2. Визуальная детекция LAMP-ампликонов.
Пробирки: 1–3 – ДНК ВПГ-1; 4 – отрицательный контроль; 5–7 – ДНК ВПГ-2; 8 – отрицательный контроль.

мощью экспресс-набора «Мультиген-Реалекс» («Генлаб», Россия), рекомендованного производителем для ПЦР-диагностики. Этот набор очень прост в использовании и позволяет проводить пробоподготовку быстро – в течение 20 мин. Выделение ДНК происходит за счёт лизирующего реагента и сорбента, связывающего белки и низкомолекулярные компоненты клеток, благодаря чему они выпадают в осадок, тогда как ДНК остаётся в растворе. Выделенная ДНК используется без дополнительной очистки, что может стать причиной наличия в растворе ингибиторов ферментативных реакций. В нашей работе признаков ингибирования реакции LAMP-РВ не выявлено.

При LAMP-анализе клинических образцов, содержащих ДНК ВПГ ($n = 44$), было выявлено два несовпадения с данными ПЦР-РВ. Таким образом, диагностическая чувствительность LAMP составила 96%. При LAMP-анализе образцов, не содержащих ДНК ВПГ ($n = 43$), ложноположительных результатов не выявлено, диагностическая специфичность метода составила 100%. Также не было выявлено перекрёстных реакций с другими герпесвирусами человека (вирус Эпштейна–Барр, цитомегаловирус, вирус герпеса 6-го типа), присутствующими в ряде клинических образцов.

Обсуждение

Наиболее часто в диагностике герпесвирусных заболеваний используется метод ПЦР, отличающийся высокой чувствительностью и специфичностью [2]. Метод ПЦР-

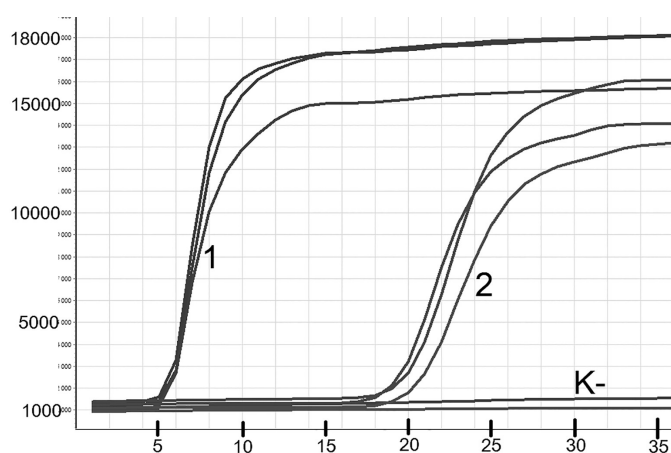


Рис. 3. Выявление ДНК ВПГ-1 и ВПГ-2 наборами праймеров ЕН1 и ЕН2 в реакции LAMP-PB.

1 – ДНК ВПГ-1, праймеры ЕН1; 2 – ДНК ВПГ-2, праймеры ЕН2; К- – отрицательный контроль.
По оси абсцисс – время, мин; по оси ординат – относительные единицы флуоресценции.

PB даёт надёжный результат, но требует относительно долгого времени ожидания ответа, особенно в случаях, когда необходимо доставить образец в удалённую лабораторию. Существенным недостатком метода ПЦР является сложность его применения вне специализированной лаборатории – на месте лечения или в отдалённых от лаборатории населённых пунктах. Экспресс-методы иммунохроматографии или латекс-агглютинации очень просты и удобны в применении и позволяют быстро получить ответ – в течение 10–15 мин, однако обладают недостаточной чувствительностью при выявлении герпесвирусного антигена.

Метод LAMP-PB имеет высокие, сопоставимые с ПЦР-PB чувствительность и специфичность, но при этом позволяет получать ответ в 2,5–3 раза быстрее. Одним из важных факторов высокой эффективности амплификации и достижения максимальной аналитической чувствительности LAMP-PB является использование «петлевых» праймеров. Стандартный набор праймеров для постановки реакции LAMP состоит из четырёх олигонуклеотидов: пары внутренних (FIP и VIP) и пары наружных (F3 и B3). Однако в работах Y. Enomoto и соавт. [7] и H. Kaneko и соавт. [8] была использована дополнительная пара так называемых петлевых праймеров (LPF и LPB), обеспечивающих повышение эффективности амплификации [9]. В специальном эксперименте мы показали, что удаление из состава реакционной смеси петлевых праймеров более чем на полчаса увеличивает значение Tt.

Использование интеркалирующих красителей ДНК является эффективным подходом, позволяющим проводить не только визуальную детекцию продуктов LAMP, но также и флуориметрическую детекцию «по конечной точке» или в режиме реального времени [10]. В настоящей работе при детекции результатов LAMP-PB с красителем SYTO-82 было отмечено высокое отношение сигнал–фон, достигающее значений 13–18, что свидетельствует о высокой эффективности амплификации и гарантирует надёжную интерпретацию результата. Важно отметить, что детекция результатов LAMP-PB не требует открывания пробирок, что минимизирует риск получения ложноположительных результатов в результате контаминации реакционных смесей ампликонами. Определение в LAMP-PB значения Tt позволяет также оценивать вирусную нагрузку в исследуемых образцах.

Реакция LAMP проходит при постоянной температуре за счёт использования ДНК-полимеразы термофильной бактерии *Bacillus stearothermophilus* (Bst ДНК-полимераза), обладающей 5'-3'-ДНК-полимеразной активностью, способностью к заме-

щению (вытеснению) цепей ДНК и без 5'-3'-экзонуклеазной активности. Благодаря этому данный метод не требует сложного и дорогого оборудования и позволяет использовать портативные анализаторы (весом менее 2 кг), включающие твердотельный термостат, оптический блок, встроенный или внешний компьютер.

Заключение

Метод LAMP-PB с красителем SYTO-82 позволяет выявлять в клиническом материале ДНК ВПГ с чувствительностью и специфичностью, сопоставимой с ПЦР-PB. Вместе с тем он обладает рядом преимуществ, которые открывают перспективы разработки на его основе наборов реагентов для диагностики инфекционных заболеваний на месте оказания медицинской помощи. Простая пробоподготовка и изотермические условия реакции LAMP-PB позволяют проводить её с помощью портативных приборов и минимального набора инструментов, при этом продолжительность реакции LAMP-PB в 2,5–3 раза меньше, чем у ПЦР-PB. Краситель SYTO-82 не ингибирует реакцию LAMP и обеспечивает хороший прирост флуоресценции, что позволяет надёжно интерпретировать результат. Одним из факторов, ограничивающих применение метода в условиях России, является отсутствие отечественных портативных термостабируемых флуориметров.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 4-9 см. REFERENCES)

1. Половцева Т. В., Каражас Н.В., Калугина М.Ю., Мамедова Е.А., Финогенова Н.А., Лаврентьева И.Н. Диагностика герпесвирусной инфекции у детей раннего возраста. *Детские инфекции*. 2012; 11(2): 51-3.
2. Сижажева А.М., Сижажева А.Л. Лабораторная диагностика герпесвирусной инфекции методом ПЦР. *Инновационная наука*. 2015; (12-2): 286-9.
3. Хрянин А.А. Герпес под подушкой. Распространённость вируса простого герпеса в российской популяции: многолетний мониторинг. *Status Praesens*. 2013; 6(17): 69-76.
10. Петруша О.А., Черниченко Т.Л., Кофиади И.А., Зверев В.В., Файзулов Е.Б. Эффективность метода петлевой изотермической амплификации с флуоресцентной детекцией в диагностике парвовирусного энтерита у плотоядных. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2019; 1(1): 90-5.

REFERENCES

1. Polovtseva T. V., Karazhas N.V., Kalugina M. Yu., Mamedova E. A., Finogenova N. A., Lavrent'eva I. N. Diagnosis of herpes virus infection in young children. *Detskie infektsii*. 2012; 11(2): 51-3. (in Russian)
2. Sizhazheva A. M., Sizhazheva A. L. Laboratory diagnosis of herpes virus infection by PCR. *Innovatsionnaya nauka*. 2015; (12-2): 286-9. (in Russian)
3. Khryanin A. A. Herpes under the pillow. The prevalence of herpes simplex virus in the Russian population: long-term monitoring. *Status Praesens*. 2013; 6(17): 69-76. (in Russian)
4. 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. Doi: <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
5. Oscorbin I. P., Belousova E. A., Zakabunin A. I., Boyarskikh U. A., Filipenko M. L. Comparison of fluorescent intercalating dyes for quantitative loop-mediated isothermal amplification (qLAMP). *Biotechniques*. 2016; 61(1): 20-5. Doi: <https://doi.org/10.2144/000114432>
6. Namvar L., Olofsson S., Bergström T., Lindh M. Detection and typing of Herpes Simplex virus (HSV) in mucocutaneous samples by TaqMan PCR targeting a gB segment homologous for HSV types 1 and 2. *J. Clin. Microbiol*. 2005; 43(5): 2058-64. Doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.43.5.2058-2064.2005>
7. Enomoto Y., Yoshikawa T., Ihira M., Akimoto S., Miyake F., Usui C., et al. Rapid Diagnosis of Herpes Simplex Virus Infection by a Loop-Mediated Isothermal Amplification Method. *J. Clin. Microbiol*. 2005; 43(2): 951-5. Doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.43.2.951-955.2005>
8. Kaneko H., Iida T., Aoki K., Ohno S., Suzutani T. Sensitive and Rapid Detection of Herpes Simplex Virus and Varicella-Zoster Virus DNA by Loop-Mediated Isothermal Amplification. *J. Clin. Microbiol*. 2005; 43(7): 3290-6. Doi: <https://doi.org/10.1128/JCM.43.7.3290-3296.2005>
9. Nagamine K., Hase T., Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell. Probes*. 2002; 16(3): 223-9. Doi: <https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415>
10. Petrusha O. A., Chernichenko T. L., Kofiadi I. A., Zverev V. V., Fayzuloev E. B. Effectiveness of the method of loop isothermal amplification with fluorescence detection in the diagnosis of parvovirus enteritis in carnivores. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2019; 1(1): 90-5. (in Russian)

Поступила 27.08.19

Принята в печать 24.09.19