

УДК 616.98:579.852.11

**Изотермическая петлевая амплификация — перспективный метод массовой диагностики COVID-19**© 2020 Ю.А. МАКАРОВА<sup>1\*</sup>, К.А. ФОМИЧЕВА<sup>2</sup>, А.И. ОСИПЬЯНЦ<sup>2,3</sup>, М.Ю. ШКУРНИКОВ<sup>2</sup>, А.А. ПОКРЫШЕНКО<sup>1</sup>, Е.А. ТОНЕВИЦКИЙ<sup>4</sup>, В.И. ВЕЧОРКО<sup>5</sup><sup>1</sup> Факультет биологии и биотехнологии, Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», Москва, 101000<sup>2</sup> Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, Москва, 125284<sup>3</sup> Дальневосточный Федеральный Университет, Владивосток, 690091<sup>4</sup> Фонд развития инновационного научно-технологического центра «Долина Менделеева», Москва, 125480<sup>5</sup> Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница № 15 им. О.М. Филатова Департамента здравоохранения города Москвы», Москва, 111539

\*e-mail: jmakarova@hse.ru

Поступила в редакцию 21.09.2020 г.

Принята к публикации 25.09.2020 г.

Для ранней диагностики инфекционного заболевания COVID-19, вызванного вирусом SARS-CoV-2, чаще всего применяют ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией. Однако существует метод изотермической петлевой амплификации LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification), который превосходит ПЦР по скорости, а также по простоте исполнения, поскольку не требует дорогостоящего оборудования и квалифицированного персонала. Первые тест-системы для обнаружения SARS-CoV-2 на основе LAMP уже разработаны, однако доля тестов с его применением пока еще низка. Метод имеет большой потенциал для применения, обсуждаются технические и методические аспекты его широкого внедрения.

**Ключевые слова:** COVID-19, SARS-CoV-2, LAMP, изотермическая петлевая амплификация, коронавирус, диагностика.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2020-36-5-6-12

Вирус SARS-CoV-2 относится к роду *Betacoronavirus* семейства *Coronaviridae*. Представители этого семейства поражают главным образом млекопитающих [1]. К этому же роду относятся вызывавшие атипичную пневмонию и ближневосточный респираторный синдром вирусы SARS-CoV и MERS-CoV. Их геномы имеют соответственно ~79% и ~50% сходство с геномом SARS-CoV-2 [2]. Наибольшее сходство (~96%) SARS-CoV-2 имеет с геномом коронавируса летучих мышей RaTG13 [3]. Геном SARS-CoV-2 представлен одноцепочечной (+) РНК длиной ~29 800 нуклеотидов, содержащей 14 открытых рамок считывания, которые кодируют 27 белков [4].

Весь цикл размножения вируса проходит в цитоплазме, хотя ранее для бетакоронавирусов была продемонстрирована ядрышковая локализация белка нуклеокапсида N и показано, что он нарушает клеточное деление [5]. Недавно в составе белка N SARS-CoV-2 были обнаружены сигналы ядерной локализации [6]. Интересно, что для лечения COVID-19 предложено использовать антипаразитарный и противовирусный препарат ивермектин (ivermectin) [7], ингибирующий взаимодействие вирусных белков с импортином (IMP)  $\alpha/\beta 1$ , осуществляющим ядерный импорт. Добавление ивермектина к клеткам Vero-hSLAM через 2 ч после инфицирования SARS-CoV-2 через

Список сокращений: ПЦР — полимеразная цепная реакция; LAMP — loop-mediated isothermal amplification.

48 ч приводило к снижению количества вирусной РНК по сравнению с контролем в 5000 раз [8]. Возможно, ивермектин воздействует и на другие стадии взаимодействия SARS-CoV-2 с клеткой [9], однако весьма вероятно, что важные для успешного размножения фрагменты жизненного цикла SARS-CoV-2 связаны с ядром.

Вирус проникает в клетку за счет поверхностного структурного белка S (spike protein), который связывается с ангиотензинпревращающим ферментом 2 (angiotensin converting enzyme-2, ACE2) — пептидазой, расположенной на плазматической мембране клеток [3, 10]. Для проникновения также необходим процессинг белка S сериновыми протеазами: мембранно-связанной TMPRSS2 [11] и фурином, процессирующим неактивные про-белки [12]. Проникновение в клетку, вероятно, как и у других коронавирусов, осуществляется двумя способами: слиянием мембран у поверхности клетки и поглощением эндоцитозом с последующим выходом из эндосом [13, 14]. Похожим образом проникают в клетку не только вирусы, но и ряд белковых токсинов [15–17]. Наиболее высокий уровень экспрессии ACE-2 обнаружен в эпителии лёгких и в тонком кишечнике [18] (последнее согласуется с данными о том, что у ~ 10% больных COVID-19 наблюдается диарея, и SARS-CoV-2 обнаружен в фекальных пробах [19]). ACE-2 экспрессируется и в других органах и тканях, в частности, в эпителии носовой полости [20], в слизистой оболочке языка [21], бронхах [22] и в центральной нервной системе [23].

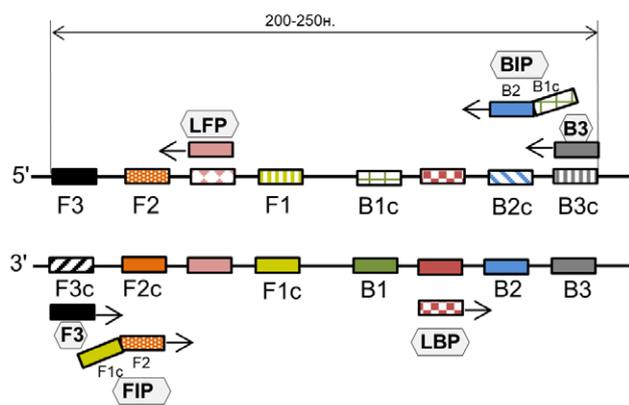
К настоящему времени в мире разработано большое количество тест-систем для обнаружения SARS-CoV-2, определяющих либо сам патоген, либо антитела к нему. Однако антитела появляются только ко второй неделе заболевания, поэтому главная роль в выявлении новых носителей инфекции принадлежит тестам, детектирующим наличие SARS-CoV-2. Большинство из них основано на ПЦР, совмещенной с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) — этот метод на сегодня является «золотым стандартом» диагностики COVID-19 по генетическому материалу вируса. Однако существуют и другие методы, в частности, основанные на изотермической амплификации нуклеиновых кислот, которые в текущих условиях, когда необходима быстрая и массовая диагностика, имеют существенные преимущества по сравнению с ОТ-ПЦР. Наиболее широко распространенный из этих методов получил название «изотермическая петлевая амплификация» (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) [24]. Этот метод быстрее ПЦР, для его

применения не нужен дорогостоящий амплификатор: достаточно обычного термостата. Для проведения реакции используют не *Taq*-полимеразу, а полученную из термофильной бактерии *Bacillus stearothermophilus* *Bst*-полимеразу. Это ДНК-полимераза I, способная к синтезу ДНК с вытеснением цепи. Поэтому стадия плавления, необходимая при ПЦР, в данном случае не нужна. Температурный оптимум фермента ~65 °С. Интенсивность образования продуктов настолько велика, что их можно детектировать уже через 10–20 мин после начала реакции [25, 26].

В отличие от ПЦР, в LAMP используют не два, а четыре праймера. В более поздней модификации используют шесть праймеров (рис. 1) [25]. Большое количество праймеров позволяет повысить специфичность реакции [24]. Предположим, вероятность ложноположительного взаимодействия праймера с идентичным заданному или очень похожим на него фрагментом геномной ДНК составляет  $p$ . Тогда для двух праймеров ПЦР эта вероятность —  $p^2$ . Учитывая, что праймеры должны расположиться в верном порядке, ее значение будет  $p^2/2$ . В аналогичном случае для LAMP нужно ложное срабатывание шести последовательностей, причем расположенных в единственно возможном порядке, т.е. вероятность этого события  $p^6/6! = p^6/720$ . Даже если  $p$  очень велика (близка к единице), различие в значениях  $p^2$  и  $p^6$  невелико, однако результирующие величины  $p^2/2$  и  $p^6/720$  отличаются очень сильно. Таким образом вероятность ложноположительного взаимодействия при использовании шести праймеров много ниже, чем двух.

Праймеры для LAMP устроены следующим образом: по краям ампликона, составляющего обычно ~200–250 н., расположены имеющие обычную длину (18–22 н.) внешние праймеры F3 (forward outer primer) и B3 (backward outer primer). Внутренние праймеры имеют стандартные названия FIP (forward inner primer) и BIP (backward inner primer). Они устроены сложнее и состоят из двух сегментов, каждый из которых соответствует участку целевой последовательности, причем эти участки отстоят друг от друга на 20–40 н. (рис. 1).

Праймеры подобраны таким образом, что в начале амплификации образуется шпильчатая структура, на основе которой затем формируются многочисленные конкатемеры, содержащие первоначальный ампликон (подробнее см. обзор [27]). Внешние праймеры нужны только для эффективного образования шпильчатой структуры, а дальнейшая ее амплификация происходит с участием праймеров FIP и BIP. Поэтому



**Рис.1.** Схема расположения праймеров для LAMP. F3 — forward outer primer; B3 — backward outer primer; FIP — forward inner primer; BIP — backward inner primer; LFP — loop forward primer, LBP — loop backward primer.

**Fig.1. LAMP primers.** F3 — forward outer primer; B3 — backward outer primer; FIP — forward inner primer; BIP — backward inner primer; LFP — loop forward primer, LBP — loop backward primer.

в реакционной смеси их концентрация в несколько раз выше. В результате выход продуктов реакции очень высок: количество ДНК в ходе реакции возрастает в  $\sim 10^9$  раз [24]. Выход продуктов был еще увеличен, когда была разработана модификация метода с использованием не 4, а 6 праймеров [25]. Два новых праймера получили название «петлевые»: loop forward primer (LFP) и loop backward primer (LBP). Они подбираются к участкам ампликона, расположенным между сегментами, комплементарными праймерам FIP и BIP (рис.1). При использовании шести праймеров продукты реакции можно детектировать уже через  $\sim 10$  мин после ее начала, что по скорости намного превосходит ПЦР [25, 26].

Подбор праймеров для LAMP представляет собой довольно трудоемкую задачу. Они должны удовлетворять тем же характеристикам, что и праймеры для ПЦР, причем особенно важным является отсутствие гомо- и гетеродимеров, т.к. они полностью ингибируют образование целевого продукта в ходе нематричной амплификации, давая ложноположительный результат [28]. Как правило, подбирают несколько комплектов и затем выбирают лучшие. Подбор праймеров вручную — трудоемкий процесс, поэтому в настоящее время разработаны программы, автоматизирующие решение этой задачи. Наиболее часто используемой программой является «Primer Explorer» (<https://primerexplorer.jp/e/>).

С помощью LAMP детектируют широкий спектр ДНК- и РНК-содержащих патогенов.

В последнем случае совмещают LAMP с обратной транскрипцией (RT) прямо в одной пробирке (RT-LAMP). RT-LAMP успешно применен для обнаружения РНК-содержащих вирусов [29]. Метод также нашел применение в онкологии для детекции микрометастазов в сторожевых лимфоузлах [30]. Мы протестировали его для детекции единичных опухолевых клеток рака предстательной железы в сторожевых лимфоузлах. Было показано, что по чувствительности и специфичности он не уступает существующим иммунохимическим методам, и при этом проще и быстрее них [31]. Это позволяет использовать RT-LAMP для интраоперационной диагностики, что может существенно улучшить качество терапии.

В настоящее время разработана модификация *Bst*-полимеразы (*Bst* 3.0), обладающая одновременно активностью ДНК-полимеразы I и обратной транскриптазы. Тем не менее, все еще продолжают широко использоваться как предыдущие варианты *Bst* в сочетании с обратной транскриптазой, так и новая *Bst* 3.0 в сочетании с обратной транскриптазой (например, [26, 32, 33]). Нами показана возможность применения *Bst* 3.0 в *in vitro*-системе детекции маркеров рака предстательной железы и без обратной транскриптазы [34]. Продукты реакции детектируются на 10 мин позже [34]. Это лишь незначительно удлиняет время реакции, однако позволяет упростить LAMP за счет использования меньшего числа ферментов.

Визуализация продуктов реакции может осуществляться по ряду признаков. В ходе реакции происходит накопление пирофосфата: он высвобождается при синтезе ДНК благодаря гидролизу нуклеозидтрифосфатов. Пирофосфат образует белый осадок с присутствующими в буфере ионами магния, так что в ходе реакции происходит помутнение раствора, которое может быть зафиксировано с помощью турбидиметра [35, 36]. Частым способом является добавление в реакцию флуоресцентных красителей, например, SYBR GREEN I, что позволяет с помощью прибора для ПЦР в реальном времени получать кривые амплификации. Разработан ряд методик для визуализации продуктов невооруженным глазом. Как правило, к реакционной смеси добавляют индикаторы, меняющие цвет в случае прохождения реакции. Для одних индикаторов (например, крезоловый красный или нейтральный красный) необходимо довести pH исходной реакционной смеси до определенного значения ( $\sim 8,8$ ). В ходе реакции pH снижается до  $\sim 6,0-6,5$ , что сопровождается изменением цвета индикатора [37]. Другие индикаторы не требуют специальной

подготовки реакционной смеси: например, гидронафтол синий или флуоресцентный краситель Quant-iT PicoGreen, изменение цвета которых также видно невооруженным глазом [38]. При использовании SYBR GREEN I пробирки освещают ультрафиолетовой лампой, что дает контрастное окрашивание положительных проб. В этом случае для детекции необходима только ультрафиолетовая лампа, которая может быть заменена светодиодом [39].

В условиях текущей пандемии COVID-19 LAMP вполне предсказуемо привлек к себе пристальное внимание. Хотя на стадии подбора праймеров метод более трудоемок по сравнению с ПЦР, на стадии диагностики он оказывается значительно проще. Уже разработаны наборы праймеров, созданы прототипы и зарегистрировано несколько тест-систем для детекции SARS-CoV-2 с помощью LAMP [26, 32, 40, 41], в том числе в России (<http://rspp.ru/events/news/perechen-test-sistem-dlya-vyyavleniya-koronavirusnoy-infektsii>). Достоинством LAMP является низкая чувствительность к примесям, присутствующим в пробах. Так, для проведения реакции достаточно просто добавить в реакционную смесь лизат ткани, крови или слизистых выделений из дыхательных путей (обычно 1–2 мкл в реакцию объемом 25 мкл)[30, 42, 43]. Хотя такой способ может иметь более низкую чувствительность по сравнению с использованием предварительно очищенной РНК (86% для детекции РНК SARS-CoV-2 с помощью взятия мазка из дыхательных путей) [43], он значительно сокращает время проведения и упрощает анализ, что весьма важно при массовой диагностике.

Аналитическую чувствительность метода (минимальное количество копий ампликона в пробе, которое может быть детектировано данным методом не менее чем в 95% всех проб), как правило, определяют с использованием искусственно синтезированных целевых фрагментов ДНК или РНК. Для ПЦР эта характеристика составляет 3 копии на реакцию [49], а для существующих ПЦР-тестов, детектирующих SARS-CoV-2, — от 10 до 50 копий на реакцию (например, тесты «ДНК-технологии» (10 копий на реакцию), «CerTest Biotec» (20 копий) и «R-Biopharm AG» (50 копий)).

По аналитической чувствительности LAMP может быть сопоставим с ПЦР и даже превосходить его [32, 44–48], однако чувствительность первого метода сильно зависит от эффективности работы праймеров [26, 32, 48]. При детекции SARS-CoV-2 определяется до 10 копий на реакцию (объемом 25 мкл), а при

использовании индикаторов для детекции невооруженным глазом чувствительность может снижаться (до 100 копий на реакцию [50]). При тестировании на клинических образцах эффективность LAMP оказалась сравнимой или чуть ниже чем у ПЦР [32, 33].

Все вышеизложенное указывает на перспективность использования технологии RT-LAMP для диагностики COVID-19.

## ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (МК-1906.2019.4).

## ЛИТЕРАТУРА

1. Woo P.C., Huang Y., Lau S.K., Yuen K.Y. Coronavirus genomics and bioinformatics analysis. *Viruses*. 2010, 2 (8), 1804-20. doi: 10.3390/v2081803
2. Lu R., Zhao X., Li J. et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. *Lancet*. 2020, 395 (10224), 565-574. doi: 10.1016/S0140-6736(20)30251-8
3. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020, 579 (7798), 270-273. doi: 10.1038/s41586-020-2012-7
4. Wu A., Peng Y., Huang B., et al. Genome Composition and Divergence of the Novel Coronavirus (2019-nCoV) Originating in China. *Cell Host Microbe*. 2020, 27 (3), 325-328. doi: 10.1016/j.chom.2020.02.001
5. Wurm T., Chen H., Hodgson T., et al. Localization to the nucleolus is a common feature of coronavirus nucleoproteins, and the protein may disrupt host cell division. *J Virol*. 2001, 75 (19), 9345-56. doi: 10.1128/JVI.75.19.9345-9356.2001
6. Gussow A.B., Auslander N., Faure G., et al. Genomic determinants of pathogenicity in SARS-CoV-2 and other human coronaviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2020, 117 (26), 15193-15199. doi: 10.1073/pnas.2008176117
7. Heidary F., Gharebaghi R. Ivermectin: a systematic review from antiviral effects to COVID-19 complementary regimen. *J Antibiot (Tokyo)*. 2020, 73 (9), 593-602. doi: 10.1038/s41429-020-0336-z
8. Cally L., Druce J.D., Catton M.G., et al. The FDA-approved drug ivermectin inhibits the replication of SARS-CoV-2 in vitro. *Antiviral Res*. 2020, 178 104787. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104787
9. Lehrer S., Rheinstein P.H. Ivermectin Docks to the SARS-CoV-2 Spike Receptor-binding Domain Attached to ACE2. *In Vivo*. 2020, 34 (5), 3023-3026. doi: 10.21873/invivo.12134

10. Letko M., Marzi A., Munster V. Functional assessment of cell entry and receptor usage for SARS-CoV-2 and other lineage B betacoronaviruses. *Nat Microbiol.* 2020, 5 (4), 562-569. doi: 10.1038/s41564-020-0688-y
11. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., et al. SARS-CoV-2 Cell Entry Depends on ACE2 and TMPRSS2 and Is Blocked by a Clinically Proven Protease Inhibitor. *Cell.* 2020, 181 (2), 271-280 e8. doi: 10.1016/j.cell.2020.02.052
12. Shang J., Wan Y., Luo C., et al. Cell entry mechanisms of SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020, 117 (21), 11727-11734. doi: 10.1073/pnas.2003138117
13. Millet J.K., Whittaker G.R. Physiological and molecular triggers for SARS-CoV membrane fusion and entry into host cells. *Virology.* 2018, 517 3-8. doi: 10.1016/j.virol.2017.12.015
14. Tang T., Bidon M., Jaimes J.A., et al. Coronavirus membrane fusion mechanism offers a potential target for antiviral development. *Antiviral Res.* 2020, 178 104792. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104792
15. Moisenovich M., Tonevitsky A., Maljuchenko N., et al. Endosomal ricin transport: involvement of Rab4- and Rab5-positive compartments. *Histochem Cell Biol.* 2004, 121 (6), 429-39. doi: 10.1007/s00418-004-0652-6
16. Moisenovic M., Tonevitsky A., Agapov I., et al. Differences in endocytosis and intracellular sorting of ricin and viscumin in 3T3 cells. *Eur J Cell Biol.* 2002, 81 (10), 529-38. doi: 10.1078/0171-9335-00263
17. Tonevitsky A.G., Agapov, I.I., Shamshiev A.T., et al. Immunotoxins containing A-chain of mistletoe lectin I are more active than immunotoxins with ricin A-chain. *FEBS Lett.* 1996, 392 (2), 166-8. doi: 10.1016/0014-5793(96)00803-4
18. Hamming I., Timens W., Bulthuis M.L., et al. Tissue distribution of ACE2 protein, the functional receptor for SARS coronavirus. A first step in understanding SARS pathogenesis. *J Pathol.* 2004, 203 (2), 631-7. doi: 10.1002/path.1570
19. Zhang H., Li H.B., Lyu J.R., et al. Specific ACE2 expression in small intestinal enterocytes may cause gastrointestinal symptoms and injury after 2019-nCoV infection. *Int J Infect Dis.* 2020, 96 19-24. doi: 10.1016/j.ijid.2020.04.027
20. Sungnak W., Huang N., Becavin C., et al. SARS-CoV-2 entry factors are highly expressed in nasal epithelial cells together with innate immune genes. *Nat Med.* 2020, 26 (5), 681-687. doi: 10.1038/s41591-020-0868-6
21. Xu H., Zhong L., Deng J., et al. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *Int J Oral Sci.* 2020, 12 (1), 8. doi: 10.1038/s41368-020-0074-x
22. Lukassen S., Chua R.L., Trefzer T., et al. SARS-CoV-2 receptor ACE2 and TMPRSS2 are primarily expressed in bronchial transient secretory cells. *EMBO J.* 2020, 39 (10), e105114. doi: 10.15252/embj.20105114
23. Baig A.M., Khaleeq A., Ali U., Syeda H. Evidence of the COVID-19 Virus Targeting the CNS: Tissue Distribution, Host-Virus Interaction, and Proposed Neurotropic Mechanisms. *ACS Chem Neurosci.* 2020, 11 (7), 995-998. doi: 10.1021/acscemneuro.0c00122
24. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000, 28 (12), E63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63
25. 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: 10.1006/mcpr.2002.0415.
26. Park G.S., Ku K., Baek S.H., 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), 729-735. doi: 10.1016/j.jmoldx.2020.03.006
27. Макарова Ю.А., Зотиков А.А., Белякова Г.А. и др. Изотермическая петлевая амплификация: эффективный метод экспресс-диагностики в онкологии. *Онкоурология.* 2018;14(2):88-99. doi 10.17650/1726-9776-2018-14-2-88-99
28. Wang D.G., Brewster J.D., Paul M., Tomasula P.M. Two methods for increased specificity and sensitivity in loop-mediated isothermal amplification. *Molecules.* 2015, 20 (4), 6048-59. doi: 10.3390/molecules20046048
29. Wong Y.P., Othman S., Lau Y.L., et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *J Appl Microbiol.* 2018, 124 (3), 626-643. doi: 10.1111/jam.13647
30. Tsujimoto M., Nakabayashi K., Yoshidome K., et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2007, 13 (16), 4807-16. doi; 10.1158/1078-0432.CCR-06-2512
31. М. Ю. Шкурников, А. А. Зотиков, М. М. Беляков и др. Применение петлевой изотермической амплификации ДНК для диагностики микрометастазов рака предстательной железы в лимфатические узлы. *Онкоурология.* 2017, 13(2), 63-66. doi 10.17650/1726-9776-2017-13-2-63-66
32. Ganguli A., Mostafa A., Berger J., et al. Rapid isothermal amplification and portable detection system for SARS-CoV-2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020. doi: 10.1073/pnas.2014739117
33. Lu R., Wu X., Wan Z., et al. Development of a Novel Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of SARS-CoV-2. *Virolog Sin.* 2020, 35 (3), 344-347. doi: 10.1007/s12250-020-00218-1
34. К.А. Фомичева, Ю.А. Макарова. Система in vitro для детекции маркеров рака предстательной железы методом LAMP. *Биотехнология.* 2020, 36(1), 3-6. doi: 10.21519/0234-2758-2020-36-1-3-6

35. Mori Y., Kitao M., Tomita N., Notomi T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J Biochem Biophys Methods*. 2004, 59 (2), 145-57. doi: 10.1016/j.jbbm.2003.12.005
36. 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. doi: 10.1006/bbrc.2001.5921
37. 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. doi: 10.2144/000114253
38. Wastling S.L., Picozzi K., Kakembo A.S., Welburn S.C. LAMP for human African trypanosomiasis: a comparative study of detection formats. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010, 4 (11), e865. doi: 10.1371/journal.pntd.0000865
39. Karthik K., Rathore R., Thomas P., et al. New closed tube loop mediated isothermal amplification assay for prevention of product cross-contamination. *MethodsX*. 2014, 1 137-43. doi: 10.1016/j.mex.2014.08.009
40. James A.S., Alawneh J.I. COVID-19 Infection Diagnosis: Potential Impact of Isothermal Amplification Technology to Reduce Community Transmission of SARS-CoV-2. *Diagnostics (Basel)*. 2020, 10 (6). doi: 10.3390/diagnostics10060399
41. Augustine R., Hasan A., Das S, et al. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP): A Rapid, Sensitive, Specific, and Cost-Effective Point-of-Care Test for Coronaviruses in the Context of COVID-19 Pandemic. *Biology (Basel)*. 2020, 9 (8). doi: 10.3390/biology9080182
42. Hayashida K., Kajino K., Hachaambwa L., et al. Direct blood dry LAMP: a rapid, stable, and easy diagnostic tool for Human African Trypanosomiasis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015, 9 (3), e0003578. doi: 10.1371/journal.pntd.0003578
43. Dao Thi V.L., Herbst K., Boerner K., 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). doi: 10.1126/scitranslmed.abc7075
44. Baek Y.H., Um J., Antigua K.J.C., et al. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification as a rapid early-detection method for novel SARS-CoV-2. *Emerg Microbes Infect*. 2020, 9 (1), 998-1007. doi: 10.1080/22221751.2020.1756698
45. Nliwasa M., MacPherson P., Chisala P., et al. The Sensitivity and Specificity of Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Tuberculosis Diagnosis in Adults with Chronic Cough in Malawi. *PLoS One*. 2016, 11 (5), e0155101. doi: 10.1371/journal.pone.0155101
46. Liu H., Li X.T., Hu B., et al. Development of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification for Rapid Detection of Batai Virus in Cattle and Mosquitoes. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2016, 16 (6), 415-22. doi: 10.1089/vbz.2015.1882
47. Dittrich S., Castonguay-Vanier J., Moore C.E., et al. Loop-mediated isothermal amplification for *Rickettsia typhi* (the causal agent of murine typhus): problems with diagnosis at the limit of detection. *J Clin Microbiol*. 2014, 52 (3), 832-8. doi: 10.1128/JCM.02786-13
48. Yan C., Cui J., Huang L., et al. Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Clin Microbiol Infect*. 2020, 26 (6), 773-779. doi: 10.1016/j.cmi.2020.04.001
49. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009, 55 (4), 611-22. doi: 10.1373/clinchem.2008.112797
50. Yu L., Wu S., Hao X., 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), 975-977. doi: 10.1093/clinchem/hvaa102

## Loop-mediated isothermal amplification holds great potential for massive COVID-19 diagnostics

J.A. MAKAROVA<sup>1\*</sup>, K.A. FOMICHEVA<sup>2</sup>, A.I. OSIPYANTS<sup>2,3</sup>, M.Y. SHKURNIKOV<sup>2</sup>, A.A. POKRYSCHENKO<sup>1</sup>, E.A. TONEVITSKY<sup>4</sup> and V.I. VECHORKO<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Faculty of Biology and Biotechnology, National Research University Higher School of Economics, Moscow, 101000, Russia

<sup>2</sup> P. Hertsen Moscow Oncology Research Institute, National Center of Medical Radiological Research, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 125284, Russia

<sup>3</sup> Far Eastern Federal University Vladivostok, 690091, Russia

<sup>4</sup> Development Fund of the Innovation Science and Technology Center "Mendeleev Valley", Moscow, 125480, Russia

<sup>5</sup> City Clinical Hospital No.15 named after O.M. Filatov, Department of Health of Moscow, Moscow, 111539, Russia

Received September 21, 2020

Accepted September 25, 2020

**Abstract**—Real-time RT-PCR currently remains most popular for early COVID-19 diagnostics. However Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method outperform real-time RT-PCR in rapidity and simplicity because it doesn't require expensive laboratory equipment and trained personnel. LAMP-based diagnostic kits for COVID-19 testing are already exist, but LAMP-based tests are not yet widely adopted. The method has great potential for mass application. Here we discuss technical and methodological aspects of its widespread implementation.

*Key words:* COVID-19, SARS-CoV-2, LAMP, loop-mediated isothermal amplification, diagnostics, coronavirus.

**Funding**—This work was supported by a grant from the President of the Russian Federation for state support of young Russian scientists — candidates of sciences (МК-1906.2019.4).

**doi:** 10.21519/0234-2758-2020-36-5-6-12