

Экспресс-диагностика новой коронавирусной инфекции с помощью реакции петлевой изотермической амплификации

Хафизов К.Ф., Петров В.В., Красовитов К.В., Золкина М.В., Акимкин В.Г.

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

В настоящем обзоре представлены основные принципы применения реакции петлевой изотермической амплификации (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) для экспресс-диагностики коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2. Кратко описаны базовые технические детали метода, наиболее популярные способы специфической и неспецифической детекции продуктов амплификации, обсуждены первые опубликованные работы по использованию рассматриваемой технологии для выявления фрагментов молекулы нуклеиновой кислоты вируса SARS-CoV-2, в том числе разрабатываемые в Российской Федерации. Для доступных тестов на базе LAMP перечислены основные аналитические характеристики наборов, которые нередко сравнимы с параметрами тест-систем на основе метода полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), а в ряде случаев превосходят их. Обсуждены преимущества и ограничения этого подхода в сравнении с другими способами молекулярной диагностики (в первую очередь ОТ-ПЦР), а также перспективы развития технологии для выявления возбудителей других инфекций.

Ключевые слова: диагностика; коронавирусная инфекция; петлевая изотермическая амплификация; полимеразная цепная реакция; SARS-CoV-2

Для цитирования: 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. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-42>

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: Хафизов К.Ф. – написание текста, сбор и обработка материалов, подготовка иллюстративного материала; Петров В.В. – написание текста, экспериментальная проверка метода; Красовитов К.В. – написание текста, экспериментальная проверка метода; Золкина М.В. – написание и общая редакция текста; Акимкин В.Г. – резюме, общая редакция текста, научное редактирование.

Финансирование. Работа не имела целевого финансирования.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 27.01.2021
Принята в печать 18.02.2021

Rapid diagnostics of novel coronavirus infection by loop-mediated isothermal amplification

Kamil F. Khafizov, Vadim V. Petrov, Kirill V. Krasovitov, Maria V. Zolkina, Vasilii G. Akimkin

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

This review presents the basic principles of application of the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) reaction for the rapid diagnosis of coronavirus infection caused by SARS-CoV-2. The basic technical details of the method, and the most popular approaches of specific and non-specific detection of amplification products are briefly described. We also discuss the first published works on the use of the method for the detection of the nucleic acid of the SARS-CoV-2 virus, including those being developed in the Russian Federation. For commercially available and published LAMP-based assays, the main analytical characteristics of the tests are listed, which are often comparable to those based on the method of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR), and in some cases are even superior. The advantages and limitations of this promising methodology in comparison to other methods of molecular diagnostics, primarily RT-PCR, are discussed, as well as the prospects for the development of technology for the detection of other infectious agents.

Key words: diagnostics; coronavirus infection; loop-mediated isothermal amplification; polymerase chain reaction; SARS-CoV-2

For citation: Khafizov K.F., Petrov V.V., Krasovitev K.V., Zolkina M.V., Akimkin V.G. Rapid diagnostics of novel coronavirus infection by loop-mediated isothermal amplification. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(1): 17-28 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-42>

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

Information about the authors:

Khafizov K.F., <http://orcid.org/0000-0001-5524-0296>

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

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

Zolkina M.V., <https://orcid.org/0000-0002-2973-9947>

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

Contribution: Khafizov K.F. – writing of the text, collection and processing of the materials, preparation of the illustrative material; Petrov V.V. – writing of the text, experimental verification of the method; Krasovitev K.V. – writing of the text, experimental verification of the method; Zolkina M.V. – writing of the text, general edition; Akimkin V.G. – scientific editing, resume, general edition.

Acknowledgment. The study had no sponsorship.

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

Received 27 January 2021

Accepted 18 February 2021

1. Введение

В декабре 2019 г. в Ухане (Китайская Народная Республика, КНР) произошла вспышка нового заболевания, вызванного вирусом, получившим впоследствии наименование «коронавирус тяжёлого острого респираторного синдрома 2» (Severe Acute Respiratory Syndrome CoV 2, SARS-CoV-2, 2019-nCoV). Этот возбудитель вызывает так называемую «новую» коронавирусную инфекцию (novel Coronavirus Disease 2019, COVID-19) – болезнь, характер распространения которой с марта 2020 г. классифицируется Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) как пандемия (<https://www.who.int/ru/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing-on-covid-19---11-march-2020>). Вирус SARS-CoV-2 относится к роду *Betacoronavirus* семейства *Coronaviridae*, представители которого поражают в основном млекопитающих [1]. Вирусный геном представлен одноцепочечной РНК положительной полярности длиной почти 30 тыс. нуклеотидных пар (н.п.) оснований с 14 открытыми рамками считывания, кодирующими 27 белков [2]. Симптомы инфекции сходны с проявлениями некоторых других респираторных заболеваний, но у значительной доли пациентов болезнь может протекать бессимптомно в течение достаточно продолжительного времени [3]. Поэтому отслеживание распространения нового патогена – крайне сложная задача, особенно с учётом того, что он достаточно легко передаётся от больного незаражённым. По состоянию на январь 2021 г. согласно данным Ресурсного Центра по коронавирусу им. Джона Хопкинса (John Hopkins Coronavirus Resource Center, <https://coronavirus.jhu.edu/>) зарегистрировано свыше 100 млн подтверждённых случаев COVID-19 и более 2 млн смертей, что свидетельствует о скорости распространения вируса и важности мер по его сдерживанию. Поскольку в настоящее время средств для эффективного лечения новой коронавирусной инфекции не существует,

а массовая вакцинация в разных странах находится на начальной стадии и длительность сохранения приобретённого иммунитета достоверно неизвестна, имеется острая необходимость в чувствительном и по возможности недорогом методе экспресс-диагностики с хорошей воспроизводимостью результатов. Для решения этой проблемы желательно иметь быстрый, простой и одновременно эффективный в эксплуатации набор для тестирования. С помощью подобного теста инфицированные пациенты могут быть идентифицированы на ранней стадии, что позволит ограничить социальные контакты и усилить врачебный контроль за их состоянием, в то время как здоровые люди смогут продолжать вести обычную жизнь.

Основной молекулярной диагностики инфекции, вызванной SARS-CoV-2, в настоящее время является применение полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) [4, 5]. Такое исследование обнаруживает присутствие вирусных нуклеиновых кислот в образцах мазков из носоглотки с очень высокими показателями чувствительности и специфичности. ВОЗ и Центры по контролю и профилактике заболеваний США (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) одобрили тесты на основе ОТ-ПЦР в качестве «золотого стандарта» для обнаружения возбудителя COVID-19 [6–8]. В Российской Федерации Росздравнадзором на данный момент зарегистрировано более 40 тест-систем отечественных производителей на основе ПЦР. Однако при всех очевидных преимуществах у данного способа есть несколько недостатков. В частности, реакция ОТ-ПЦР требует дорогостоящего лабораторного оборудования: цена большинства амплификаторов с возможностью детекции в реальном времени превышает 2 млн руб., что ограничивает их использование в небольших диагностических учреждениях. Кроме того, для проведения исследования требуется квалифицированный персонал, а вся процедура тестирования занимает несколько часов без учёта времени доставки биоматериала

в лабораторию. Эти ограничения усугубляются стремительным распространением пандемии, поскольку ОТ-ПЦР не предполагает возможности быстрого и массового скрининга на местах [9]. Другие широко используемые методы диагностики COVID-19 – серологические тесты, которые выявляют антитела или антигены, ассоциированные с коронавирусной инфекцией. Они просты в применении, дают быстрые результаты и при этом не требуют существенных затрат. Однако такие системы не обладают достаточной точностью, чтобы быть надёжным подспорьем в выявлении SARS-CoV-2 из-за низкой чувствительности и невысокой специфичности (<https://open.fda.gov/apis/device/covid19serology/>). Кроме того, подобные тесты практически бесполезны на самых ранних стадиях болезни [10], когда исключительно важно выявить и изолировать одного или нескольких больных во избежание массового заражения. Наконец, разработки диагностикумов на основе технологий высокопроизводительного секвенирования [11], потенциально способных выявлять все известные вирусные патогены и потому крайне востребованных во время вспышек инфекционных заболеваний неясной этиологии, пока находятся в начальной стадии и не могут быть использованы на практике во время пандемий.

Таким образом, имеется насущная необходимость в новых эффективных решениях для диагностики новой коронавирусной инфекции. Один из подходов – группа технологий на основе изотермической амплификации, такие как амплификация по принципу «катящегося кольца» (Rolling Circle Replication, RCA) [12], реакция транскрипционной амплификации (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification, NASBA) [13], рекомбиназная полимеразная амплификация (Recombinase Polymerase Amplification, RPA) [14], хеликазозависимая (Helicase-Dependent DNA Amplification, HDA) [15] и петлевая изотермическая амплификация (Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP) [16]. Последняя вполне обоснованно считается наиболее перспективной разновидностью изотермической амплификации, что отражено в наиболее частом её упоминании в научных публикациях по сравнению с остальными. Технология LAMP похожа на обычные методики на основе ПЦР за исключением того, что амплификационный процесс протекает при постоянной температуре, что в принципе позволяет отказаться от использования дорогостоящего термоциклера, заменив его обычным термостатом. Такой способ амплификации делает выявление ДНК/РНК возбудителя в клиническом материале более быстрым и простым в использовании по сравнению с тестами на основе ПЦР, что подробно обсуждено, в частности, в недавнем обзоре [17]. Другие преимущества LAMP включают широкий диапазон доступных значений pH и температуры, которые являются приемлемыми для экспериментов [18], теоретическую возможность использовать образцы без этапа выделения нуклеиновых кислот [19] и гибкость процедур детекции получаемого продукта при сохранении специфичности и чувствительности, примерно

равных таковым у ПЦР-систем или иногда даже превосходящих их [20, 21]. Например, специфичность тестов на базе LAMP может быть во много раз выше, чем в случае ПЦР, так как необходимость одновременного отжига на матрице ДНК сразу нескольких пар праймеров в нужном порядке (см. ниже детальное описание метода) обуславливает исключительно низкую вероятность случайной амплификации нецелевого фрагмента генома.

Настоящий обзор имеет целью представить описание базовых принципов обнаружения нуклеиновых кислот с помощью петлевой изотермической амплификации и обобщение различных технологий метода, которые были разработаны для использования в диагностике COVID-19. По мнению авторов, он сможет предоставить общую информацию исследователям, заинтересованным в создании основанных на принципе LAMP методик обнаружения SARS-CoV-2 и других патогенов, а также дать более чёткое представление о потенциале использования рассматриваемой разновидности амплификации в процессе контроля текущей пандемии и потенциальных угроз в будущем.

2. Описание метода петлевой изотермической амплификации (LAMP)

LAMP – метод амплификации нуклеиновых кислот, известный с 2000 г. [16], который в настоящее время занимает всё большее место в диагностике инфекционных заболеваний, что во многом вызвано пандемией COVID-19 и необходимостью масштабного скрининга населения в максимально сжатые сроки. Этот процесс происходит при постоянной температуре (обычно 60–65 °C), что исключает необходимость использования термоциклера (как в случае традиционной ПЦР); кроме того, реакция устойчива к действию многих ингибиторов ПЦР [18]. Первоначально для амплификации целевой последовательности генома применяли 4 праймера [16], позже технология была оптимизирована с помощью введения дополнительной их пары [22]. Для протекания реакции достаточно присутствия в смеси единственного фермента – ДНК-полимеразы, обладающей способностью вытеснять цепь ДНК (например, *Bst*-полимераза из бактерии *Geobacillus stearothermophilus* или *Bsm*-полимераза из *Bacillus smithii*).

Как показано на рисунке, используемый для проведения типичного эксперимента с помощью LAMP набор состоит из 2 внешних (F3 и B3) и 2 внутренних (F1P и B1P) праймеров, которые распознают 6 отдельных областей последовательности ДНК-мишени (F3c, B3c, F2c, B2c, F1 и B1). Прямой внутренний праймер (F1P – Forward Internal Primer) в направлении 5'→3' состоит из области F1c, комплементарной последовательности мишени F1, и области F2, которая комплементарна участку F2c. Аналогично обратный внутренний праймер (B1P – Backward Internal Primer) состоит из областей B1c и B2, комплементарных последовательностям B1 и B2c в ДНК-мишени. Внешние праймеры F3 и B3 имеют последовательно-

сти, комплементарные участкам F3c и B3c соответственно. Применяемые для любой процедуры LAMP праймеры должны быть оптимизированы в целях удовлетворения ряду критериев, таких как температура плавления, GC-состав, длина и расстояния между участками в ДНК-мишени, стабильность 5'- и 3'-концов и т.д. [23].

Амплификационный процесс начинается с формирования комплекса FIP с целевой ДНК в области F2 с образованием двухцепочечной ДНК в равновесии при температуре около 65 °С [23]. Затем *Bst*-ДНК-полимераза с вытесняющей активностью инициирует соединение ДНК с FIP, одновременно вытесняя одну цепь ДНК при её наличии. После этой стадии инициации праймер F3 связывается с комплементарной областью F3c и замещает созданную FIP-комплементарную цепь. Благодаря наличию последовательности F1c в FIP последняя способна самоотжигаться и образовывать петлевую структуру на одном конце ДНК. Эта цепь затем служит мишенью для инициированного с VIP синтеза ДНК и последующего замещения цепи из процесса образования молекулы нуклеиновой кислоты, начавшегося с B3. Подобное явление позволяет другому концу одноцепочечной ДНК также образовывать форму петли, в результате чего получается напоминающая гантель структура, служащая шаблоном для последующей амплификации. Полезными для первичного понимания механизма LAMP могут быть соответствующие видеоролики от компании – крупного производителя *Bst*-полимеразы

«New England Biolabs» (США) (https://youtu.be/9Kv_hSDEX7M; <https://youtu.be/cnXDTjCXGjE>). Для дизайна структур праймеров часто используют специализированный программный продукт PrimerExplorer (<http://primerexplorer.jp/lampv5e/index.html>). Важным нюансом в ходе разработки является отсутствие гомо- и гетеродимеров, поскольку они способны ингибировать образование целевого продукта в ходе нематричной амплификации, приводя к ложным результатам.

После образования гантелеподобной структуры происходит экспоненциальная амплификация аналогичных образований, при этом ДНК-полимераза запускает синтез ДНК в области F1. FIP также гибридизуется с однопетлевой структурой из участка F2, и синтез ДНК этого праймера вызывает смещение праймированной с области F1 цепи и самосвязывание её в петлевую структуру. Наконец, с другой стороны исследуемого фрагмента ДНК, из области B1 в новой петле повторно начинается синтез самопраймированной ДНК с амплификацией текущей матрицы и созданием новой из замещения FIP-комплементарной цепи. Благодаря этому повторяющемуся процессу возможно получение больших количеств нуклеиновых кислот – ДНК может быть амплифицирована до 10⁹ раз в течение 1 ч [24]. Для дальнейшего повышения эффективности разработана также методика LAMP с 6 праймерами (т.н. петлевыми) [22]. В ней вместо 2 пар используются 3, при этом прямые и обратные петлевые праймеры (LoopF и LoopB) отжигаются с областями между F1/F2 и B1/B2 соответствен-

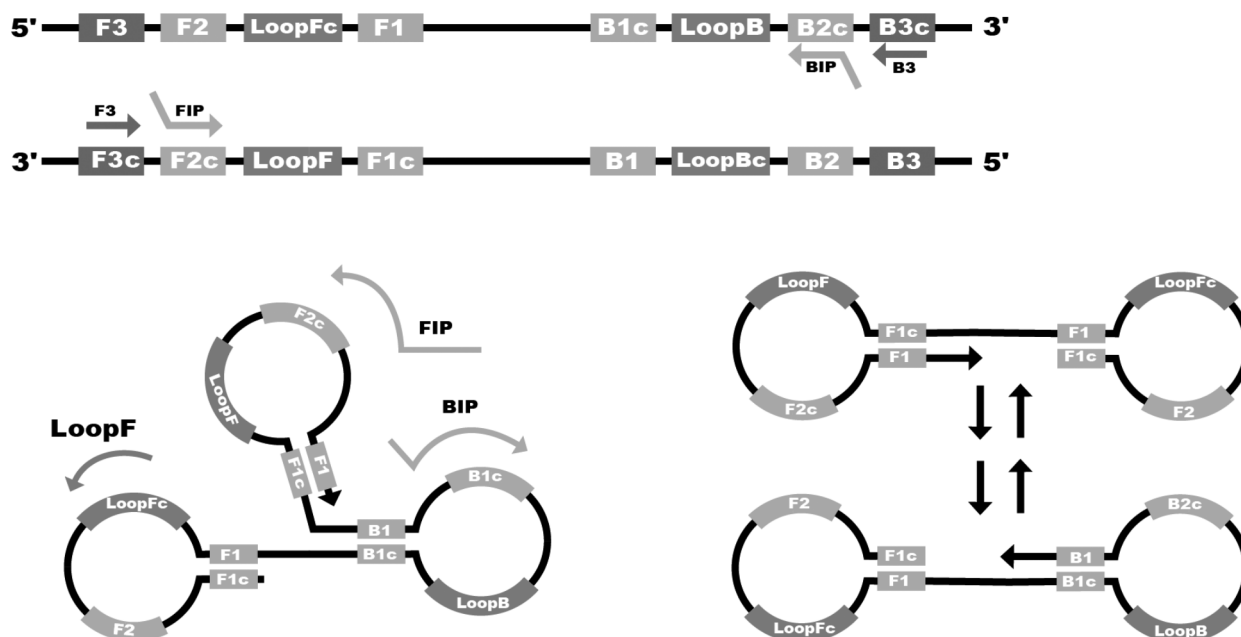


Схема петлевой изотермической амплификации. Внешние праймеры отмечены как F3/B3; внутренние, состоящие из областей F2/B2 и комплементарных им последовательностей F1/B1, – FIP/BIP; петлевые – LoopF/B. В ходе реакции происходят циклический переход между двумя формами и их удлинение в гантелеобразные структуры с множественными петлями.

Schematic representation of the loop-mediated isothermal amplification. External primers are labeled as F3/B3, internal – FIP/BIP, consisting of F2/B2 regions and complementary sequences of F1/B1, loop primers – LoopF/B. During the amplification reaction, a cyclic transition between two forms and their subsequent elongation into dumbbell-like structures with multiple loops occur.

но [23]. Доказано, что такие праймеры ускоряют течение реакции, поскольку амплификация происходит быстрее благодаря увеличению количества начальных точек синтеза ДНК [24].

С целью расширения возможностей LAMP от определения ДНК до выявления РНК, а также для реализации мультиплексной детекции в исходный протокол было добавлено несколько улучшений для разработки различных методик, включая процедуру LAMP с обратной транскрипцией (RT-LAMP) и мультиплексную LAMP. В первом случае к реакционной смеси добавляют обратную транскриптазу, чтобы осуществить преобразование вирусной РНК в комплементарную ДНК (кДНК), которая будет затем использована для амплификации. Эта процедура оказалась важнейшей в идентификации множества РНК-вирусов [24], в том числе и SARS-CoV-2. Так, комплект реагентов для получения кДНК на матрице РНК разработки ФБУН ЦНИИ эпидемиологии по состоянию на 2020 г. входил в состав более 25% наборов для диагностики новой коронавирусной инфекции в РФ. Мультиплексные системы на базе LAMP были разработаны для обнаружения нескольких патогенов в одной пробирке с использованием большего числа праймеров либо с уникальными флуоресцентными сигналами [25, 26]. Вышеперечисленные характеристики тестов на основе LAMP свидетельствуют о перспективности рассматриваемой технологии в области экспресс-диагностики вирусных инфекций. Таким образом, данный метод имеет большой потенциал для выявления SARS-CoV-2, о чем сказано далее в соответствующем разделе.

3. Детекция продуктов амплификации LAMP

3.1. Неспецифические методы детекции

В ходе LAMP-амплификации происходит накопление пирофосфата, высвобождающегося при синтезе молекул ДНК вследствие гидролиза нуклеозидтрифосфатов. Он, в свою очередь, взаимодействует с присутствующими в буфере ионами магния (Mg^{2+}), благодаря чему образуется белый осадок. В результате в ходе реакции происходит помутнение раствора, которое может быть зафиксировано, например, посредством турбидиметра (мутномера) [27]. Ещё одним часто используемым способом неспецифической детекции служит добавление в реакционную смесь интеркалирующих красителей, в частности SYBRTM Green I, EvaGreenTM или SYTO, что позволяет с помощью ПЦР-амплификатора с детекцией в режиме реального времени получать кривые амплификации. Однако недостатком ряда (хотя и не всех) этих красителей является их ингибирующий реакцию эффект, что может снижать чувствительность тестов на основе LAMP [28]. В то же время показано, что метод LAMP толерантен к веществам, ингибирующим ПЦР, что является его важным преимуществом [18]. При использовании некоторых красителей (например, SYBRTM Green I или EvaGreenTM) пробирки

можно освещать ультрафиолетовой (УФ) лампой или светодиодом, что даёт окрашивание положительных проб [29].

Помимо этого для возможности использования в полевых условиях разработан ряд методик для визуализации конечных продуктов невооружённым глазом. Обычно к реакционной смеси добавляют индикаторы, меняющие цвет в случае прохождения реакции. Для некоторых из них (включая, крезоловый красный или нейтральный красный) необходимо довести pH исходной реакционной смеси до определённого значения (~8,8). В ходе реакции этот показатель снижается до ~6,0–6,5, что сопровождается изменением цвета красителя [30]. Другие индикаторы не требуют специальной подготовки смеси: например, гидронафтол синий или флуоресцентный краситель Quant-iTTM PicoGreenTM, изменение цвета которых также можно наблюдать невооружённым глазом [31]. Предложен также простой метод детекции, основанный на геле-электрофорезе [32]. Кроме того, результат амплификации можно количественно оценить посредством измерения концентрации ионов марганца (Mn^{2+}). Для этого было предложено перед реакцией добавлять к раствору кальцеин (флуорексон) – индикатор флуоресцентного металла, в отсутствие свободных Mn^{2+} начинающий флуоресцировать при облучении светом с определённой длиной волны (495 нм) [33]. Если же в начальной смеси присутствовали указанные ионы, то кальцеин будет образовывать с ними нерастворимый солевой комплекс марганецпирофосфат. Впоследствии флуоресценция ещё более усиливается при связывании свободного кальцеина с Mg^{2+} из реакционной смеси LAMP, и её можно легко наблюдать в УФ-свете при длине волны 365 нм [24]. Наконец, среди других неспецифических способов можно отметить анализ кривых плавления и отжига, биолюминесценцию через конверсию пирофосфата [34] и электрохемилюминесценцию [35].

Следует отметить, что хотя вероятность случайной амплификации похожих последовательностей геномных фрагментов, принадлежащих другим организмам, достаточно мала и в значительной степени может контролироваться за счёт тщательного дизайна праймеров, перечисленные выше методы обнаружения, не зависящие от последовательностей ДНК, могут показать наличие длинных димеров праймеров как ложноположительный результат [36]. В связи с этим возникает проблема специфической (зависящей от последовательности нуклеиновой кислоты, т.е. последовательность-специфичной) детекции продуктов амплификации LAMP. Ряд таких методик описан в следующем разделе.

3.2. Специфические методы детекции

На сегодняшний день опубликовано более 30 различных методов детекции продуктов амплификации ДНК при помощи LAMP, которые детально рассмотрены в недавнем обзоре [37]. Здесь мы кратко представим лишь наиболее перспективные на наш взгляд для практической диагностики COVID-19.

3.2.1. Молекулярный маяк

ДНК-зонд, специфичный к фрагменту мишени, модифицируется флуорофором и гасителем с каждого конца. При этом его 5'-конец комплементарен 3'-концу на протяжении 5–7 нуклеотидов, что позволяет формироваться структуре в форме шпильки или «сковородки» [38, 39]. В отсутствие амплификационных продуктов молекулярный маяк (molecular beacon) существует в форме замкнутой петли из-за внутримолекулярной гибридизации между фрагментами у 5'- и 3'-концов. Таким образом, флуорофор и гаситель располагаются в непосредственной близости, что приводит к затуханию флуоресценции. При наличии продуктов амплификации зонд специфически гибридизуется с ампликоном, в результате чего петля раскрывается, разделяя флуорофор и гаситель с последующим высвобождением флуоресценции. Молекулярные маяки применялись ранее с целью определения вирусных нуклеиновых кислот при помощи LAMP для вирусов иммунодефицита человека (ВИЧ; Human Immunodeficiency Virus, HIV), гепатитов В, С и Е (Hepatitis Virus type B, C, E – HBV, HCV, HEV), Денге (Dengue Virus, DENV) и Западного Нила (West Nile Virus, WNV) [38]. Аналитическая чувствительность при этом составила 50–100 вирусных частиц на реакцию в случае обнаружения вирусов гепатита В и С. Высокая аналитическая специфичность подтверждена тестированием на различных вирусных нуклеиновых кислотах. Кроме того, проведены клинические испытания на реальном биологическом материале от пациентов. Итоговые показатели диагностической чувствительности и специфичности достигли 97 и 100% соответственно. Молекулярные маяки были также использованы для обнаружения части гена *ompW* длиной 1031 п.н. из *Vibrio cholerae* [39]. Необходимо отметить нестабильность шпильки в условиях реакции LAMP, что иногда приводит к не очень высокому соотношению сигнал/шум. С помощью «заблокированных» нуклеиновых кислот (Locked Nucleic Acids, LNA), создающих более высокие температуры плавления, можно повысить термостабильность молекулярных маяков, уменьшая сигнал фоновой флуоресценции [40].

3.2.2. Конкурентно-связывающийся тушающий зонд

Конкурентно-связывающийся тушающий зонд для LAMP (Alternately Binding Quenching Probe Competitive LAMP, ABC-LAMP), разработанный первоначально в целях количественного определения ДНК, использует гуаниновое тушение и основан на конкурентной гибридизации [41]. Реакционная смесь включает 2 мишени: целевой ампликон и внутренний контроль амплификации (так называемый «конкурент»). Обе они содержат одинаковую последовательность в области петли, которая комплементарна особому флуоресцентно-меченному (ФМ)-зонду для альтернативного тушения за счёт связывания (Alternately Binding Quenching Probe, AB-QProbe). При этом связывание зонда с целевым ампликоном снижает интенсивность флуоресценции вследствие её тушения гуа-

нином. Напротив, связывание с конкурентом поддерживает флуоресценцию метки зонда, так как гуанин в конкуренте заменён на цитозин. Отношение числа продуктов амплификации от мишени и от конкурента можно рассчитать по интенсивности флуоресценции. Процедура ABC-LAMP охарактеризована для модельной мишени – гена *atoA*, который кодирует фермент, окисляющий аммиак у бактерий окружающей среды. Аналитические параметры не оценивались, однако успешно продемонстрировано точное количественное определение. Преимущество ABC-LAMP для количественного определения ДНК-мишени состоит в том, что присутствующие в смеси для LAMP ингибиторы одинаково влияют на амплификацию реальной мишени и конкурента. Последний при этом служит внутренним контролем и позволяет количественно определять амплификационные продукты на основе измерений флуоресценции в начале и в конце процесса амплификации, не требуя мониторинга в режиме реального времени. Одним из недостатков подхода является то, что эффективность усиления флуоресценции мишени и конкурента должна быть сбалансирована, для чего необходимо построение стандартной кривой.

3.2.3. Флуоресценция петлевого праймера при самозатухании

Внутренний или петлевой праймер могут быть модифицированы флуорофором (в позициях 2 или 3 тимины с 3'-конца), способным к самозатуханию. Этот процесс является механизмом гашения, не основанном на FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer – флуоресцентный резонансный перенос энергии), так как не требуется дополнительных флуорогенных молекул. Детали повторного появления ранее погашенной флуоресценции сопряжённой метки пока окончательно не ясны, но одно из возможных объяснений гашения флуоресценции может заключаться в донорской способности гуанина, которая позволяет перенести заряд между азотистым основанием и ближайшим красителем [42]. Первоначально модифицированный флуорофором праймер не связан с матрицей ДНК и находится в растворе в свободном состоянии, вследствие чего может проявлять феномен самозатухания. Во время амплификации такой праймер включается в двухцепочечный ампликон, что ведёт к ослаблению тушения и, как следствие, усилению флуоресценции. По мере увеличения числа подобных ампликонов интенсивность свечения нарастает, что свидетельствует об успешной амплификации с помощью реакции LAMP. Аналитическая и клиническая валидация методики с использованием флуоресценции петлевого праймера при самозатухании (Fluorescence of Loop Primer Upon Self Dequenching, FLOS-LAMP) проведена в отношении высокоинфекционного для человека ДНК-содержащего вируса ветряной оспы *Varicella zoster* [43]. В эксперименте использовались 2 типа материала: без этапа предварительной экстракции нуклеиновых кислот и на уже выделенной ДНК, причём в последнем вариан-

те наблюдался более надёжный сигнал. Аналитическая чувствительность составила 500 копий на реакцию, показатели диагностической чувствительности и специфичности – 96,8 и 100% соответственно. Одной из технических проблем в рассматриваемом случае является необходимость подбора флуорофоров, демонстрирующих высокое самозатухание, и праймера, подходящего для модификации флуорофором в нужном месте, что не всегда представляет собой простую задачу и накладывает определённые ограничения при дизайне структур олигонуклеотидов. Визуализация при таком способе возможна также при добавлении полиэтиленimina, что приводит к образованию его нерастворимого комплекса с ампликоном. Флуоресцентно-меченные зонды встраиваются в осадок и могут быть обнаружены при помощи обычной УФ-лампы. Кроме того, существует принципиальная возможность различения 2 мишеней с получением, таким образом, аналогичного мультиплексу формата при присутствии в смеси лишь одной из них.

3.2.4. Универсальный ФМ-зонд

Универсальный ФМ-зонд (QProbe) [44] используется совместно с присоединённой одноцепочечной молекулой ДНК, которая состоит из комплементарной ДНК-мишени последовательности одного из основных праймеров с добавленной 5'-концевой универсальной последовательностью, комплементарной в свою очередь универсальному олигонуклеотиду с присоединённым гасителем на 3'-конце. Такая молекула ДНК действует как сочленение между ФМ-зондом и мишенью посредством гибридизации с матрицей во время амплификации. Перенос электрона между флуорофором и гуанином в целевой последовательности вызывает тушение флуоресценции. Преимущество метода заключается в том, что нуклеотидная последовательность зонда фиксирована и не содержит целевых (вариабельных) областей; кроме того, возможно использование внутреннего контроля. Тем не менее этот способ является последовательность-специфичным механизмом детекции продуктов амплификации, поскольку флуорофор, прикрепленный к 3'-концу универсальной последовательности, тушится гуанином в целевой цепи при условии нахождения последнего в непосредственной близости. Указанная методика применима лишь в ситуациях, когда основания гуанина присутствуют в целевой последовательности в нужной позиции, в связи с чем её можно в большей степени считать полуниверсальной.

3.2.5. Зонды LightCycler

Зонды LightCycler были использованы в процессе реакции LAMP Chou P.H. и соавт. [36] и в настоящее время коммерчески доступны для ПЦР. Конструкция содержит зонд-акцептор, модифицированный гасителем на 5'-конце, и зонд-донор с флуорофором на 3'-конце. Расстояние между 5'- и 3'-концами акцепторной и донорной частей в целевой последовательности обычно равно 2 н.п., что позволяет гаран-

тировать близость расположения флуорофора и гасителя. В процессе LAMP генерируются ампликоны, обеспечивающие комплементарные зондам последовательности, с которыми они гибридизуются, приближая флуорофор и гаситель. Аналитическая чувствительность определялась для вируса синдрома белых пятен (White Spot Syndrome Virus, WSSV) креветок пенеид (*Penaeidae*) и оказалась равной около 100 копий на реакцию. Специфичность подтверждена тестированием на ДНК хозяина и других обнаруженных у креветок вирусных патогенов. Клиническая значимость продемонстрирована путём тестирования геномной ДНК вируса WSSV при инфицировании им белоногой креветки (*Penaeus vannamei*) [36].

3.2.6. Детекция на основе нуклеазы Cas12 и тонкослойной хроматографии

Broughton J.P. и соавт. [8] опубликовали разработку и первоначальную валидацию теста для обнаружения РНК SARS-CoV-2 из образцов пациентов на основе комплекса CRISPR/Cas12. Методика получила название DETECTR (DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter). В ходе такого исследования одновременно осуществляются обратная транскрипция и изотермическая амплификация по методу RT-LAMP, а также последующее обнаружение с помощью белка Cas12 предопределённых последовательностей нового коронавируса, после чего расщепление репортёрной молекулы подтверждает выявление вирусной РНК. Визуализация детекции Cas12 достигается с помощью молекулы FAM-биотина и тест-полосок, предназначенных для захвата меченых нуклеиновых кислот. Нерасщеплённые репортёрные молекулы при этом захватываются на 1-й (контрольной) линии детектирования, тогда как неизбирательная активность расщепления Cas12 генерирует сигнал на 2-й (тестовой) линии.

3.3. Другие методы детекции

Безусловно, на этом список методик специфической детекции продуктов амплификации с помощью LAMP не исчерпывается, однако их подробное описание выходит за рамки данного обзора. Среди других возможных способов можно упомянуть гашение гуанином с потерей сигнала при отжиге праймера [45], флуоресценцию с усилением сигнала с использованием меченых праймеров и интеркалятора – бромида этидия ($C_{21}H_{20}BrN$) [46], обнаружение амплификации по высвобождению тушения (Detection of Amplification by Release of Quenching, DARQ) [47], использование ассимилирующего зонда [48], метод одноступенчатого вытеснения цепи (One-step Strand Displacement, OSD) [49].

4. Недостатки метода LAMP

Одним из основных недостатков тестов на базе LAMP является относительная сложность дизайна праймеров, так как требуется подобрать сразу 6–8 участков на достаточно коротком фрагменте ДНК и избежать при этом амплифицирования других (не-

желательных) её последовательностей, особенно в геноме хозяина, что существенно ограничивает выбор целевых участков. Большое количество праймеров увеличивает также вероятность формирования конкатамеров [50]. В связи с тем что суммарная область покрытия праймерами существенно больше, чем при классической ПЦР, заметно выше становится и вероятность появления мутаций в местах посадки, особенно у РНК-вирусов, к которым относится и SARS-CoV-2. Это явление может привести к меньшей эффективности отжига праймеров с получением ложнонегативных результатов [51]. Поэтому необходимо постоянно отслеживать появление новых мутационных изменений в геномах исследуемых патогенов, чтобы своевременно корректировать ситуацию посредством замены олигонуклеотидов либо введением так называемых вырождений. Кроме того, возможно одновременное использование сразу 2 и более геномных фрагментов в одном тесте, особенно при неспецифической детекции продукта амплификации, что может снизить эффект появления замен в геноме и предоставить дополнительное время на редизайн праймеров в случае необходимости.

Другая проблема, частично описанная выше, – трудности в специфической детекции амплификационных продуктов, хотя для их преодоления предложены различные подходы (см. раздел 3) [37]. Таким образом, LAMP пока проблематично использовать в режиме мультиплекса для выявления сразу нескольких патогенов в одной пробирке, что важно при диагностике острых респираторных и кишечных инфекций, вызываемых большим количеством бактерий и вирусов. Кроме того, этот факт определённым образом усложняет процесс внесения внутреннего контрольного образца (ВКО), которое постепенно становится практически обязательным этапом в подготовке коммерческих диагностических тест-систем.

Наконец, следует отметить сохраняющуюся ограниченность в предложении на российском рынке реагентов отечественного производства для реакции петлевой изотермической амплификации (в частности, *Bst*-полимеразы), хотя указанная ситуация, несомненно, будет улучшаться.

5. Прогресс в обнаружении SARS-CoV-2 с помощью RT-LAMP

В самом начале пандемии COVID-19 (2020 г.) Lamb L.E. и соавт. [21] сообщили о разработке скринингового экспресс-теста на основе LAMP для обнаружения РНК SARS-CoV-2 с продолжительностью анализа менее 30 мин без этапа выделения. Для достижения этой цели были использованы консенсусные последовательности 23 известных на тот момент штаммов вируса. С помощью программного обеспечения LAMP Designer (Premier Biosoft™, США) был осуществлён дизайн праймеров для таргетирования консенсусных последовательностей в ходе RT-LAMP, общих для всех известных штаммов коронавируса, но отличающихся от таковых у вирусосов со схожими последовательностями (например, коро-

навирус летучих мышей (BtCoV)). С целью проверки работоспособности теста в качестве модельных образцов использовали биологический материал от здоровых людей с добавлением синтезированных олигонуклеотидов, созданных на базе последовательности GenBank MN908947.3. Детекцию результатов амплификации RT-LAMP контролировали 3 методами: наблюдением за изменением цвета реакционной смеси, определением уровня флуоресценции и гель-электрофорезом. Показано, что данный тест имеет очень высокую специфичность в отношении SARS-CoV-2, поскольку во многих случаях с использованием других вирусов, таких как MERS (коронавирус Ближневосточного респираторного синдрома), BtCoV и MHV (вирус гепатита мышей), сигнал не наблюдался. Чувствительность также была исследована с пределом обнаружения до 1,02 фг на реакцию с применением смоделированных образцов. Наконец, подтверждена высокая клиническая ценность данного теста, поскольку он правильно определял молекулы нуклеиновых кислот SARS-CoV-2 независимо от типа пробы (сыворотка, моча, слюна, мазки из рото- и носоглотки).

С целью создания быстрой и простой в применении тест-системы для диагностики COVID-19 Huang W.E. и соавт. разработали 4 набора праймеров для LAMP, нацеленные на различные области генома SARS-CoV-2 [52]. Из них 2 относились к гену *N* вируса, а 2 других – к генам *S* и *ORF1ab*. Последний располагается близко к 5'-концу вирусной РНК, тогда как *N* находится у 3'-конца. Было высказано предположение, что эффективность детекции в разных регионах может быть неодинаковой, поскольку деградация РНК происходит от 5'-к 3'-концу в процессе её забора и экстракции. Праймеры FIP конъюгировали с FAM на 5'-конце, что оказалось эффективным и надёжным как для флуоресцентного, так и для колориметрического способа обнаружения продуктов амплификации. Подтверждена высокая специфичность всех праймеров для обнаружения SARS-CoV-2 и показано, что они не амплифицируют ДНК человека, благодаря чему могут использоваться при анализе клинических образцов. Точность тестов также оказалась приемлемой: показатели хорошо согласовывались с полученными при традиционной ОТ-ПЦР. В ходе обнаружения вирусной РНК наборы праймеров продемонстрировали результаты с чувствительностью от 2 до 20 копий РНК на реакцию (25 мкл) за 30 мин амплификации в зависимости от мишени. Выполнен дополнительный одноэтапный тест для оценки возможности исключения стадии выделения РНК в процессе RT-LAMP. Отмечено, что последняя на протяжении 40 мин привела к видимому невооружённым глазом изменению цвета, что указывает на осуществимость проведения RT-LAMP без этапа экстракции нуклеиновых кислот. Праймерные наборы правильно выявили все 8 положительных и 8 отрицательных клинических образцов, что служит доказательством возможности использования такого теста в качестве замены классическим методикам на основе ОТ-ПЦР для обнаружения SARS-CoV-2, осо-

бенно в условиях отсутствия специализированной лаборатории.

С начала 2020 г. создано значительное количество тест-систем для экспресс-диагностики SARS-CoV-2 на основе LAMP и опубликованы соответствующие статьи. Только поиск по базе PubMed даёт свыше 80 работ (начиная с марта 2020 г.), имеющих отношение к тестированию новой коронавирусной инфекции с помощью петлевой изотермической амплификации. При этом сюда не входят статьи в статусе препринта, а также не публикуемые в открытой печати коммерческие решения. В частности, разработано несколько сетов праймеров, специфичных к различным генам нового коронавируса [53], и продемонстрированы их весьма высокие показатели чувствительности и специфичности. В другом случае в целях определения результатов амплификации использован портативный прибор на базе смартфона для выполнения конечной флуоресцентной детекции LAMP-образцов на микрофлюидном чипе [54]. Показано, что значения специфичности при диагностике посредством LAMP могут приближаться к 100% [55], а чувствительности – превышать 90%. В работе Dao Thi V.L. и соавт. [56] описана процедура RT-LAMP, которая надёжно обнаруживала РНК SARS-CoV-2 с пороговым значением цикла в ОТ-ПЦР до 30 при чувствительности 97,5% и специфичности 99,7%. Опубликован также протокол без предварительного выделения нуклеиновой кислоты, который сохранил отличную специфичность (99,5%), хотя и показал снижение чувствительности (86% для количества циклов ПЦР с превышением порогового значения флуоресценции (Ct) <30) по сравнению с RT-LAMP с предварительной экстракцией РНК. Ещё в одном исследовании выделение нуклеиновых кислот и последующая RT-LAMP были интегрированы в реакционные блоки микрофлюидного диска [57]; единый прибор запускал реакцию вращением последнего, контролировал нагрев до необходимой температуры, выполняя также обнаружение сигнала флуоресценции. Предполагаемый предел обнаружения для РНК вирусных частиц составил 2 копии на реакцию, пропускная способность – 21 тест на диске, время анализа от образца до результата – ~70 мин. Продемонстрировано также обнаружение SARS-CoV-2 на основе RT-LAMP с использованием специально изготовленного картриджа и прибора на базе смартфона, которое может быть выполнено непосредственно в месте забора образца [58]. Методика имеет предел обнаружения (limit of detection, LOD) 50 копий РНК на 1 мкл реакционной смеси в течение ~30 мин. По утверждению авторов разработки, это был первый мобильный прибор для детекции РНК нового коронавируса на основе изотермической амплификации с применением одноразового картриджа и без выполнения этапа экстракции РНК. Другая аналогичная технология от Colog Genomics (США) показала высокие пропускную способность и чувствительность (LOD 0,75 копий на 1 мкл), однако она требует предварительной стадии выделения РНК.

С целью удовлетворения потребностей в диагностической платформе на основе автономной колориметрической изотермической амплификации нуклеиновых кислот разработано недорогое устройство со встроенным компьютером, камерой для визуализации и алгоритмом обработки изображений на основе искусственного интеллекта [59]. В общей сложности с использованием такой платформы протестировано около 200 образцов пациентов с подозрением на наличие COVID-19, при этом достигнуты более высокие показатели надёжности, специфичности и чувствительности, чем у текущего «золотого стандарта» ПЦР. Семь типов коронавируса (HCoV-229E, HCoV-OC43, HCoV-NL63, HCoV-HKU1, SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2) были выявлены с помощью специального микрофлюидного устройства и изотермической амплификации за 40 мин [60]. Быстрый и простой в использовании вариант методики RT-LAMP, специфически амплифицирующей области генов *ORF8* и *N*, был использован на базе недорогого лабораторного оборудования, что особенно подходит для вокзалов, аэропортов и больниц [61]. Далее, создана тест-система на основе RT-LAMP для определения одновременно 2 генов SARS-CoV-2 (*S* и *RdRP*), имеющие параметры аналитической чувствительности и специфичности, предел обнаружения и точность, сравнимые с таковыми ОТ-ПЦР [62]. Такой протокол, использующий сразу 2 мишени, может быть особенно востребован с учётом постоянно появляющихся новых мутаций возбудителя, потенциально способных привести к снижению эффективности некоторых тестов (что уже произошло с рядом диагностикомов вследствие «британской мутации») [51]. Наконец, описан ещё один подход с мультиплексированием RT-LAMP и проверена его чувствительность [63]. Мультиплексирование праймеров в реакциях RT-LAMP представляется многообещающим способом дальнейшего повышения чувствительности за счёт детекции нескольких геномных фрагментов. Комбинация ПЦР и LAMP была использована для повышения степени чувствительности теста [64]. На данный момент также коммерчески доступен набор от New England Biolabs (США) для быстрой детекции SARS-CoV-2 методом колориметрической петлевой изотермической амплификации, содержащий реагенты для LAMP-амплификации фрагментов генов *N* и *E* нового коронавируса и контроли оценки эффективности. Реакция проводится при температуре 65 °С и занимает всего 30 мин. Для простой визуальной колориметрической интерпретации результатов в состав реакционной смеси включён рН-чувствительный краситель.

В РФ также предпринято несколько попыток введения тестов на основе изотермической амплификации в диагностическую практику. Так, в наборе реагентов, разработанном ООО «Медико-биологический Союз» (Россия), использована методика LAMP, что заметно сократило время исследования образцов по сравнению с ОТ-ПЦР. В этой системе достаточно прогреть образцы в лизирующем буфере, перенести их в планшет, добавив реакционную смесь, и провести

амплификацию, а заявленная чувствительность составляет 10^3 копий на 1 мл. В тестах от «Эвотэк-Мирай Геномикс» (Россия – Япония) реализован модифицированный метод петлевой изотермической амплификации (SmartAmp), который по точности не уступает технологии ПЦР, но сокращает время тестирования более чем в 4 раза. Значение чувствительности заявлено производителем как 10^2 копий на 1 мл. В наборе реагентов для выявления РНК нового коронавируса методом RT-LAMP от НПФ «Литех» (Россия) аналитических характеристик не заявлено. Был также разработан комплекс («Синтол», Россия) [64] для проведения реакции RT-LAMP с целью обнаружения специфических фрагментов РНК нового коронавируса посредством флуоресцентной детекции в режиме реального времени. Его применение позволяет выявить 2 мишени в одной пробирке: фрагмент вирусной РНК и фрагмент ДНК внутреннего положительного контроля, исключающий ложноотрицательный результат; время анализа – не более 40 мин. Экспресс-тест от ООО «Система-БиоТех» (Россия) позволяет определять наличие SARS-CoV-2 за 20 мин. Система предназначена для диагностики на всех стадиях заболевания, может использоваться для скрининга в любых медицинских организациях; детекция вируса происходит по изменению цвета реакционной смеси в пробирке. Кроме того, различными организациями в РФ ведутся работы по локализации производства реагентов для создания тестов на базе LAMP, что, безусловно, приведёт к снижению их стоимости и более быстрому внедрению в широкую клиническую практику. Анонсированный в начале 2021 г. экспресс-тест для выявления РНК SARS-CoV-2 от ФБУН ЦНИИ эпидемиологии (Россия), основанный на реакции LAMP и разработанный полностью на базе ферментов отечественного производства, является одним из важных этапов в будущем переходе от традиционных диагностических систем на основе ПЦР на технологии нового поколения.

6. Заключение

Быстрые, недорогие и удобные для пользователя методы молекулярной диагностики – важное подспорье в борьбе со вспышками инфекционных заболеваний. Пандемия COVID-19 показала, что существует острая необходимость в наращивании объёмов тестирования, которые должны на порядки превышать уровень, достижимый с помощью существующих стандартных методик и подходов [65]. LAMP – инновационная технология амплификации генов, имеющая значительные перспективы в качестве инструмента обнаружения вирусных нуклеиновых кислот, особенно во время пандемии новой коронавирусной инфекции. В данном обзоре суммированы недавние достижения в тестировании с помощью LAMP для быстрой и точной детекции молекул РНК SARS-CoV-2. Несмотря на то что такие тесты до сих пор могут приводить к ошибочным результатам, особенно ложнонегативным, преимущества использования LAMP по-прежнему значительны. Одним из них является

высокая скорость исследования – подтверждение результатов для типичной процедуры RT-LAMP происходит в несколько раз быстрее, чем при ОТ-ПЦР [23]. Отсутствие стадии денатурирования и возможное объединение процессов амплификации и детекции позволяют провести анализ с коротким временем получения результатов. Другим достоинством является простота применения, поскольку изотермический характер амплификации не требует использования дорогостоящего оборудования. Изотермические условия также помогают обеспечить высокую эффективность амплификации вследствие отсутствия потерь времени на термоденатурацию (как у традиционной ОТ-ПЦР) [24]. Наконец, визуализация результатов относительно проста, поскольку в качестве индикатора можно использовать pH-зависимые красители либо степень помутнения раствора, что вполне можно увидеть невооружённым глазом. Поэтому, скорость, простота и экономическая эффективность процедуры делают LAMP хорошим кандидатом для мониторинга распространения вируса SARS-CoV-2.

Помимо улучшения чувствительности и специфичности за счёт тщательного дизайна праймеров для LAMP, в свете дальнейшей оптимизации крупномасштабного скрининга на COVID-19 одной из важных тенденций представляется разработка «истинного» одностадийного процесса LAMP в закрытой пробирке [17]. Такая процедура потребует только перенесения пользователем тампона для отбора проб в реакционную смесь с последующей амплификацией в закрытой пробирке при постоянной температуре. Таким образом, анализ может обнаруживать SARS-CoV-2 и другие патогены практически в домашних условиях с высоким уровнем детекции, подобно тому как это уже реализовано в тест-системе от компании Lucira™ (США). Вероятно, в ближайшем будущем молекулярная диагностика у постели больного станет действительно доступной, что не только повысит эффективность выявления инфекционных агентов, но и значительно снизит затраты системы здравоохранения. Сам подход может сыграть важную роль в борьбе с нынешними и будущими вспышками пандемий.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Woo P.C.Y., Huang Y., Lau S.K.P., Yuen K.Y. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses*. 2010; 2(8): 1804–20. <https://doi.org/10.3390/v2081803>.
2. Wu A., Peng Y., Huang B., Ding X., Wang X., Niu P., et al. Genome composition and divergence of the novel coronavirus (2019-nCoV) originating in China. *Cell Host Microbe*. 2020; 27(3): 325–8. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.02.001>.
3. Udugama B., Kadhiresan P., Kozlowski H.N., Malekjahani A., Osborne M., Li V.Y.C., et al. Diagnosing COVID-19: the disease and tools for detection. *ACS Nano*. 2020; 14(4): 3822–35. <https://doi.org/10.1021/acsnano.0c02624>.
4. 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(7): 2323–30. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.7.2323-2330.2002>.
5. Mackay I.M. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*. 2002; 30(6): 1292–305. <https://doi.org/10.1093/nar/30.6.1292>.

6. Esbin M.N., Whitney O.N., Chong S., Maurer A., Darzacq X., Tjian R. Overcoming the bottleneck to widespread testing: a rapid review of nucleic acid testing approaches for COVID-19 detection. *RNA*. 2020; 26(7): 771–83. <https://doi.org/10.1261/rna.076232.120>.
7. Shen M., Zhou Y., Ye J., Abdullah Al-Maskri A.A., Kang Y., Zeng S., et al. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus. *J. Pharm. Anal.* 2020; 10(1): 97–101. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2020.02.010>.
8. Broughton J.P., Deng X., Yu G., Fasching C.L., Servellita V., Singh J., et al. CRISPR–Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat. Biotechnol.* 2020; 38(7): 870–4. <https://doi.org/10.1038/s41587-020-0513-4>.
9. Schmid-Burgk J.L., Schmithausen R.M., Li D., Hollstein R., Ben-Shmuel A., Israeli O., et al. LAMP-Seq: population-scale COVID-19 diagnostics using combinatorial barcoding. *bioRxiv*. 2020.04.06.025635. <https://doi.org/10.1101/2020.04.06.025635>.
10. Hueston L., Kok J., Guibone A., McDonald D., Hone G., Goodwin J., et al. The antibody response to SARS-CoV-2 infection. *Open Forum Infect. Dis.* 2020; 7(9): ofaa387. <https://doi.org/10.1093/ofid/ofaa387>.
11. Kiselev D., Matsvay A., Abramov I., Dedkov V., Shipulin G., Khafizov K. Current trends in diagnostics of viral infections of unknown etiology. *Viruses*. 2020; 12(2): 211. <https://doi.org/10.3390/v12020211>.
12. Blanco L., Bernad A., Lázaro J.M., Martín G., Garmendia C., Salas M. Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *J. Biol. Chem.* 1989; 264(15): 8935–40.
13. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*. 1991; 350(6313): 91–2. <https://doi.org/10.1038/350091a0>.
14. Piepenburg O., Williams C.H., Stemple D.L., Armes N.A. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biol.* 2006; 4(7): e204. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0040204>.
15. Vincent M., Xu Y., Kong H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO Rep.* 2004; 5(8): 795–800. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400200>.
16. Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research*. 2000; 28(12): E63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>.
17. Thompson D., Lei Y. Mini review: Recent progress in RT-LAMP enabled COVID-19 detection. *Sens. Actuators Rep.* 2020; 2(1): 100017. <https://doi.org/10.1016/j.snr.2020.100017>.
18. Francois P., Tangomo M., Hibbs J., Bonetti E.J., Boehme C.C., Notomi T., et al. Robustness of a loop-mediated isothermal amplification reaction for diagnostic applications. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 2011; 62(1): 41–8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00785.x>.
19. Rödel J., Egerer R., Suleyman A., Sommer-Schmid B., Baier M., Henke A., et al. Use of the variplex™ SARS-CoV-2 RT-LAMP as a rapid molecular assay to complement RT-PCR for COVID-19 diagnosis. *J. Clin. Virol.* 2020; 132: 104616. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104616>.
20. El-Tholoth M., Branavan M., Naveenathayalan A., Balachandran W. Recombinase polymerase amplification-nucleic acid lateral flow immunoassays for Newcastle disease virus and infectious bronchitis virus detection. *Mol. Biol. Rep.* 2019; 46: 6391–7. <https://doi.org/10.1007/s11033-019-05085-y>.
21. Lamb L.E., Bartolone S.N., Ward E., Chancellor M.B. Rapid detection of novel coronavirus/Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *PLoS One*. 2020; 15(6): e0234682. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234682>.
22. Nagamine K., Hase T., Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell Probes*. 2002; 16(3): 223–9. <https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415>.
23. Parida M., Sannarangaiah S., Dash P.K., Rao P.V.L., Morita K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Rev. Med. Virol.* 2008; 18(6): 407–21. <https://doi.org/10.1002/rmv.593>.
24. Sahoo P.R., Sethy K., Mohapatra S., Panda D. Loop mediated isothermal amplification: An innovative gene amplification technique for animal diseases. *Vet. World*. 2016; 9(5): 465–9. <https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.465-469>.
25. Mahony J., Chong S., Bulir D., Ruyter A., Mwawasi K., Waltho D. Multiplex loop-mediated isothermal amplification (M-LAMP) assay for the detection of influenza A/H1, A/H3 and influenza B can provide a specimen-to-result diagnosis in 40 min with single genome copy sensitivity. *J. Clin. Virol.* 2013; 58(1): 127–31. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2013.06.006>.
26. Foo P.C., Chan Y.Y., Mohamed M., Wong W.K., Nurul Najian A.B., Lim B.H. Development of a thermostabilised triplex LAMP assay with dry-reagent four target lateral flow dipstick for detection of *Entamoeba histolytica* and non-pathogenic *Entamoeba* spp. *Anal. Chim. Acta*. 2017; 966: 71–80. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.02.019>.
27. Mori Y., Nagamine K., Tomita N., Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 289(1): 150–4. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5921>.
28. 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>.
29. Karthik K., Rathore R., Thomas P., Arun T.R., Viswas K.N., Dhama K., et al. New closed tube loop mediated isothermal amplification assay for prevention of product cross-contamination. *MethodsX*. 2014; 1: 137–43. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2014.08.009>.
30. Tanner N.A., Zhang Y., Evans T.C. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *Biotechniques*. 2015; 58(2): 59–68. <https://doi.org/10.2144/000114253>.
31. Wastling S.L., Picozzi K., Kakembo A.S.L., Welburn S.C. LAMP for human African trypanosomiasis: a comparative study of detection formats. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2010; 4(11): e865. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000865>.
32. Iwamoto T., Sonobe T., Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(6): 2616–22. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.6.2616-2622.2003>.
33. Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat. Protoc.* 2008; 3(5): 877–82. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.57>.
34. Gandelman O.A., Church V.L., Moore C.A., Kiddle G., Carne C.A., Parmar S., et al. Novel bioluminescent quantitative detection of nucleic acid amplification in real-time. *PLoS One*. 2010; 5(11): e14155. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014155>.
35. Roy S., Wei S.X., Ying J.L.Z., Safavi M., Ahmed M.U. A novel, sensitive and label-free loop-mediated isothermal amplification detection method for nucleic acids using luminophore dyes. *Biosens. Bioelectron.* 2016; 86: 346–52. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2016.06.065>.
36. Chou P.H., Lin Y.C., Teng P.H., Chen C.L., Lee P.Y. Real-time target-specific detection of loop-mediated isothermal amplification for white spot syndrome virus using fluorescence energy transfer-based probes. *J. Virol. Methods*. 2011; 173(1): 67–74. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.01.009>.
37. Becherer L., Borst N., Bakheit M., Frischmann S., Zengerle R., von Stetten F. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – review and classification of methods for sequence-specific detection. *Anal. Methods*. 2020; 12(6): 717–46. <https://doi.org/10.1039/C9AY02246E>.
38. Nyan D.C., Swinson K.L. A novel multiplex isothermal amplification method for rapid detection and identification of viruses. *Sci. Rep.* 2015; 5: 17925. <https://doi.org/10.1038/srep17925>.
39. Liu W., Huang S., Liu N., Dong D., Yang Z., Tang Y., et al. Establishment of an accurate and fast detection method using molecular beacons in loop-mediated isothermal amplification assay. *Sci. Rep.* 2017; 7: 40125. <https://doi.org/10.1038/srep40125>.
40. Wang L., Yang C.J., Medley C.D., Benner S.A., Tan W. Locked nucleic acid molecular beacons. *J. Am. Chem. Soc.* 2005; 127(45): 15664–5. <https://doi.org/10.1021/ja052498g>.
41. Tani H., Teramura T., Adachi K., Tsuneda S., Kurata S., Nakamura K., et al. Technique for quantitative detection of specific DNA sequences using alternately binding quenching probe competitive assay combined with loop-mediated isothermal amplification. *Anal. Chem.* 2007; 79(15): 5608–13. <https://doi.org/10.1021/ac070041e>.
42. Nazarenko I., Pires R., Lowe B., Obaidy M., Rashtchian A. Effect of primary and secondary structure of oligodeoxyribonucleotides on

- the fluorescent properties of conjugated dyes. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30(9): 2089–195. <https://doi.org/10.1093/nar/30.9.2089>.
43. Gadkar V.J., Goldfarb D.M., Gantt S., Tilley P.A.G. 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. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23930-1>.
 44. Ayukawa Y., Hanyuda S., Fujita N., Komatsu K., Arie T. Novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay with a universal QProbe can detect SNPs determining races in plant pathogenic fungi. *Sci. Rep.* 2017; 7(1): 4253. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04084-y>.
 45. Zerilli F., Bonanno C., Shehi E., Amicarelli G., Adlerstein D., Makrigiorgos G.M. Methylation-specific loop-mediated isothermal amplification for detecting hypermethylated DNA in simplex and multiplex formats. *Clin. Chem.* 2010; 56(8): 1287–96. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.143545>.
 46. Kouguchi Y., Fujiwara T., Teramoto M., Kuramoto M. Homogeneous, real-time duplex loop-mediated isothermal amplification using a single fluorophore-labeled primer and an intercalator dye: Its application to the simultaneous detection of Shiga toxin genes 1 and 2 in Shiga toxigenic *Escherichia coli* isolates. *Mol. Cell Probes.* 2010; 24(4): 190–5. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2010.03.001>.
 47. Tanner N.A., Zhang Y., Evans T.C. Jr. Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification. *Biotechniques.* 2012; 53(2): 81–9. <https://doi.org/10.2144/0000113902>.
 48. Kubota R., Jenkins D.M. Real-time duplex applications of Loop-mediated AMplification (LAMP) by assimilating probes. *Int. J. Mol. Sci.* 2015; 16(3): 4786–99. <https://doi.org/10.3390/ijms16034786>.
 49. Jiang Y.S., Bhadra S., Li B., Wu Y.R., Milligan J.N., Ellington A.D. Robust strand exchange reactions for the sequence-specific, real-time detection of nucleic acid amplicons. *Anal. Chem.* 2015; 87: 3314–20. <https://doi.org/10.1021/ac504387c>.
 50. Kumar Y., Bansal S., Jaiswal P. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): A rapid and sensitive tool for quality assessment of meat products. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2017; 16(6): 1359–78. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12309>.
 51. Kidd M., Richter A., Best A., Mirza J., Percival B., Mayhew M., et al. S-variant SARS-CoV-2 is associated with significantly higher viral loads in samples tested by ThermoFisher TaqPath RT-QPCR. *medRxiv.* 2020; 2020.12.24.20248834. <https://doi.org/10.1101/2020.12.24.20248834>.
 52. Huang W.E., Lim B., Hsu C.C., Xiong D., Wu W., Yu Y., et al. RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. *Microb. Biotechnol.* 2020; 13(4): 950–61. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13586>.
 53. Park G.S., Ku K., Baek S.H., Kim S.J., Kim S.I., Kim B.T., et al. Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assays targeting Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *J. Mol. Diagn.* 2020; 22(6): 729–35. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.03.006>.
 54. Sun F., Ganguli A., Nguyen J., Brisbin R., Shanmugam K., Hirschberg D.L., et al. Smartphone-based multiplex 30-minute nucleic acid test of live virus from nasal swab extract. *Lab. Chip.* 2020; 20(9): 1621–7. <https://doi.org/10.1039/d0lc00304b>.
 55. 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>.
 56. Dao Thi V.L., Herbst K., Boerner K., Meurer M., Kremer L.P., Kirrmaier D., et al. A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. *Sci. Transl. Med.* 2020; 12(556): eabc7075. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abc7075>.
 57. Tian F., Liu C., Deng J., Han Z., Zhang L., Chen Q., et al. A fully automated centrifugal microfluidic system for sample-to-answer viral nucleic acid testing. *Sci. China Chem.* 2020; 1–9. <https://doi.org/10.1007/s11426-020-9800-6>.
 58. Ganguli A., Mostafa A., Berger J., Aydin M.Y., Sun F., de Ramirez S.A.S., et al. Rapid isothermal amplification and portable detection system for SARS-CoV-2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020; 117(37): 22727–35. <https://doi.org/10.1073/pnas.2014739117>.
 59. Rohaim M.A., Clayton E., Sahin I., Vilela J., Khalifa M.E., Al-Natour M.Q., et al. Artificial intelligence-assisted loop mediated isothermal amplification (AI-LAMP) for rapid detection of SARS-CoV-2. *Viruses.* 2020; 12(9): 972. <https://doi.org/10.3390/v12090972>.
 60. Xiong H., Ye X., Li Y., Wang L., Zhang J., Fang X., et al. Rapid differential diagnosis of seven human respiratory coronaviruses based on centrifugal microfluidic nucleic acid assay. *Anal. Chem.* 2020; 92(21): 14297–302. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c03364>.
 61. Mautner L., Baillie C.K., Herold H.M., Volkwein W., Guertler P., Eberle U., et al. Rapid point-of-care detection of SARS-CoV-2 using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Virol. J.* 2020; 17(1): 160. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01435-6>.
 62. Mohon A.N., Oberding L., Hundt J., van Marle G., Pabbaraju K., Berenger B.M., et al. Optimization and clinical validation of dual-target RT-LAMP for SARS-CoV-2. *J. Virol. Methods.* 2020; 286: 113972. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2020.113972>.
 63. Schermer B., Fabretti F., Damagnez M., Di Cristanziano V., Heger E., Arjune S., et al. Rapid SARS-CoV-2 testing in primary material based on a novel multiplex RT-LAMP assay. *PLoS One.* 2020; 15(11): e0238612. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0238612>.
 64. Varlamov D.A., Blagodatskikh K.A., Smirnova E.V., Kramarov V.M., Ignatov K.B. Combinations of PCR and isothermal amplification techniques are suitable for fast and sensitive detection of SARS-CoV-2 viral RNA. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020; 8: 604793. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.604793>.
 65. Lei Y. Kitchen range oven enabled one-tube RT-LAMP for RNA detection at home – A potential solution for large-scale screening of COVID-19. *enRxiv.* 2020. Preprint. <https://doi.org/10.31224/osf.io/ed85s>.