
**ПРИБОРОСТРОЕНИЕ
ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКОЙ БИОЛОГИИ**

УДК 577.2.08

© А. Н. Зубик, Г. Е. Рудницкая, А. А. Евстрапов, 2021

**ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ ПЕТЛЕВАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ LAMP
В ФОРМАТЕ МИКРОУСТРОЙСТВ (ОБЗОР)**

Изотермическая петлевая амплификация (LAMP) широко применяется в качестве быстрого и чувствительного метода диагностики и наиболее перспективна для проведения анализа в условиях ограниченных времени и ресурсов, например в местах оказания медицинской помощи. В работе рассмотрены основные принципы работы LAMP, способы детектирования продуктов реакции, а также микрофлюидные устройства и аналитические системы на основе LAMP, в том числе разработанные для экспресс-диагностики в условиях пандемии COVID-19.

Кл. сл.: микрофлюидные устройства, изотермическая петлевая амплификация, LAMP, COVID-19, point-of-care (POC)

ВВЕДЕНИЕ

Методы амплификации нуклеиновых кислот являются важным инструментом, позволяющим значительно повысить чувствительность молекулярно-генетического анализа. Наиболее популярной технологией амплификации на сегодняшний день является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Амплификация на основе ПЦР требует сложного оборудования для высокоточного (± 0.5 °C) и быстрого (> 10 °C/с) термоциклирования, что не во всех случаях подходит для повседневной клинической практики или диагностики в условиях ограниченных ресурсов. Кроме того, относительно высокие температуры (до ~ 100 °C) требуют хорошей герметизации реакционного объема для предотвращения испарения.

В течение двух последних десятилетий быстро развивались методы изотермической амплификации. Важное различие между ПЦР и изотермической амплификацией — температурные режимы проведения реакции. Технологии изотермической амплификации нуклеиновых кислот работают при одной оптимальной температуре, что приводит к более простым, дешевым и надежным техническим решениям для конструкций приборов. Изотермические методы амплификации нуклеиновых кислот становятся альтернативой ПЦР и значительно упрощают реализацию методов амплификации в медицинских диагностических приборах и аналитическом оборудовании.

Изотермическая амплификация ДНК / РНК, обеспечивающая сравнимую или даже более высокую чувствительность и специфичность, чем традиционная ПЦР, представляет перспективное

направление в развитии методов экспресс-обнаружения возбудителей инфекционных заболеваний: в продуктах питания; в воде, воздухе и почве; для диагностики у постели больного и др.

**ТЕХНОЛОГИЯ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ
ПЕТЛЕВОЙ АМПЛИФИКАЦИИ
(LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL
AMPLIFICATION, LAMP)**

Изотермическая амплификация, использующая ферменты с высокой активностью смещения цепи и протекающая с образованием петлевых структур ДНК, — это простой, быстрый, эффективный и перспективный метод амплификации нуклеиновых кислот. Метод петлевой амплификации (LAMP — loop-mediated isothermal amplification) был разработан в компании Eiken Chemical Co., Ltd (Япония) Tsugunori Notomi и его коллегами в 2000 г. [1].

В методе LAMP используют ДНК-полимеразы с цепь-вытесняющей активностью и четыре (или шесть) праймера, что повышает специфичность реакции. Конечный продукт данной реакции представляет собой специфические структуры, состоящие из нескольких повторяющихся инвертированных последовательностей оригинальной ДНК-мишени, соединенных петлями одноцепочечной ДНК. Метод обеспечивает высокую эффективность амплификации ДНК, количество которой увеличивается в 10^9 – 10^{10} раз за 15–60 мин. При совмещении с обратной транскрипцией за счет добавления обратной транскриптазы в реакционную смесь метод LAMP подходит и для амплификации РНК.

К преимуществам петлевой изотермической амплификации относятся простота, скорость, специфичность и чувствительность, экономическая эффективность, высокая производительность. Кроме того:

- нет необходимости в шаге (этапе) денатурации двухцепочечных форм в одноцепочечные;
- реакция амплификации происходит непрерывно в изотермических условиях;
- производительность амплификации чрезвычайно высока;
- общая стоимость может быть снижена, т.к. для проведения LAMP не требуется специальных реактивов и сложного оборудования;
- амплифицировать можно и РНК-мишени по той же процедуре, как и для ДНК-мишеней, просто путем добавления в пробирку обратной транскриптазы AMV. Обратную транскрипцию и амплификацию можно выполнить при постоянной температуре в одну стадию.

Для проведения данной реакции используется фермент Bst-полимераза, которая является большой субъединицей ДНК-полимеразы *Bacillus stearothermophilus*. Оптимальная температура для данного фермента 60–65 °С.

Bst 2.0 ДНК-полимераза является разработанным *in silico* гомологом большого фрагмента ДНК-полимеразы I *Bacillus stearothermophilus* (Bst ДНК-полимераза, большой фрагмент). Этот фермент обладает 5'→3' ДНК-полимеразной активностью и хорошей способностью к замещению цепей ДНК, но не проявляет 5'→3' экзонуклеазной активности. Для Bst 2.0 ДНК-полимеразы характерны повышенная скорость амплификации, высокий выход продукта, повышенная толерантность к содержанию солей и большая термостабильность по сравнению с большим фрагментом Bst ДНК-полимеразы дикого типа.

Bst 3.0 ДНК-полимераза — это последняя новинка для проведения изотермической амплифи-

кации, измененный *in silico* гомолог большого фрагмента ДНК-полимеразы I, выделенной из *Bacillus stearothermophilus*, который был модифицирован для улучшения качеств при проведении реакции изотермической амплификации и улучшения активности такого фермента, как обратной транскриптазы. Bst 3.0 обладает 5'→3' ДНК-полимеразной активностью, используя в качестве матрицы как ДНК, так и РНК, и также может сама расплетать цепи нуклеиновых кислот. В то же время фермент не обладает 5'→3' и 3'→5' экзонуклеазной активностью. Bst 3.0 демонстрирует надежное проведение реакции и характеризуется значительно увеличенной активностью как обратной транскриптазы по сравнению с Bst ДНК-полимеразой.

SD-полимераза [2] — новая искусственная термостабильная ДНК-полимераза с высокой активностью смещения цепи, которая подходит как для ПЦР, так и для изотермической амплификации. В отличие от ферментов дикого типа с высокой активностью смещения цепи, которые активны только ниже 68 °С (например, Bst-полимераза), SD-полимераза стабильна до 93–94 °С. Это позволяет проводить изотермическую амплификацию LAMP с предварительным прогревом для увеличения специфичности реакции. SD-полимераза сочетает в себе такие особенности, как (5'→3')-полимеразная активность, (5'→3')-активность смещения цепи, а также фермент не имеет какой-либо экзонуклеазной активности [3].

В методе LAMP используется набор из 4 (или 6) специально подобранных праймеров для распознавания 6 различных специфических участков анализируемой последовательности ДНК, фланкирующих целевую матрицу: участки F3с, F2с и F1с на 3'-конце, а участки B1, B2 и B3 на 5'-конце (рис. 1). Прямой внутренний праймер FIP (Forward Inner Primer) содержит на 3'-конце участок F2, а на 5'-конце участок F1с. Прямой внешний праймер F3

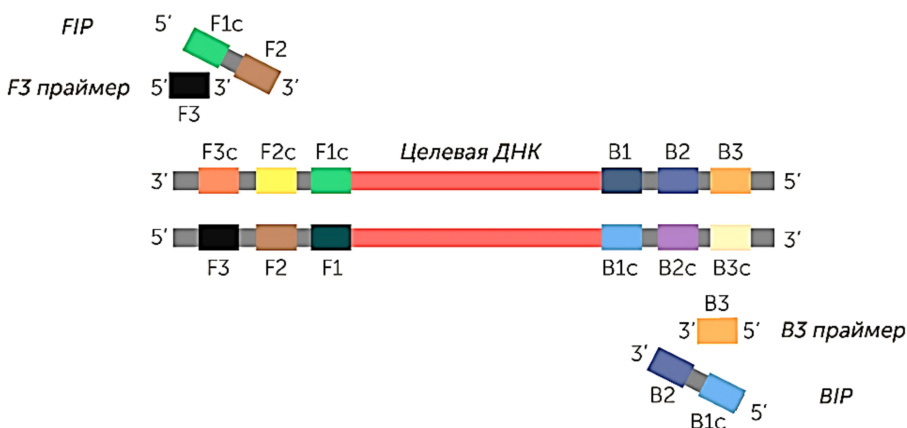


Рис. 1. Набор праймеров для проведения LAMP и ДНК-мишень [4]

(Forward Outer Primer) содержит участок F3, который комплементарен участку F3c. Обратный внутренний праймер VIP (Backward Inner Primer) содержит на 3'-конце участок B2, а на 5'-конце участок B1c. Обратный внешний праймер B3 (Backward Outer Primer) содержит участок B3, который комплементарен участку B3c. Внешние праймеры F3 и B3 необходимы для инициации реакции и участвуют только на начальном этапе.

Внутренние праймеры FIP и VIP имеют сложную структуру. Каждый из них состоит из двух специфических участков, соединенных несмысловым линкером (обычно используют полиимин). Внутренние праймеры участвуют в образовании петлевых структур, поэтому подобраны таким образом, чтобы сформировать петли на концах целевого фрагмента.

Для успешного проведения LAMP очень важен правильный дизайн праймеров. Компания Eiken (Япония) создала интернет-сервис Primer Explorer (LAMP primer designing software: <http://primerexplorer.jp/e/>), с помощью которого можно провести конструирование праймеров на основе известной последовательности нуклеотидов.

LAMP-амплификация — это самоподдерживающаяся реакция автоциклируемого синтеза ДНК, катализируемая ферментом ДНК-полимеразой с высокой активностью смещения цепи, проходящая при постоянной температуре 60–65 °С (рис. 2). При такой температуре одно- и двухцепочечная формы ДНК находятся в динамическом равновесии, поэтому для инициации реакции не требуется нагрев до полной денатурации [5].

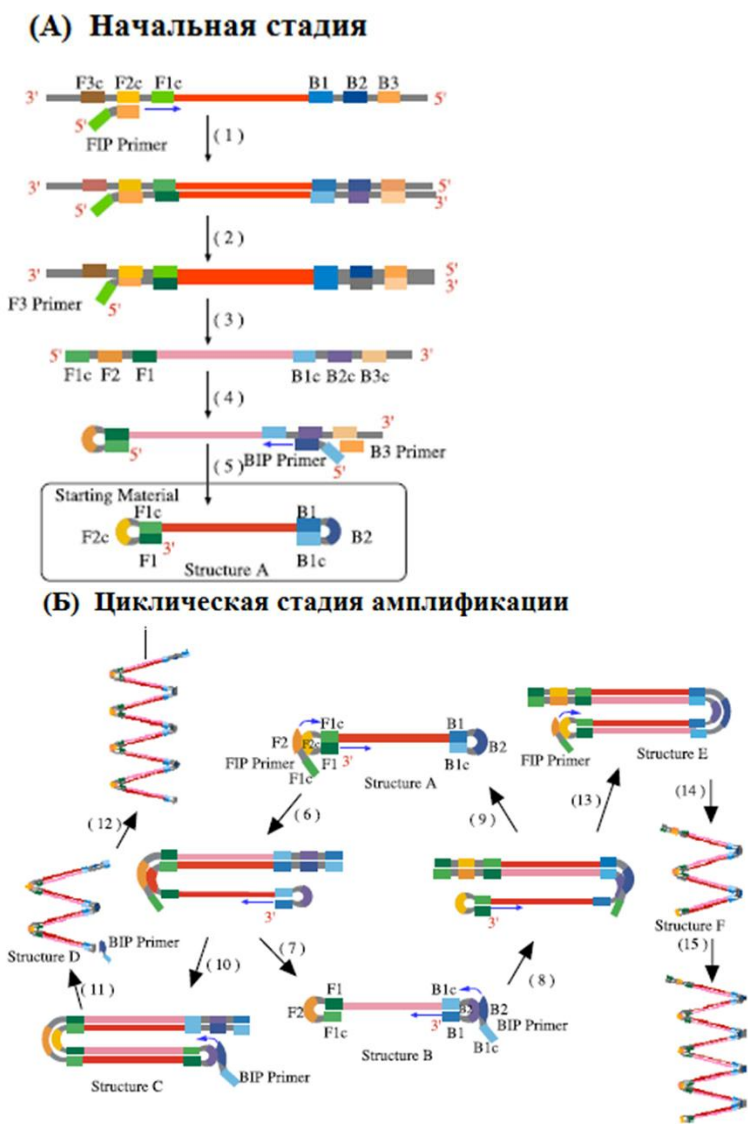


Рис. 2. Принцип реакции LAMP [6]

Реакция начинается с отжига одного из внутренних праймеров VIP или FIP, который связывается с матрицей лишь частично, только соответствующим участком (B2 или F2), и инициирует синтез комплементарной цепи с помощью ДНК-полимеразы. Внешний праймер, например F3, присоединяется к F3c-фрагменту мишени, и полимеразы достраивает цепь, при этом смещая только что синтезированную последовательность. Смещенная цепь формирует петлеобразные структуры на 5'-конце, так называемые структуры стебель-петля, т.к. F1c-участок гибридизируется с участком F1. Процесс повторяется и на противоположном 3'-конце. В итоге получается новая, похожая на гантель, структура с петлями на обоих концах.

Далее следует стадия циклической амплификации, инициированная одним из внутренних праймеров, комплементарных участку петли на продукте. Внешние праймеры на данном этапе не участвуют. Циклический этап заключается в образо-

вании большого количества продуктов со сложной структурой. Конечный продукт реакции представляет собой набор амплифицированных последовательностей ДНК различной длины, состоящих из попеременно инвертированных повторов целевого фрагмента на той же цепи.

Чтобы добиться ускорения реакции, авторы LAMP уже через два года усовершенствовали разработанный метод с помощью добавления еще одной пары праймеров — петлевых праймеров [7]. Петлевые праймеры (Loop Primer B и Loop Primer F) гибридизируются с петлевыми структурами и инициируют синтез ДНК со смещением цепи. Петлевые праймеры содержат последовательности, комплементарные к одноцепочечным участкам петель (между B1 и B2 или между F1 и F2) на 5'-конце гантелеобразной структуры, обеспечивая увеличение количества стартовых точек для начала синтеза ДНК. Пример показан на рис. 3, где происходит синтез продукта, содержащего шесть петель.

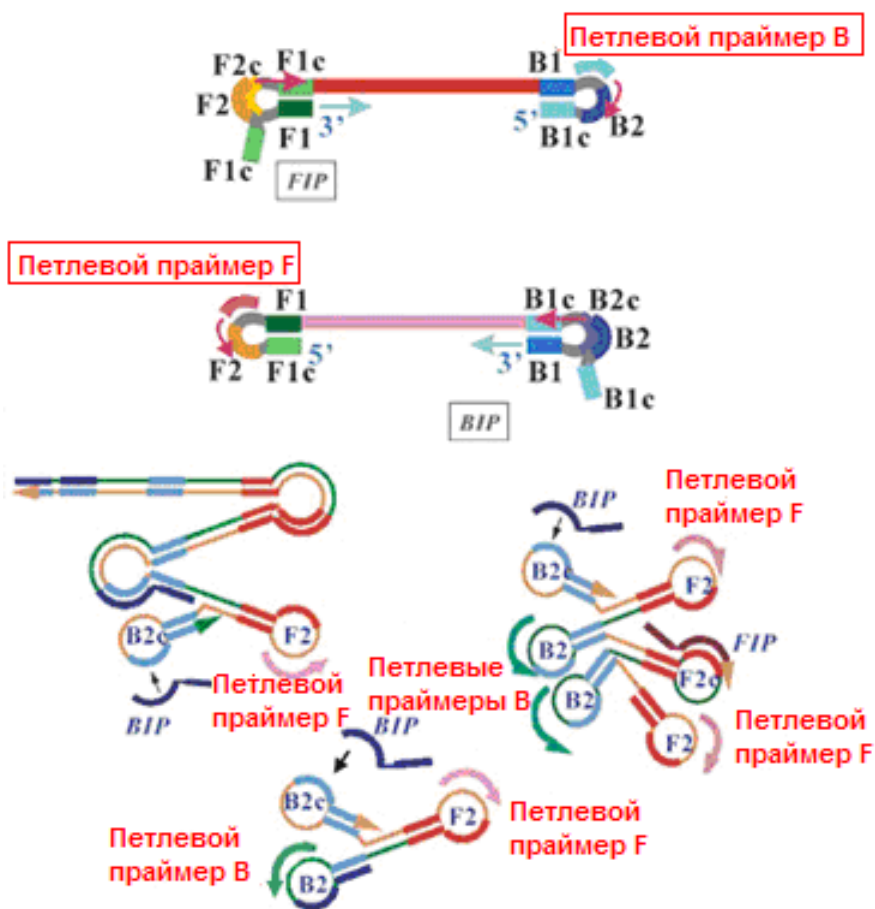


Рис. 3. Амплификация LAMP с использованием петлевых праймеров [8]

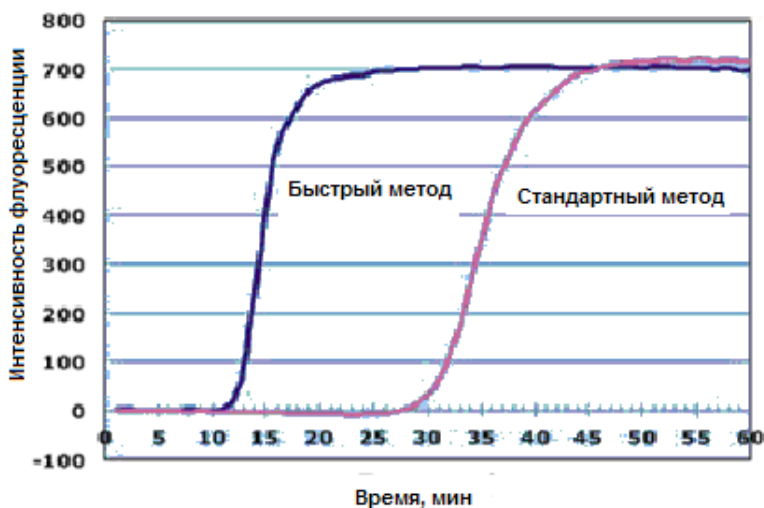


Рис. 4. Сравнение эффективности LAMP с добавлением петлевых праймеров (быстрый метод) с классической LAMP (стандартный метод) [8]

В оригинальной методике LAMP четыре из этих петель не будут использоваться, но с помощью петлевых праймеров все одноцепочечные петли могут быть использованы в качестве стартовых точек для синтеза ДНК. Конечными продуктами реакции являются, кроме амплифицированных целевых последовательностей в виде инвертированных повторов, разнообразные побочные продукты с разветвленной вторичной структурой (структура похожа на цветную капусту).

Следует подчеркнуть, что петлевые праймеры не являются обязательными компонентами реакции, однако их использование позволяет сократить время проведения анализа. Они повышают количество продуктов амплификации, взаимодействуя с петлевыми структурами на участках, отличных от сайтов связывания внутренних праймеров, и поэтому ускоряют достижение детектируемого

уровня ДНК в реакционной смеси в 1.5–2 раза по сравнению с оригинальным методом [7]. Как показывает график (рис. 4), уже через 10–20 мин возможна регистрация продукта в достаточном количестве.

Продукты амплификации LAMP могут быть обнаружены как в режиме реального времени, так и по конечной точке с помощью гель-электрофореза, турбидиметрии, флуориметрии и фотометрии или просто невооруженным глазом. Достижение эффективного генетического анализа с помощью LAMP зависит не только от эффективности самой амплификации ДНК, но также от метода, выбранного для детектирования продуктов реакции. В работе [9] авторы обсуждают основные методы мониторинга для LAMP. В табл. 1 представлены способы детектирования и приведены их сравнительные характеристики.

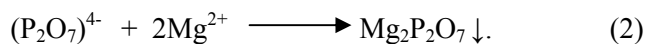
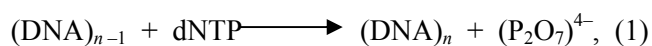
Табл. 1. Сравнительные характеристики методов детектирования для LAMP [9]

Метод детектирования	Принцип	Преимущества	Недостатки	Качественный / количественный	Ответ	Продолжительность
Невооруженным глазом (белый осадок)	Осадок пирофосфата магния	Простота, отсутствие загрязнений	Субъективные ошибки, средняя чувствительность	Качественный	По конечной точке	0
Невооруженным глазом, красители ДНК	Флуоресцентный краситель (добавление после реакции)	Простота, высокая чувствительность	Возможность перекрестного загрязнения	Качественный	По конечной точке	~2 мин

Продолжение табл. 1.

Метод детектирования	Принцип	Преимущества	Недостатки	Качественный / количественный	Ответ	Продолжительность
Невооруженным глазом (колориметрия)	Колориметрические индикаторы (добавление до реакции)	Простота, отсутствие загрязнений, относительно высокая чувствительность	Возможное ингибирование амплификации	Качественный	По конечной точке / real time	0
Электрофорез	Электрофоретическое разделение в геле, окрашивание ДНК красителями	Определение длины ампликонов, высокая чувствительность	Трудоемкий процесс после амплификации, риск заражения	Качественный	По конечной точке	~1 ч
Мутность в реальном времени	Осадок пирофосфата магния	Автоматизация, отсутствие возможности загрязнения, без использования зондов или индикаторов	Требование однородности	Количественный	В реальном времени	0
Флуоресценция в реальном времени	Флуоресцентный краситель связан с ампликоном	Автоматизация, быстрый ответ, отсутствие возможности загрязнения	Возможное ингибирование амплификации	Количественный	В реальном времени	0

В ходе реакции синтеза ДНК образуется большое количество пирофосфат-ионов $(P_2O_7)^{4-}$ в качестве побочного продукта. Было отмечено, что пирофосфат образует заметный нерастворимый белый осадок с ионами двухвалентных металлов [10]:



Уравнение (1) описывает реакцию полимеризации ДНК, опосредованную *Vst*-полимеразой в методе LAMP. Когда вырабатывается большое количество пирофосфат-ионов, они реагируют с ионами магния в реакционном буфере (уравнение (2)) с получением белого осадка $Mg_2P_2O_7 \downarrow$ [11, 12]. Наличие или отсутствие белого осадка позволяет провести оценку проведения амплификации ДНК методом LAMP визуально, невооруженным глазом (рис. 5). Сообщалось, что увеличение (возраста-



Рис. 5. Детектирование реакции LAMP по мутности. Слева — без мишени (отрицательный контроль); справа — с ДНК-мишенью (положительная реакция) [13]

ние) мутности в реакционном растворе пропорционально количеству амплифицированных продуктов [12].

Турбидиметрический метод в реальном времени позволяет количественно определять исходное количество ДНК-мишени в исследуемых образцах. Побочными продуктами ферментативного синтеза ДНК, кроме ионов пирофосфата, являются ионы водорода. На детектировании протонов как побочных продуктов синтеза цепей ДНК основаны технологии секвенирования на платформах Ion Torrent [14–16]. Модификация подобного pH-датчика была использована для контроля амплификации ДНК с помощью методов LAMP и ПЦР [17]. Проведенные исследования продемонстрировали способность ДНК-полимеразы эффективно выполнять реакцию амплификации даже в слабо буферных растворах.

Авторы работы [18] использовали это свойство фермента для проведения LAMP-реакций в присутствии низких концентраций буфера и наблюдали значительное изменение pH реакционной смеси от исходного щелочного значения до конечного кислотного. Такое значительное изменение pH сделало возможным детектирование с помощью pH-чувствительных индикаторов. В работе показано, что визуальное детектирование по изменению цвета при обнаружении ДНК методом LAMP является простым в использовании, быстрым и надежным способом.

В работе [18] продемонстрирована чувствительность реакции LAMP при использовании кислотно-основных индикаторов (табл. 2): фенолового красного, крезолового красного, нейтрального красного и м-крезолового пурпурового, — при обнаружении количества геномной ДНК в диапазоне 0.01–100.00 нг (~3–30 000 копий) по гену трансмембранного регулятора проводимости (ген *CFTR*).

Таким образом, колориметрическая визуализация реакции амплификации с помощью pH-индикаторов может способствовать использованию метода амплификации в качестве диагностического инструмента, позволяющего проводить полевую диагностику с быстрым и надежным визуальным обнаружением.

К преимуществу визуального способа детектирования по конечной точке можно отнести отсутствие инструментальных затрат. Однако Т.Н. Ле и соавторы [19] показали, что трудно определить чувствительность и вариабельность (отличие) между пробирками невооруженным глазом при освещении солнечным светом. Кроме того, замутненность положительных проб стабильна в течение только короткого времени, что означает, что контроль должен осуществляться как можно скорее после завершения реакции [20]. S.L. Wastling отмечает, что для успешного проведения визуального мониторинга ДНК необходим "тренированный глаз" [21].

Визуальное обнаружение ДНК методом LAMP-амплификации может быть выполнено при использовании флуоресцентного металлоиндикатора — кальцеина. Кальцеин (CAS № 1461-15-0) — это металлоиндикатор, который дает сильную флуоресценцию за счет формирования комплексов с ионами двухвалентных металлов, таких как кальций и магний. В работе [22] кальцеин добавили в исходную реакционную смесь для мониторинга концентрации ионов магния в растворе при амплификации LAMP. Концентрация ионов магния в растворе уменьшается из-за связывания с образующимися в ходе реакции синтеза ДНК пирофосфатами и выпадением нерастворимого осадка. Однако снижение концентрации ионов магния

Табл. 2. Кислотно-основные индикаторы

Индикатор	Диапазон pH	Окраска реакционного раствора	
		Отрицательный результат	Положительный результат
Феноловый красный	6.8–8.4	Красная	Желтая
Крезоловый красный	7.2–8.8	Пурпурно-красная	Янтарно-желтая
Нейтральный красный	6.8–8.4	Янтарно-желтая	Красная
М-крезоловый пурпуровый	7.4–9	Пурпуровая	Желтая

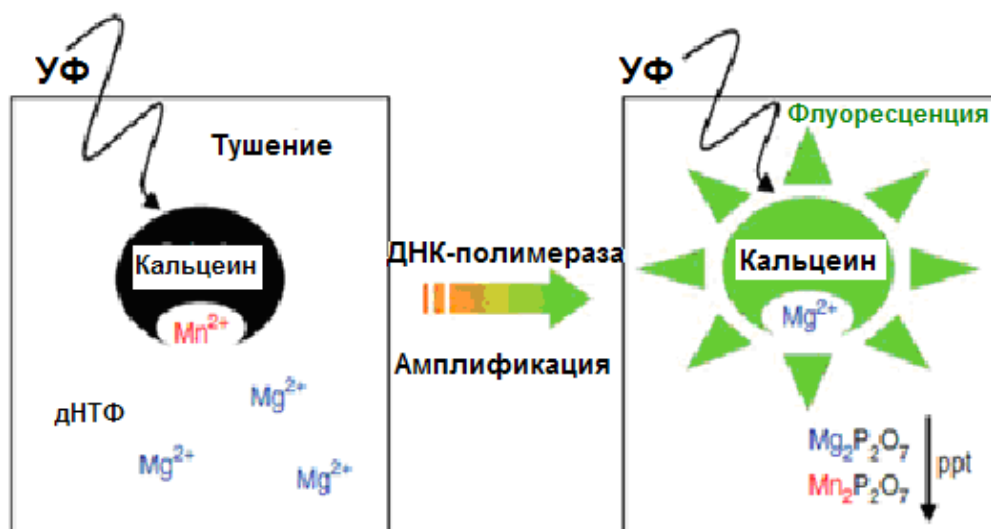


Рис. 6. Принцип детектирования с помощью флуоресцентного металлоиндикатора — кальцеина [22]

за счет проведения LAMP-реакции не было достаточным, чтобы изменение цвета обеспечивало бы визуальное обнаружение. Поэтому в исходную реакционную смесь были введены ионы марганца, которые гасят флуоресценцию кальцеина за счет комплексообразования и образуют нерастворимые соли с пирофосфатами в ходе реакции (рис. 6).

В этом случае кальцеин в реакционной смеси изначально связывается с ионами марганца (Mn^{2+}), при этом флуоресценция гасится. Когда выполняется реакция амплификации, кальцеин лишается ионов марганца из-за связывания последних с генерируемыми ионами пирофосфата ($P_2O_7^{4-}$), что приводит к флуоресценции. А свободный кальцеин способен связываться с ионом магния (Mg^{2+}) в реакционной смеси, что приводит к усилению флуоресценции. Наличие флуоресценции указывает на присутствие ДНК-мишени, и, следовательно, визуальное обнаружение может быть достигнуто.

Установлено, что интенсивность флуоресценции пропорциональна начальной концентрации ДНК-мишени в реакциях LAMP. Флуоресценция кальцеиновых комплексов также может использоваться для мониторинга реакций LAMP в реальном времени.

Другим красителем с аналогичным действием является гидроксинафтоловый синий (HNB, CAS № 63451-35-4), который окрашивает раствор в фиолетовый цвет в присутствии Mg^{2+} . В процессе амплификации образуется значительное количество нерастворимого пирофосфата магния, что вызывает значительное уменьшение концентрации Mg^{2+} в растворе. Это уменьшение концентрации

приводит к изменению цвета реакционного раствора в присутствии HNB от фиолетового до небесно-голубого [23]. Небесно-голубой цвет пробы означает наличие в ней ДНК-мишени, тогда как фиолетовый цвет наблюдается у отрицательного контроля.

S.L. Wastling и соавторы [21] сообщили, что гидроксинафтоловый синий не ингибирует реакцию LAMP. Он широко используется для мониторинга реакции LAMP в одностадийных методах [21, 23, 24]. Преимущество такого подхода заключается в возможности проведения анализа в микротитровальной пластине и количественной оценке результатов колориметрическим методом с помощью ридера.

HNB изменяет цвет реакционного раствора от фиолетового до голубого. Однако изменение цвета было незначительным, потому что два цвета относятся к одному и тому же тону. Это затрудняет обнаружение изменений невооруженным глазом, особенно когда образцы содержат только небольшое количество ДНК-мишеней. В работе [25] предложен более простой для визуального детектирования результатов LAMP колориметрический анализ с использованием другого металлоиндикатора — кислотного хромового синего К. Цвет реакции изменяется с красного на синий, т.к. Mg^{2+} связывается с $P_2O_7^{4-}$ и комплекс осаждается в ходе реакции, при этом уменьшается концентрация магния в растворе.

Колориметрическое обнаружение продуктов LAMP-амплификации может быть получено с помощью Эриохромового Черного Т (ЕВТ) — ком-

плексонометрического индикатора [26]. Действительно, снижение концентрации Mg^{2+} в ходе LAMP-реакции за счет комплексообразования с ЕВТ приводит к изменению цвета, которое видно невооруженным глазом. После амплификации целевой последовательности ДНК исходный пурпурный цвет реакционной смеси LAMP меняется на голубой.

Основным недостатком технологии LAMP является использование косвенных методов детектирования (например, электрофорез, осаждение, турбидиметрический метод, неспецифические красители: SYBR Green I, краситель гидроксинафтоловый синий, краситель кальцеин / Mn^{2+}), которые не могут различать целевые продукты и продукты неспецифической амплификации, что часто приводит к ложноположительным результатам. В работе [27] разработан метод прямого обнаружения. Используется меченый флуорофором петлевой зонд, который не флуоресцирует в свободном несвязанном состоянии, а флуоресцирует только тогда, когда он связан со своей мишенью (ампликоном). Это называется флуоресценцией петлевого праймера при проведении LAMP (FLOS-LAMP). Метод позволяет детектировать LAMP-ампликоны, специфичные для целевой по-

следовательности. Концепция FLOS-LAMP была подтверждена для быстрого обнаружения патогена человека — вируса ветряной оспы, в клинических образцах. FLOS-LAMP имел предел обнаружения 500 копий мишени с клинической чувствительностью и специфичностью 96.8 % и 100 % соответственно. Высокий уровень специфичности является большим достижением и устраняет один из основных недостатков технологии LAMP — ложноположительные результаты.

В работе [28] проведен сравнительный анализ метода изотермической амплификации LAMP и широко используемых методов стандартной ПЦР и ПЦР в реальном времени. Метод петлевой изотермической амплификации LAMP обладает высокой чувствительностью и эффективностью, имеет больше преимуществ, чем недостатков, по сравнению с ПЦР. Авторы делают вывод, что LAMP представляет собой простой, быстрый и высокоэффективный метод с превосходной специфичностью и может быть широко применен в клинической диагностике, мониторинге окружающей среды, оценке качества пищевых продуктов и здоровья человека. Эти данные приведены в табл. 3.

Табл. 3. Сравнение преимуществ и недостатков LAMP-амплификации и широко используемых методов на основе ПЦР [28]

Свойства	LAMP	ПЦР	ПЦР-РВ
Преимущества	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Нет потребности в дорогостоящем термоциклере, т.к. реакция выполняется в изотермических условиях ◆ Легко выполняется в полевых условиях с использованием недорогой водяной бани или нагревательного блока ◆ Высоко специфичная и эффективная амплификация благодаря использованию петлевых праймеров ◆ Менее трудоемкая, может закончиться в течение часа ◆ Измерение в реальном времени и количественное измерение с использованием недорогого прибора 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Широко используемый молекулярный инструмент ◆ Легкий способ предварительного подтверждения 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Мониторинг хода реакции в режиме реального времени ◆ Количественный метод амплификации последовательности мишеней ◆ Использование герметичных пробирок минимизирует загрязнение ◆ Повышенная чувствительность благодаря добавлению флуоресцентного красителя в реакцию ◆ Высоконадежный анализ, полученный в результате работы с программным управлением

Продолжение табл. 3.

Свойства	LAMP	ПЦР	ПЦР-РВ
Преимущества	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Подтверждение успеха реакции визуальным наблюдением невооруженным глазом по мутности или изменению цвета по конечной точке с использованием флуоресцентных красителей, таких как SYBR Green I или кальцеин ◆ Менее чувствительна к ингибирующим веществам, присутствующим в биологических образцах 		
Недостатки	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Чувствительность к ложноположительным результатам из-за переноса или перекрестного загрязнения ◆ Сложный дизайн праймеров, требующий программного обеспечения ◆ Требование двух длинных праймеров высшей степени чистоты ◆ Проблемы с доступностью реагентов по всему миру 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Более затратный по времени способ (> 3 ч) ◆ Требуются системы термоциклирования и гель-документирования ◆ Качественная техника, указывающая положительный или отрицательный результат ◆ Более высокая вероятность контаминации после реакции 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Дорогостоящие оборудование и реагенты ◆ Необходимость в флуоресцентных зондах ◆ Вреямемкий (2 ч)

При использовании метода LAMP основная сложность заключается в конструировании праймеров. Но метод более специфичен, потому что необходимо распознавать целых шесть участков в искомой молекуле ДНК, а в ПЦР — только два. Кроме того, на LAMP не оказывает влияния присутствие биологических компонентов, зачастую не позволяющих провести ПЦР, т.е. LAMP менее подвержена действию ингибиторов.

УСТРОЙСТВА ДЛЯ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ ПЕТЛЕВОЙ АМПЛИФИКАЦИИ

Микрофлюидные устройства обладают многими привлекательными характеристиками, такими как высокая производительность, быстрый анализ и низкое потребление реагентов. Выбрав изотермическую амплификацию LAMP вместо ПЦР, можно значительно снизить энергопотребление устройств для анализа нуклеиновых кислот за счет исключения техники термоциклирования. Благодаря своей превосходной производительности LAMP более подходит для миниатюризации, чем

традиционная ПЦР. Достижения и разработки в технологии LAMP предполагают ее использование в качестве полезного диагностического инструмента в микрофлюидных устройствах и портативных приборах point-of-care diagnostic tool (POC), работающих на месте оказания медицинской помощи и в условиях ограниченных ресурсов. Интеграция технологии LAMP в микрофлюидные устройства показала большой потенциал для молекулярно-биологической диагностики: снижение затрат, общего времени анализа и влияния потенциальных источников загрязнения [29].

Одна из первых работ по проведению петлевой изотермической реакции в микрочипе датируется 2004 г. — исследователи объединили на полимерном микрочипе LAMP и электрофорез [5]. Позднее в 2007 г. в работе [30] был представлен микрочип из полиметилметакрилата (ПММА) с реакционной камерой объемом 25 мкл. Реакцию LAMP проводили за 60 мин при 65 °С с применением внешнего нагревателя. Для количественной регистрации в режиме реального времени использовали миниспектрометр.

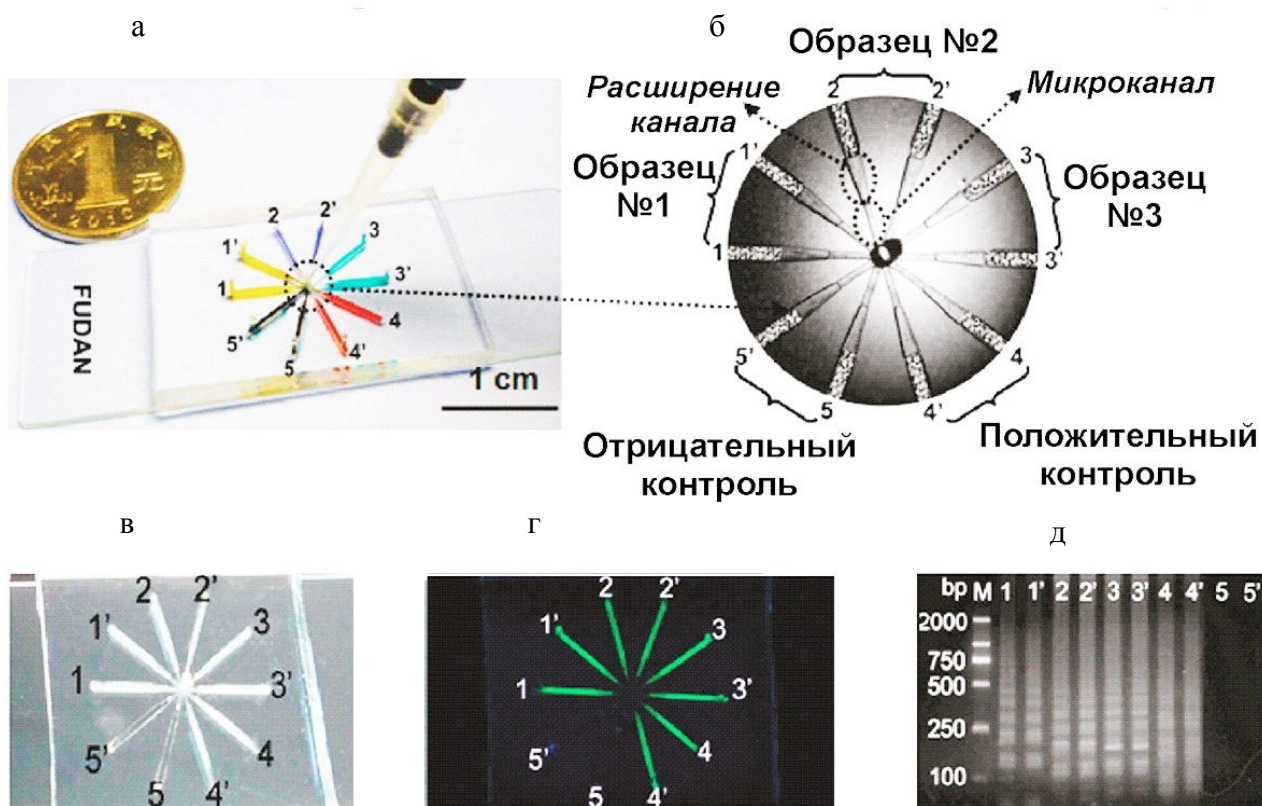


Рис. 7. Похожий на осьминога микрочип для LAMP с одновременной амплификацией фрагментов разных нуклеиновых кислот.

а — изображение микрочипа.

б — схема микроструктур: в камерах 1/1', 2/2' и 3/3' находятся высушенные праймеры для гриппа подтипа А, сезонного гриппа А (H1N1) и гриппа А (H1N1) пандемии 2009 г. соответственно; в камерах 4/4' содержится праймеры β-актина человека, который применялся в качестве положительного контроля; камеры 5/5' использовались в качестве отрицательного контроля.

в — визуальная оценка результата по белой мутности от образования пирофосфата магния.

г — детектирование результата по сигналу флуоресценции от интеркалирующего красителя SYBR Green I.

д — подтверждение результатов анализа методом электрофореза в агарозном геле, в котором наблюдается характерный ступенчатый рисунок продукта LAMP [31]

Для одновременной амплификации нескольких фрагментов нуклеиновых кислот в работе [31] использовали иммобилизованные праймеры. Микрочип представлял собой диск из полидиметилсилоксана (ПДМС), в котором от центра к краям были сформированы 10 реакционных камер-каналов (рис. 7). Предварительно в микроканалы через внешние отверстия были введены растворы праймеров, которые затем высушивали. При введении готовой смеси для LAMP (50 мкл) в центральную загрузочную камеру, жидкость под действием капиллярных сил заполняла все каналы. Затем все отверстия герметизировали неотвержденным ПДМС для предотвращения испарения и загрязнения. Амплификацию проводили при

63 °С, для нагрева использовали водяную баню. Регистрацию продуктов реакции осуществляли по конечной точке (образование пирофосфата в каналах наблюдали невооруженным глазом), а также в режиме реального времени — изменение оптической плотности количественно оценивали с применением оптоволоконна и цифрового датчика. Амплификация 10 фг/мкл ДНК-мишени с положительным и отрицательным контролями была выполнена менее чем за 1 ч.

Устройство для количественного обнаружения ДНК-мишени в реальном времени было разработано авторами [32]. В качестве основы использовались стандартные диски (CD, DVD), в которых формировали массив микрореакторов для LAMP.

Диск для LAMP состоял из трех слоев: 1) подложки из модифицированного оптического диска (компакт-диск, цифровой универсальный диск или диск Blu-Ray), 2) двухстороннего чувствительного к давлению адгезива, 3) ацетатной пленки для герметизации системы. Так как исходная поликарбонатная поверхность диска обладала гидрофобными свойствами, необходимо было обеспечить гидрофильность поверхности. Для этого были протестированы различные методы модификации поверхности: обработка поверхностно-активными веществами, кислотой и щелочью, а также УФ-облучение, плазменная обработка. Плазменная обработка в кислородной среде была признана наиболее эффективной, т.к. позволила уменьшить краевой угол до 20° . Детектирование осуществлялось при циклическом сканировании поверхности диска с помощью стандартного CD/DVD-привода и было основано на изменении интенсивности сигнала от лазерного привода из-за наличия мутности или изменения цвета растворов в микрореакторах.

Также для проведения LAMP применяются микрочипы, в которых управление движением жидкости осуществляется центробежными устройствами. Такие устройства, называемые "лаборатория на диске" (Lab-on-CD), за счет микроструктур (сеть каналов, камер, клапанов и др.) специальной формы, размеров и свойств поверхности рабочих каналов и камер позволяют осуществлять автоматическую транспортировку, дозирование и смешивание реагентов при изменении скорости вращения диска, тем самым устраняя

потребность во внешних насосах.

Например, центробежное микрофлюидное устройство (диаметром 12 см) для одновременного проведения амплификации 25 образцов было представлено S.J. Oh и соавторами [26]. Устройство предназначалось для обнаружения нескольких пищевых патогенов методом LAMP с возможностью дозирования и смешивания различных компонентов реакционной смеси с помощью коммерческой центрифуги, а также визуального детектирования результатов. Основные жидкие компоненты для LAMP (реакционная смесь, праймеры и проба) вводили отдельно в специальные отверстия на микрочипе. Жидкость под действием капиллярных сил заполняла подводящие каналы, которые были соединены с основным каналом за счет узкого соединительного микроканала (рис. 8). При вращении микрочипа центробежные силы заставляли жидкость преодолевать микроканалы и перетекать через основной канал в реакционную камеру. Размер соединительных каналов задавался таким образом, чтобы для преодоления гидравлического сопротивления для каждого следующего компонента требовалось увеличить частоту вращения диска примерно в 2 раза. В частности, сечение соединительного канала (ширина \times глубина) для реакционной смеси было 500×250 мкм, для праймеров — 250×125 мкм, для пробы — 100×125 мкм. Согласно расчетам, частота вращения для "включения" таких микроканалов составляла 522, 808 и 1739 об./мин, что соответствовало 500, 1000 и 2000 об./мин на практике.

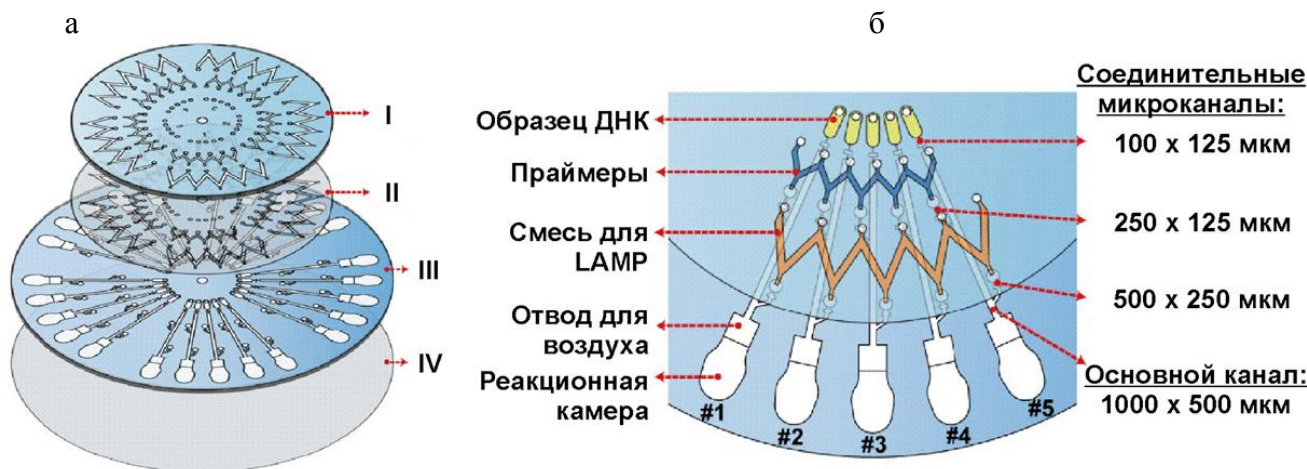


Рис. 8. Центробежное микрофлюидное устройство для обнаружения пищевых патогенов.

а — послойное изображение центробежного устройства: I — диск из поликарбоната (толщиной 1 мм) с подводящими каналами, II — адгезивный слой (30 мкм), III — диск поликарбоната (1 мм) с резервуарами для реагентов, основным и соединительными каналами и реакционными камерами, IV — однослойная адгезивная пленка;

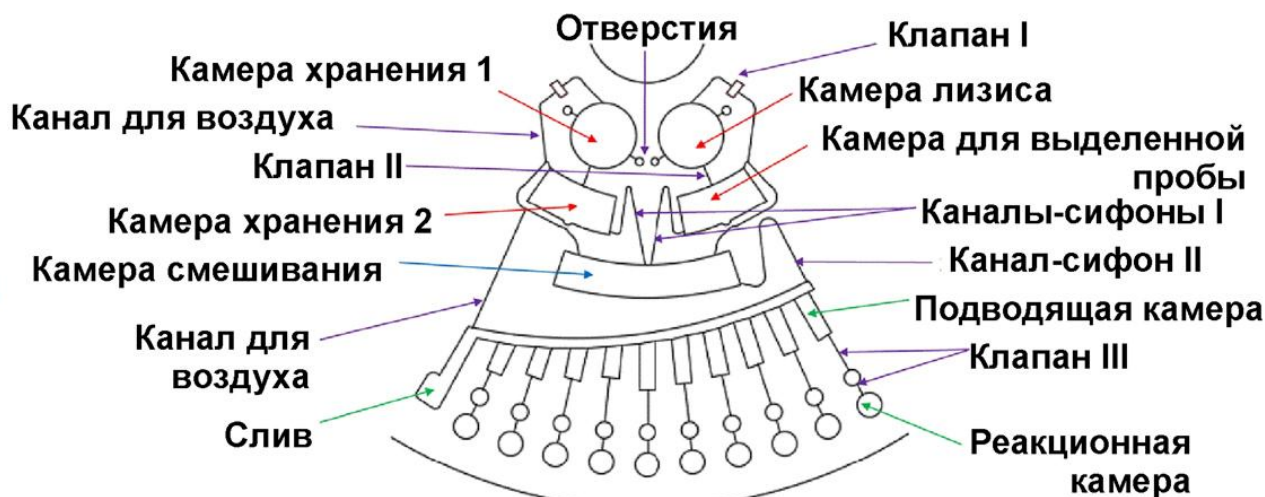
б — схематичное изображение одного блока микроструктур [26]

После сбора всех трех растворов в реакционных камерах проводилось смешивание реагентов при кратковременных вращениях микрочипа. Затем входные отверстия герметизировали с помощью специального скотча, и микрочип нагревали до 65 °С. Визуальное детектирование проводили с использованием индикатора Эриохромовый Черный Т (ЕВТ), который после амплификации менял первоначальный пурпурный цвет жидкости на небесно-голубой. Спектры поглощения жидкости также анализировали с помощью традиционного спектрофотометра. При апробации устройства чувствительность составила 380 копий фрагментов ДНК кишечной палочки (*E. coli*), а продолжительность анализа не превышала 60 мин.

Проведение пробоподготовки на микрочипе ак-

туально для создания портативных микроаналитических систем, ориентированных на применение в условиях ограниченных ресурсов. В работе [33] представлено центробежное микрофлюидное устройство (радиусом 6 см) для мультиплексной амплификации с целью обнаружения бактерий. Лизис клеток, смешивание пробы с реагентами и изотермическая амплификация были реализованы на диске из полиметилметакрилата, на котором фрезерованием были выполнены два или четыре набора идентичных микроструктур (рис. 9, а) с десятью реакционными камерами в каждой. В дополнение к центробежной силе для управления жидкостью использовались гидрофобные каналы-клапаны, каналы-сифоны и каналы для отвода воздуха.

а



б

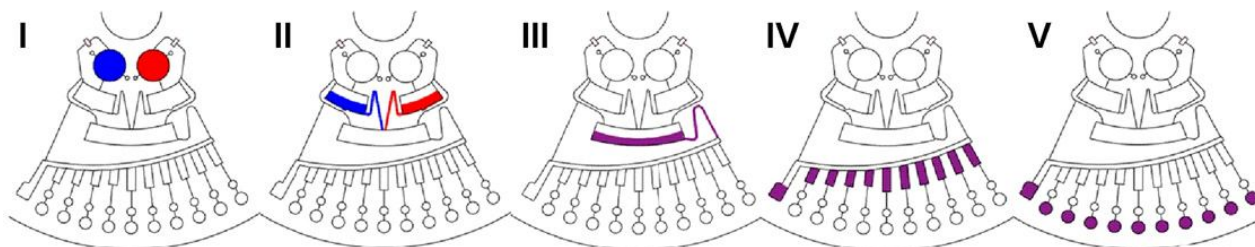


Рис. 9. Схема одного сектора центробежного микрочипа для обнаружения бактерий (а) и иллюстрация последовательных этапов анализа (б).

На (б): I — предварительный ввод пробы с лизатом в камеру для лизиса, а реакционной смеси для LAMP — в камеру для хранения; II — под действием центробежных сил жидкость переходит в следующие камеры (для выделенной пробы и реагентов LAMP соответственно) и затем заполняет каналы-сифоны; III — смешивание пробы с реакционной смесью для LAMP в специальной камере; IV — разделение пробы на аликвоты по числу реакционных камер; V — заполнение реакционных камер, чип готов к изотермической амплификации [33]

Как только центробежные силы (создаваемые при вращении) превышали уровень капиллярных сил, жидкость начинала перемещаться по гидрофобным каналам-клапанам. Для обработки поверхности таких каналов использовалась перфторуглеродная жидкость EGC-1700 (3 M, Китай). Каналы в форме сифона заполнялись 2 % спиртовым раствором Tween 20. После выпаривания этанола Tween 20 адсорбировался на поверхности каналов, делая каналы-сифоны гидрофильными. Когда скорость вращения понижалась до определенного значения, каналы заполнялись под действием капиллярных сил. Для циркуляции воздуха в микрочипе используются отводящие каналы, поскольку чип полностью герметизируется перед анализом.

Перед анализом в лунку с реакционной камерой загружались праймеры, которые высушивались при комнатной температуре. Затем в камеру для лизиса помещали шарики из диоксида циркония (диаметром ~100 мкм) и магнитный брусок (длиной 7 мм). Диск с подготовленными микроструктурами герметизировали пленкой с использованием адгезивов (PSA, Adhesive Research, Китай). Пробу (60 мкл) и смесь для LAMP (60 мкл) вводили через отверстия, расположенные на обратной стороне чипа, которые также заклеивали с использованием адгезивного скотча. Затем чип помещали над магнитами и проводили лизис клеток в течение 3 мин. Вращающиеся магниты приводили в движение магнитный брусок, который перемешивал шарики из диоксида циркония. Шарики, сталкиваясь с бактериями, разрушали их.

На рис. 9, б, приведена схема движения потоков жидкости в микрочипе под действием вращения. После стадии лизиса клеток при частоте вращения 3000 об./мин жидкости преодолевали гидрофобные клапаны и перемещались: раствор ДНК — в камеру для выделенной пробы и смесь LAMP — в камеру хранения 2. Затем скорость вращения уменьшалась, чтобы жидкость могла под действием капиллярных сил заполнить канал-сифон. Во время этой стадии клеточный "мусор", остающийся в лизате, осаждался и отфильтровывался. Таким образом, в отличие от химических методов, не проводилась стадия очистки ДНК или стадия концентрирования. Поэтому предварительно была проведена внечиповая пробоподготовка образца для очистки от белков и других примесей. Позднее исследователи оптимизировали топологию микрочипа, упразднив первую камеру для хранения реакционной смеси [34].

Для успешной амплификации LAMP необходимо обеспечить однородное смешивание реакционной смеси с выделенной пробой. Наилучшее перемешивание достигается при V-образном по-

ложении каналов-сифонов, когда при вращении диска траектории движения растворов пересекаются, и они перемешиваются. Также указано, что для улучшения перемешивания можно использовать кратковременную смену направления вращения диска. После смешивания пробы и реагентов для LAMP смесь должна заполнить реакционные камеры. Объем каждой реакционной камеры составлял 10 мкл. Чтобы предотвратить перекрестное загрязнение во время заполнения реакционных камер, в конструкции микрочипа предусмотрено устройство предварительного распределения жидкости, в котором аликвоты смеси распределялись по десяти подводящим карманам при 1000 об./мин (рис. 9, б, — IV). Затем при увеличении скорости центрифугирования до 4000 об./мин через каналы-клапаны смесь поступала в реакционные камеры, где она растворяла праймеры. На этом этапе раствор реагентов полностью готов для проведения реакции. После завершения программы вращения осуществлялся нагрев до 65 °С для инициирования и выполнения амплификации. Продолжительность LAMP в экспериментах составляла 60 мин, а время, необходимое для завершения всего анализа, — приблизительно 70 мин. Результаты анализа могли быть зарегистрированы с использованием флуоресцентного детектора или невооруженным глазом.

Интересным представляется применение тест-полосок для визуального обнаружения ампликонов при генетическом анализе. Это простой и быстрый способ детектирования продуктов амплификации, не требующий специальной квалификации персонала и детектирующих устройств. Впервые использование тест-полосок для регистрации продуктов LAMP продемонстрировали в 2008 г. на примере обнаружения вируса, вызывающего синдром Таура у креветок [35]. Принцип детектирования показан на рис. 10, а. Изначально один из внутренних праймеров FIP был помечен биотином. Продукт реакции, в котором после амплификации оказывается биотин, смешивали с мечеными FITC ДНК-зондами. Зонды комплементарно гибридизировались с ампликонами в течение нескольких минут. Гибридизированные ампликоны добавляли в раствор, содержащий золотые частицы, меченные антителами к FITC, и в образовавшуюся смесь окунали тест-полоску LFS (Milenia Biotec, Германия). Антитела с золотыми частицами связывались с продуктом реакции, окрашивая ампликоны. Раствор за счет капиллярных сил распространялся по LFS. Биотиновым концом ампликоны осаждались в анализируемой области (на слой стрептавидина), тем самым формируя полосу темно-красного цвета, сохраняющуюся 15 мин при комнатной температуре. Результаты считались

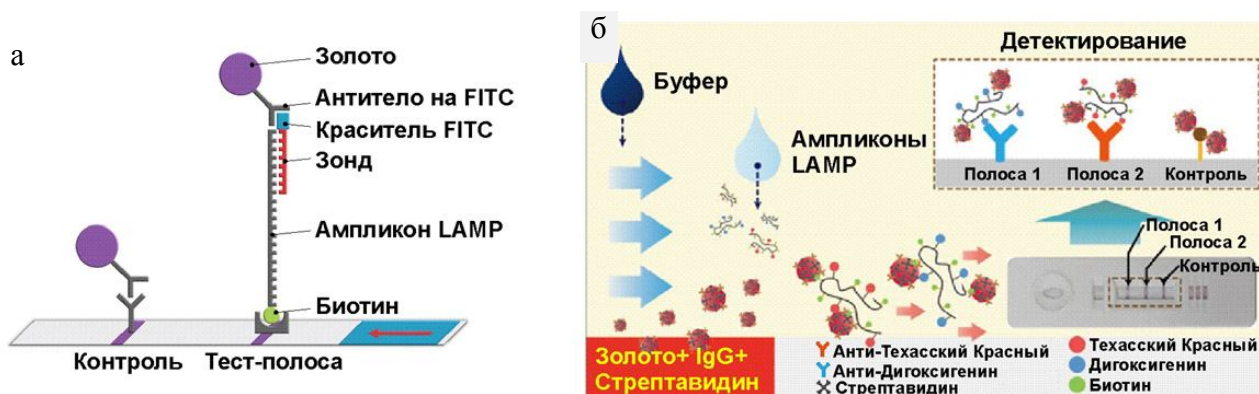


Рис. 10. Детектирование продуктов реакции LAMP на тест-полоске.

а — общий принцип работы HybriDetect (Milenia Biotec, Германия) [36].

б — мультиплексный анализ для определения типа вируса гриппа А. После реакции ампликоны содержат специфичные зонды с антигенами и биотин, встроенный в двухцепочечную ДНК. Наночастицы золота, покрытые стрептавидином и мышинным IgG, связываются с ампликонами. На тест-полоске расположены антитела на дигоксигенин, на Техасский Красный и контроль, которые связываются с соответствующими антигенами [37]

положительными, если были видны две полосы (контрольная и тестовая), и отрицательными, если была видна только одна контрольная полоса.

В 2015 г. было предложено центробежное микрофлюидное устройство для обнаружения и подтверждения типа гриппа А методом LAMP и обратной транскрипции со встроенной тест-полоской для визуального детектирования [38]. Диск диаметром 7 см состоял из слоев поликарбоната, в которых были изготовлены трехмерные структуры с высушенными праймерами. Микрочип позволял в автоматическом режиме разделять по трем реакционным камерам вводимую смесь пробы и реагентов (общим объемом 7 мкл), проводить LAMP с обратной транскрипцией и смачивать тест-полоску, одновременно смешивая полученный раствор с буфером, содержащим зонды и золотые частицы. Особенностью работы было одновременное детектирование двух генов — Н1 и консервативного М, для которых использовали разные комплексы антиген – антитело при формировании полос (рис. 10, б). Так, праймеры LF и LB для фрагмента гена Н1 были мечены гаптенем с Техасским Красным, а праймер LF для гена М поместили дигоксигенином. Следовательно, на тест-полоске первая полоса была покрыта моноклональными антителами на дигоксигенин, а вторая — антителами на Техасский Красный. Третья контрольная полоса содержала антимышинные IgG. При этом золотые наночастицы были модифицированы стрептавидином и мышинными иммуноглобулинами IgG, а в растворе для LAMP содержался свободный биотин, который по мере амплификации встраивался в двухцепочечный про-

дукт по принципу интеркаляции [37]. На микрочипе удалось различить подтип вируса гриппа А при концентрации 10 копий вирусных РНК за 55 мин.

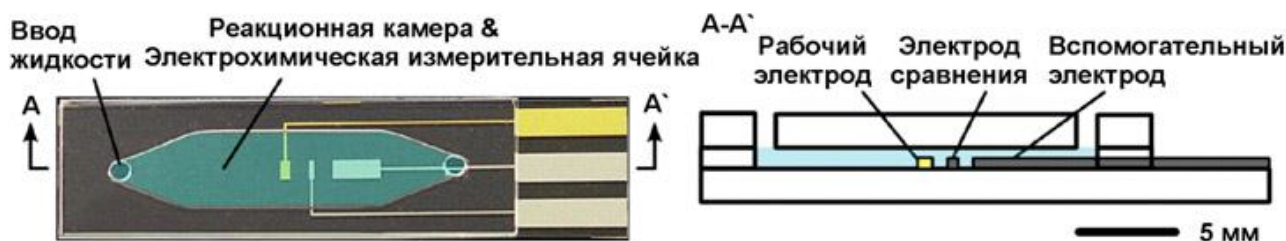
Регистрация продуктов LAMP с помощью одноразовых тест-полосок — это многообещающий подход при разработке диагностических систем экспресс-анализа. За счет того, что зонд комплементарен ампликону, такие тесты обеспечивают дополнительную специфичность, а сочетание простой реализации с визуальным детектированием делает тест-полоски привлекательными для работы в условиях ограниченных ресурсов. Объединение этого метода с автономными микрофлюидными системами устраняет риск перекрестного загрязнения, обеспечивает непрерывность и высокую скорость анализа. Однако использование тест-полосок для регистрации продуктов амплификации ограничено исключительно качественным анализом, что связано с низкой точностью детектирования. На результат влияют различные условия освещения и вариации в цветовом восприятии пользователей. Для достижения количественного анализа необходимо использовать специальные устройства для детектирования полос и цветовые датчики для регистрации интенсивности цвета с последующим использованием программного обеспечения для обработки и анализа изображений [39].

Электрохимические датчики также перспективны для создания быстрых, чувствительных, миниатюрных и недорогих диагностических систем. Микрочип для LAMP со встроенным электрохимическим датчиком был представлен в работе [40]. Реакция LAMP осуществляется внутри

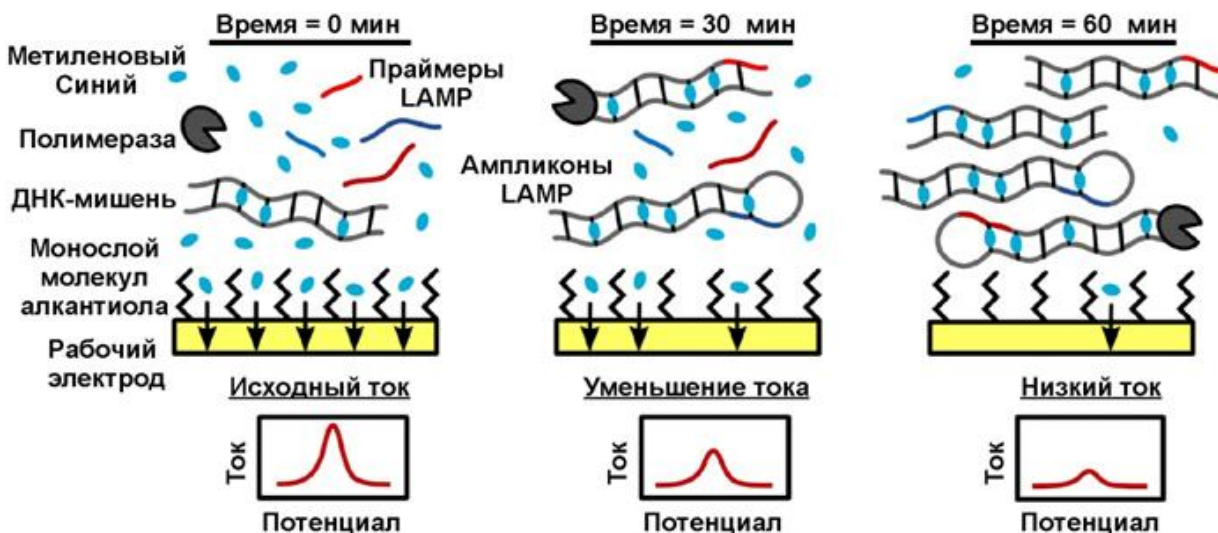
однокамерного микрочипа, реакционная камера которого (объемом 20 мкл) одновременно является электрохимической измерительной ячейкой. К реакционной смеси добавляли метиленовый синий (МС). До амплификации МС свободно находился в растворе и за счет его диффузии к поверхности

золотого рабочего электрода способствовал генерации окислительно-восстановительного тока. По мере образования продукта реакции МС встраивался в синтезированные двухцепочечные ампликоны, что сопровождалось уменьшением тока (рис. 11). Начальное количество ДНК-мишени

а Микрочип для LAMP с электродами



б Реакция LAMP и электрохимическое детектирование



в Оборудование для LAMP

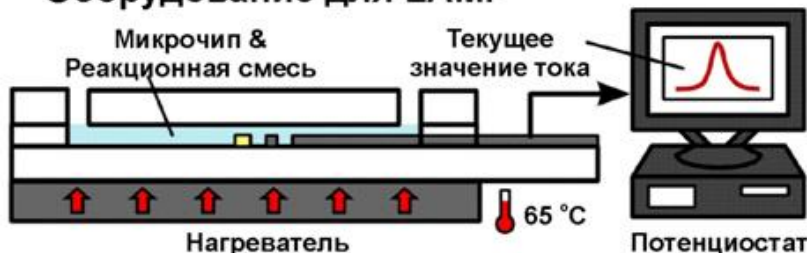


Рис. 11. Микрочип для обнаружения пищевых патогенов со встроенным электрохимическим датчиком.

а — чип с реакционной камерой и встроенными электродами;

б — принцип работы детектора: сначала свободный метиленовый синий обеспечивает окислительно-восстановительный ток у поверхности рабочего электрода; по мере синтеза ампликонов концентрация свободных молекул интеркалирующего красителя уменьшается с соответствующим изменением величины тока;

в — схема экспериментальной установки; г — измерение окислительно-восстановительного тока в реальном времени по мере продолжительности реакции [40]

количественно определяли путем измерения времени, необходимого для достижения порогового сигнала — точки, в которой амплификация происходит с максимальной эффективностью, аналогично оптическим методам ПЦР в реальном времени. Микрочип был изготовлен из полидиметилсилоксана и стекла с электродами из платины и золота. Предел обнаружения такой системы составил 16 копий ДНК-мишени сальмонеллы *S. Typhimurium*.

В работе [41] описано оригинальное портативное устройство для обнаружения и количественного определения ГМО кукурузы СВН 351, представляющее собой трубочку с разделительным клапаном. В одной части трубочки проводили LAMP с реагентами и ДНК-мишенью, затем за счет легкого встряхивания повреждали разделительную перегородку, смешивая продукты реакции с раствором активного окислительно-восстановительного вещества Hoeschst 33258. Электрохимическое детектирование проводили методом вольтамперометрии с помощью одноразового электронного чипа, прикрепленного к трубочке со стороны детектирующей камеры. Аналогично предыдущему примеру, интеркаляция молекул Hoeschst 33258 вызывала значительное падение интенсивности тока. В отличие от метиленового синего, присутствие Hoeschst 33258 ингибирует реакцию LAMP, поэтому использование данного вещества возможно только для детектирования по конечной точке. В дальнейшем в работе [42] те же авторы применяли гексамин рутения, позволяющий проводить регистрацию продуктов LAMP в режиме реального времени. Для электрохимического детектирования был разработан специальный электронный чип-полоска с электродами, который помещался в полипропиленовую пробирку. Чувствительность такой системы составила 20 копий/мкл для ДНК за 30 мин.

Простой картридж для проведения LAMP с детектированием методом плазмонного поверхностного резонанса был представлен в работе [43]. Картридж из полиметилметакрилата с двумя реакционными камерами (объемом 25 мкл каждая) был объединен с трапециевидной призмой из поликарбоната (рис. 12). Призма была изготовлена методом литья под давлением и покрыта пленкой золота толщиной 47 нм. Было показано, что поликарбонатная призма (показатель преломления $n = 1.51$) может быть использована для детектирования LAMP методом плазмонного резонанса наравне со стеклянными призмами. Обнаружение вируса гепатита В было продемонстрировано за 17 мин с минимальной концентрацией 2 фг/мл. Изменение объемного показателя преломления раствора после реакции LAMP составило примерно 0.0011

единиц показателя преломления (RI). Преимуществами метода плазмонного поверхностного резонанса являются относительно высокая чувствительность и малая продолжительность анализа, а также отсутствие дополнительных компонентов реакции (красителей).

Для осуществления изотермической амплификации в качестве источника тепла наравне с традиционными электрическими нагревателями (элементы Пельтье, тонкослойные нагреватели или водяные бани) также применяются нагреватели,

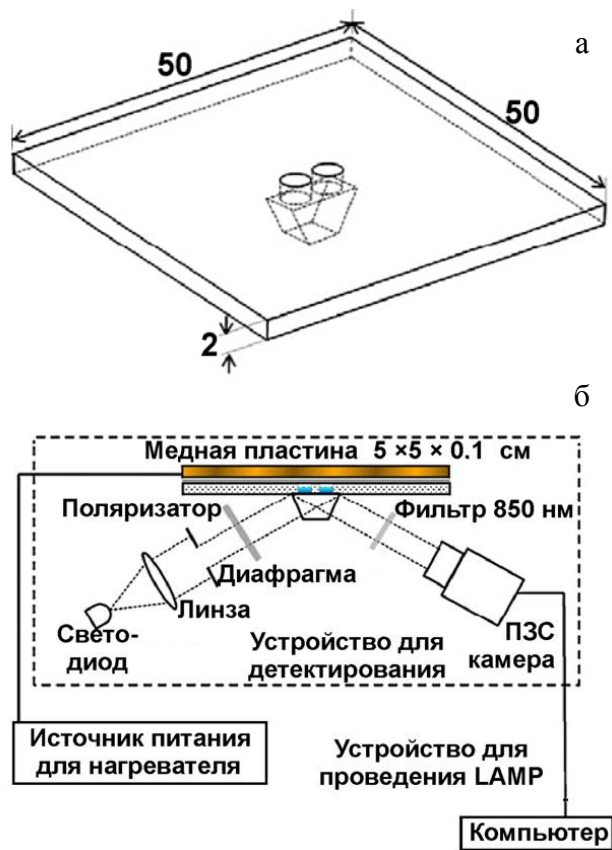


Рис. 12. Система для проведения LAMP с детектированием методом плазмонного поверхностного резонанса.

а — схема полимерного картриджа: полимерная основа с реакционными камерами соединена трапециевидной призмой, покрытой слоем золота; б — схема устройства для проведения LAMP с детектированием методом плазмонного поверхностного резонанса; модуль источника света состоит из светодиода (850 нм), линзы и поляризатора для генерации параллельно поляризованного светового потока; блок нагревателя — из медной пластины с двумя тонкопленочными нагревателями и термопарой, а также источника питания мощностью 60 Вт [43]

основанные на экзотермических реакциях, например: гидратация оксида кальция, хлорида кальция или магниевых покрытий, а также окисление железа и кристаллизация ацетата натрия. Такие устройства могут представлять собой вариант нагревателей с одноразовыми модулями, которые могут работать автономно, независимо от доступа к электросети.

Впервые нагрев за счет химических реакций для LAMP был продемонстрирован в 2010 г. [44]. В качестве источника тепла использовали реакцию гидратации оксида кальция в сочетании с модифицированным материалом со свойствами изменения фазы (твердое тело — жидкость). Тепло генерировалось в результате реакции оксида кальция с водой, а необходимая температура вокруг реакционной камеры поддерживалась модифицированным жиросодержащим соединением, имеющим высокую удельную теплоемкость и диапазон плавления около 65 °С. Было показано, что 20 г оксида кальция и 6.8 мл воды обеспечивали нагрев, достаточный для расплавления применяемого модифицированного материала, что позволяло поддерживать температуру в диапазоне (65 ± 0.75) °С в течение 45 мин. Амплификацию ДНК-мишени *Plasmodium falciparum* в полипропиленовых пробирках (объемом 0.2 мл) детектировали по конечной точке с измерением сигнала флуоресценции и светопропускания (по мутности). Результаты амплификации на химическом нагревателе сравнивали с результатами, полученными на коммерческом приборе для ПЦР. Предел обнаружения *Plasmodium falciparum* для обеих систем составил примерно 50 копий ДНК-мишени. Добавление контейнера для хранения пищевых продуктов (термоса) и простого пружинного таймера со звуковым сигналом сделало это устройство еще более привлекательным для применения в условиях ограниченных ресурсов [45]. Среди недостатков такого устройства можно отметить: необходимость дополнительного времени (15 мин) для полного прогрева нагревателя и реакционного объема, сложность обеспечения детектирования в режиме реального времени и невозможность повторного использования фазово-измененного материала после реакции.

Применение микрочипа вместо пробирок позволяет уменьшить продолжительность предварительного прогрева благодаря низкой тепловой массе микроустройства. В работе [46] был продемонстрирован самонагревающийся микрофлюидный картридж из ПММА, в котором использовалась экзотермическая реакция между сплавом Mg-Fe и водой, а также модифицированный материал с фазовым переходом (PureTemp 68, Entropy Solutions Inc., Великобритания). Тепло, выделяемое экзотермической реакцией, через модифици-

рованный материал и алюминиевый радиатор нагревало микрочип до температуры примерно 63 °С. Сигнал флуоресценции детектировали с красителем SYTO 9 по конечной точке: визуально и с помощью портативной цифровой камеры. Для амплификации 10 копий фрагмента ДНК кишечной палочки потребовалось 60 мин.

Позднее авторы доработали свою систему, добавив мобильное приложение для детектирования и количественного анализа с помощью устройств на базе смартфонов [47]. Теперь аналитическая система, помимо микрочипа, состояла из: 1) химического нагревателя — "кружки" (в термосе с вакуумной изоляцией), 2) смартфона с пользовательским приложением, 3) подставки-переходника, распечатанной на 3D-принтере и объединяющей микрочип, нагреватель и смартфон (рис. 13). Смартфон в этой системе выполнял функции и оптического регистратора, и источника возбуждения флуоресценции для проведения LAMP в режиме реального времени. Разработанное пользовательское приложение для Android позволяло осуществлять: регистрацию и запись сигнала флуоресценции в режиме реального времени, обработку изображений, количественную оценку концентрации НК, формирование отчета и передачу результатов. Работоспособность системы была продемонстрирована на примере количественного обнаружения вируса Зика в моче и слюне и ВИЧ в крови за 45 мин. Пользовательское приложение



Рис. 13. Система для количественного анализа нуклеиновых кислот с микрочипом для LAMP, химическим нагревателем и детектором флуоресценции в режиме реального времени на основе смартфона [47]

на смартфоне позволяет при необходимости передавать данные по беспроводной сети на удаленный сервер, где они будут записаны в файл для клиента и вместе с GPS-координатами будут внесены в актуальную карту территориального распространения заболевания (картографирование) с целью эпидемиологического надзора.

ИЗОТЕРМИЧЕСКАЯ ПЕТЛЕВАЯ АМПЛИФИКАЦИЯ LAMP ДЛЯ НОВОГО КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2

В 2020 г. коронавирусная инфекция (COVID-19) стала причиной чрезвычайной ситуации в области общественного здравоохранения во всех странах мира [48]. Новый коронавирус SARS-CoV-2 — недавно появившийся штамм, который никогда раньше не обнаруживался у людей. Эпидемиологические данные показали, что вирус обладает сильной способностью к передаче от человека к человеку и распространяется воздушно-капельным путем, заражая восприимчивых субъектов через прямые контакты и другие возможные пути передачи [49, 50].

Молекулярная диагностика COVID-19 в первую очередь основана на обнаружении РНК вируса [51, 52]. В настоящее время полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) является основным методом подтверждения инфекции COVID-19. ОТ-ПЦР обеспечивает чувствительное обнаружение специфических последовательностей генов, кодирующих РНК-зависимую РНК-полимеразу (RNA dependent RNA polymerase, RdRP), нуклеокапсид (nucleocapsid, N), белки оболочки (envelope, E) и шипов (spike, S) вируса.

Однако острая потребность в быстром и широкомасштабном тестировании на COVID-19 требует новых диагностических инструментов. Авторы работы [53] отмечают, что за очень короткое время был достигнут огромный прогресс в молекулярной диагностике COVID-19 и было разработа-

но множество тестов. Однако нынешние возможности тестирования не могут удовлетворить беспрецедентный мировой спрос на быструю молекулярную диагностику. Хотя в настоящее время ОТ-ПЦР является золотым стандартом для молекулярной диагностики COVID-19 [54, 55], альтернативные методы экспоненциальной амплификации, такие как LAMP, имеют большой потенциал, особенно для приложений РОС.

Разработано несколько вариантов проведения изотермической амплификации с обратной транскрипцией RT-LAMP: с детектированием сигнала флуоресценции [56] или колориметрическим детектированием [57, 58].

Используя кальцеин, Yan C. et al. [56] разработали анализ RT-LAMP для визуального обнаружения SARS-CoV-2. Они правильно идентифицировали 58 из 58 положительных и 72 из 72 отрицательных пациентов, что было подтверждено параллельной ОТ-ПЦР. Этот анализ RT-LAMP образцов экстрактов РНК пациентов требовал только 60-минутной инкубации при 63 °С.

Для визуального считывания результатов RT-LAMP Baek Y.H. et al. [58] использовали кислотно-основной индикатор феноловый красный, который меняет цвет с красного (рН 8.8) на желтый (рН < 8.0), что указывает на положительный результат амплификации. После 30-минутной инкубации реакционной смеси при 65 °С RT-LAMP обнаружила 200 копий РНК SARS-CoV-2, выделенных из образцов пациентов с COVID-19.

В работе [59] предложен метод RT-LAMP в реальном времени с интеркалирующим красителем SYTO 9. Реакцию проводили при 63 °С в течение 50 мин с использованием системы ПЦР в реальном времени Light Cycler 96 (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany). Результаты показали, что RT-LAMP может обнаруживать всего 3 копии РНК SARS-CoV-2 в 25 мкл (рис. 14). По графикам амплификации регистрируют положительную реакцию для 300 копий за 20 мин.

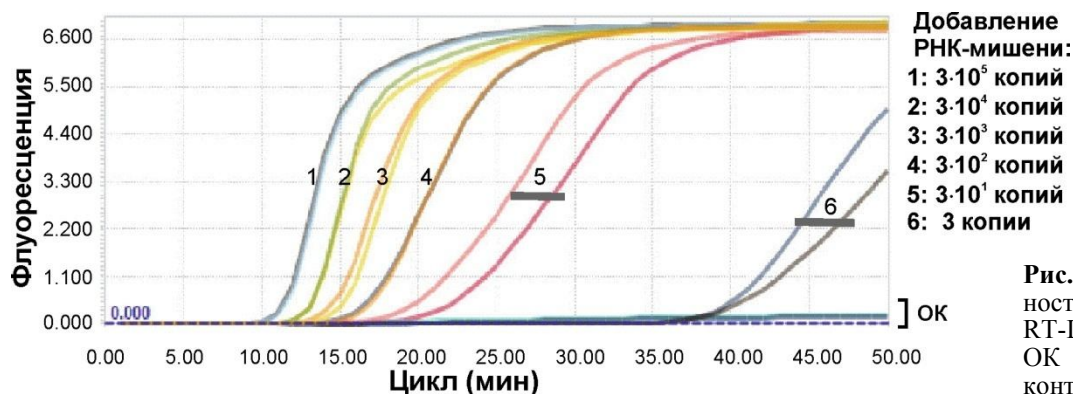


Рис. 14. Чувствительность теста SARS-CoV-2 RT-LAMP.

ОК — отрицательный контроль [59]

В России биофармацевтической компанией "Генериум" в Росздравнадзоре зарегистрирована тест-система "Изотерм SARS-CoV-2 РНК-скрин", разработанная группой компаний "Медико-биологический союз" [60]. В тест-системе использован метод петлевой изотермической амплификации (LAMP). Экспресс-тестирование включает в себя две стадии: выделение РНК коронавируса из анализируемых образцов и проведение петлевой изотермической амплификации (LAMP), которая подтверждает наличие или отсутствие РНК SARS-CoV-2. Реакция проводится при постоянной температуре 65 °С.

Среди отличительных особенностей метода разработчики отмечают: быстрое накопление продуктов реакции (15–60 мин), низкую чувствительность к примесям, высокую специфичность, возможность использовать в качестве исходной матрицы кровь или другие биологические жидкости. Предварительная подготовка образцов занимает 35 мин. Производитель планирует выпускать до 500 тысяч экспресс-тестов в неделю.

Компания "Синтол" (г. Москва) выпускает набор реагентов "АмпЛизо-SARS-CoV-2" [61], который позволяет обнаруживать фрагменты нуклеиновых кислот коронавируса SARS-CoV-2 методом обратной транскрипции, совмещенной с петлевой изотермической амплификацией в реальном времени (RT-LAMP) в одной микропробирке, что уменьшает количество манипуляций с реакционной смесью и тем самым максимально снижает количество ошибок и возможность контаминации при постановке. Время анализа — не более 40 мин. Порог обнаружения — не более 20 копий фрагментов комплементарной ДНК (кДНК) SARS-CoV-2. На текущий период набор не имеет Регистрационного удостоверения Росздравнадзора.

Кроме необходимости в дешевых и быстрых подходах для постановки диагноза на месте использования требуются альтернативные платформы для тестирования, которые были бы точными, простыми и портативными.

В работе [62] демонстрируется обнаружение SARS-CoV-2 методом RT-LAMP с помощью простой и портативной диагностической ПОС-системы (Point-of-Care Testing, ПОС — диагностика у постели больного), основанной на картридже, изготовленном по аддитивной трехмерной (3D) технологии, и ридере на базе смартфона (рис. 15).

В картридже образцы загружались вручную с применением шприцов. Портативный прибор содержал: нагревательные элементы, обеспечивающие тепловой режим амплификации; оптические элементы, необходимые для регистрации реакции, и источники питания. На рис. 15 показаны схемы и фотографии микрофлюидного картриджа

(вид сверху и снизу с серпантинным каналом смешивания), используемого для быстрого обнаружения SARS-CoV-2. В картридже шесть камер для амплификации и детектирования. Картридж изготовлен из полиуретана на принтере Carbon M2 по стандартной технологии. Верхняя и нижняя стороны картриджа покрыты прозрачной биосовместимой лентой (ARSeal 90880, Adhesive Research) для герметизации. Прозрачная лента позволяет проводить визуальный осмотр во время заполнения и визуализацию во время детектирования. В серпантинном канале картриджа образец смешивается с реагентами для амплификации под воздействием шприцевых насосов. После перемешивания реакционная смесь поступает в резервуары для амплификации. Геометрия и размеры резервуаров специально подобраны для обеспечения синхронного и равномерного заполнения всех камер (по 20 мкл каждая). После того, как камеры амплификации полностью загружены, они пломбируются биосовместимым клеем, и картридж вставляется в ридер для проведения реакции. Встроенный нагреватель поддерживает температуру 65 °С. Для регистрации и анализа изображений продукта реакции амплификации в камерах использовался смартфон (Huawei P30 Pro, Huawei). На рис. 15, г, показано изображение прибора ПОС с картриджем. На рис. 15, д, представлен компонентный состав прибора ПОС. Светодиоды и фильтры подобраны в соответствии с длинами волн возбуждения и излучения используемого интеркалирующего флуоресцентного красителя (EvaGreen). Смартфон делает фотографии реакционных камер с 10-минутными интервалами в первые 30 мин анализа, а затем с 2-минутными интервалами для большего количества точек данных амплификации в течение следующих 10 мин.

Перед тестированием клинических образцов была проведена первоначальная оценка платформы путем добавления инактивированного SARS-CoV-2 (5000 копий на мкл) и отрицательного контроля. При использовании такого образца положительный результат был получен всего за 30 мин от начала реакции. Созданный прибор ПОС продемонстрировал предел обнаружения 50 копий/мкл с геномной РНК и неактивными вирусами в буфере, что соответствует клиническим потребностям.

Авторы работы отмечают, что предложенный подход позволяет быстро (менее чем за 40 мин) обнаружить вирус, при этом нет необходимости в наборе для экстракции РНК и соответствующих инструментах. Эти результаты могут обеспечить масштабируемое развертывание диагностики COVID-19 в регионах без развитой инфраструктуры и ресурсов лабораторного уровня, особенно

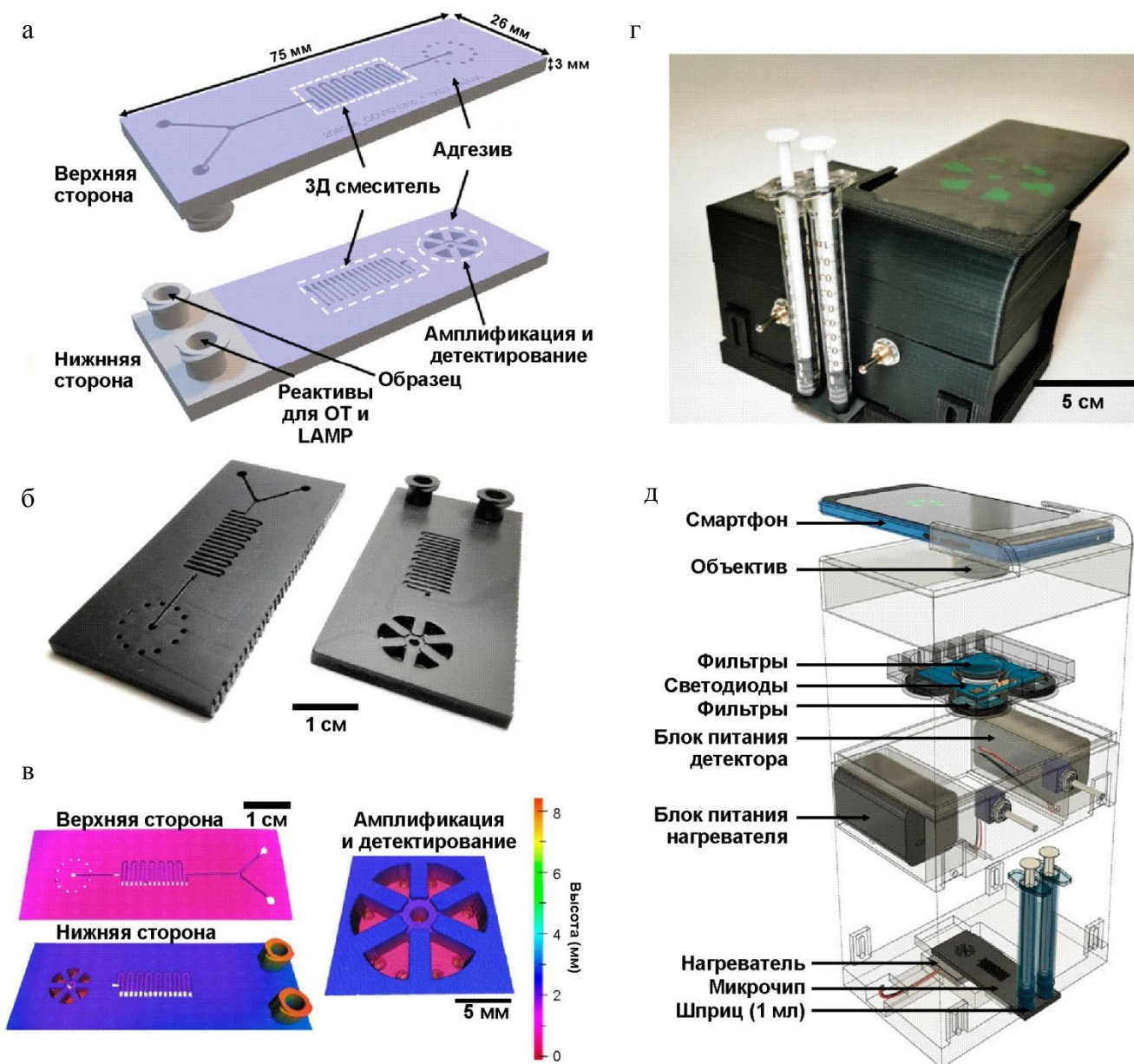


Рис. 15. Микрофлюидный картридж, изготовленный с применением аддитивных технологий, и портативный ПОС-инструмент.

а — схема микрофлюидного диагностического картриджа, используемого для быстрого обнаружения SARS-CoV-2; входные отверстия для жидкости соединяются со шприцами, которые вводят реагенты RT-LAMP и термически лизированный образец пациента в трехмерный серпантинный канал смесителя перед заполнением реакционных камер для амплификации и детектирования;

б — фотографии одноразового микрофлюидного картриджа;

в — 3D-микрофлюидный картридж и увеличенное изображение камер для амплификации и детектирования картриджа;

г — фотография прибора ПОС;

д — компонентный состав портативного прибора ПОС: смартфон, микролинзы, светофильтры, батареи, выключатели светодиода и нагревателя, нагреватель, чип, шприцы 1 мл [62]

в условиях, когда требуется немедленная диагностика на месте сбора образцов, например в шко-

лах, учреждениях по уходу за престарелыми или инвалидами или на спортивных мероприятиях.

Из опубликованных в Интернете сведений следует, что Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины (ФНКЦ ФХМ) ФМБА России разработал диагностические тест-системы на новую коронавирусную инфекцию SARS-CoV-2 [63]. Тестирование основано на методе изотермической амплификации и проводится при использовании специальных микрофлюидных чипов. Время исследования сократилось до 15–20 мин. Тест-система разработана для применения в приборе "Индикатор-Био" (рис. 16), который был создан в Троицком инженерном центре по заказу и в кооперации с РНИМУ им. Н.И. Пирогова (рук. проф. Д.В. Ребриков). ФМБА России имеет свое опытное производство тест-системы на основе микрофлюидных чипов, которое расположено в Центре технологий и микрофабрикации ФНКЦ ФХМ ФМБА России. Методы производства, обработки и спекания адаптированы под требования изотермической амплификации. Мощность опытного производства, по данным [63], составляет более 50 чипов в течение суток. Однако научных публикаций и технических характеристик по совместному использованию разработанной тест-системы и прибора "Индикатор-Био" не обнаружено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Поскольку LAMP является привлекательным методом изотермической амплификации для портативных устройств, то число работ, в которых

предлагаются разные варианты таких устройств, с каждым годом становится все больше. Популяризации метода также способствует появление наборов коммерческих реактивов для LAMP и возможность на первых порах использовать оборудование и устройства, разработанные для ПЦР.

Продолжительность анализа методом LAMP на микрочипе составляет от 15 мин до часа, что меньше, чем средняя длительность ПЦР. Сравнение микросистем для ПЦР и для LAMP показывает, что последние являются в равной степени чувствительными и специфичными, но в дополнение к этому они проще и дешевле благодаря изотермическому режиму. Разнообразие визуальных методов детектирования продуктов LAMP позволяет подобрать варианты, при которых для различения положительного и отрицательного результата не требуется измерительное оборудование. Применение таких систем актуально для проведения предварительных тестов или мониторинга.

Для количественного анализа методом LAMP требуются стандартные разведения или внутренние контроли. В этом случае не обойтись без детекторов и специального программного обеспечения.

Ограничением LAMP является сложность при проведении мультиплексного анализа. Иммуобилизация праймеров в микроструктурах чипа позволяет осуществлять амплификацию и детектирование различных фрагментов ДНК одновременно в разных камерах, при использовании, например, одного и того же интеркалирующего красителя.



Рис. 16. Прибор "Индикатор-Био" с микрофлюидными чипами [64]

На данный момент подобная возможность пространственного разделения используется и при детектировании на тест-полосках. Например, фирмой Milenia Biotec (Германия) разработана коммерческая система HubyDetect 2T, позволяющая регистрировать на одной тест-полоске сразу два анализа из одной пробы. Универсальность такой системы для обнаружения различных молекул (белков, антител, продуктов амплификации) создает превосходные перспективы для исследования сложных проб.

Применение изотермических нагревателей на основе экзотермических реакций, а также упрощение технических решений системы регистрации результатов вплоть до адаптера к мобильному телефону наряду с использованием тест-полосок отражает современные тенденции проведения анализа портативным "карманным" прибором [65, 66]. Для аналитических систем на основе LAMP следующим шагом может стать интеграция и автоматизация всех функциональных возможностей на едином комплексном устройстве с набором одноразовых комплектующих, что позволит проводить полный анализ исходной пробы аналогично сенсору с быстрым ответом "Да / Нет".

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA // *Nucleic Acids. Res.* 2000. Vol. 28, no. 12. e63 (7 p.).
2. BIORON GmbH. URL: <https://www.bioron.net/product-category/polymerases/sd-polymerase/> (дата обращения 10.10.2020).
3. Ignatov K.B., Barsova E.V., Fradkov A.F., Blagodatskikh K.A., Kramorova T.V., Kramorov V.M. A strong strand displacement activity of thermostable DNA polymerase markedly improves the results of DNA amplification // *BioTechniques*. 2014. Vol. 57, no. 2. P. 81–87.
4. Шевяков А.Г., Ветчинин С.С., Бикетов С.Ф. Петлевая изотермическая амплификация и иммуномагнитная сепарация в диагностике микробной контаминации // Сборник статей Международной научно-практической конференции "Биотехнология и общество в XXI в.". Барнаул, 15–18 сентября 2015 г. Издательство: Алтайский государственный университет (Барнаул). С. 93–96.
5. Hataoka Y., Zhang L., Mori Y., Tomita N., Notomi T., Baba Y. Analysis of specific gene by integration of isothermal amplification and electrophoresis on poly(methyl methacrylate) microchips // *Anal. Chem.* 2004. Vol. 76, no. 13. P. 3689–3693.
6. Mori Y., Kitao M., Tomita N., Notomi T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA // *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2004. Vol. 59. P. 145–157.
7. Nagamine K., Hase T., Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers // *Mol. Cell. Probes*. 2002. Vol. 16. P. 223–229.
8. Eiken Chemical Co. URL: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/loop.html> (дата обращения 10.10.2020).
9. Zhang X., Lowe S.B., Gooding J.J. Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP) // *Biosens. Bioelectron.* 2014. Vol. 61. P. 491–499. DOI: 10.1016/j.bios.2014.05.039
10. 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. Vol. 289. P. 150–154. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5921
11. Abdul-Ghani R., Al-Mekhlafi A.M., Karanis P. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for malarial parasites of humans: Would it come to clinical reality as a point-of-care test? // *Acta Trop.* 2012. Vol. 122. P. 233–240.
12. Mori Y., Kitao M., Tomita N., Notomi T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA // *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2004. Vol. 59. P. 145–157.
13. Mori Y., Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases // *J. Infect. Chemother.* 2009. Vol. 15. P. 62–69.
14. Pourmand N., Karhanek M., Persson H.H.J., Webb C.D., Lee T.H., Zahradnikova A., Davis R.W. Direct electrical detection of DNA synthesis // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. Vol. 103, no. 17. P. 6466–6470.
15. Purushothaman S., Toumazou C., Ou C. Protons and single nucleotide polymorphism detection: a simple use for the ion sensitive field effect transistor // *Sens. Actuators B Chem.* 2006. Vol. 114. P. 964–968.
16. Rothberg J.M., Hinz W., Rearick T.M., et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing // *Nature*. 2011. Vol. 475. P. 348–352.
17. Toumazou C., Shepherd L.M., Reed S.C., et al. Simultaneous DNA amplification and detection using a pH-sensing semiconductor system // *Nat. Methods*. 2013. Vol. 10. P. 641–646.
18. Tanner N.A., Zhang Y., Evans Jr. T.C. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes // *BioTechniques*. 2015. Vol. 58, no. 2. P. 59–68.
19. Le T.H., Nguyen N.T.B., Truong N.H., De N.V. Development of mitochondrial loop-mediated isothermal amplification for detection of the small liver fluke *opisthorchis viverrini* (opisthorchiidae; trematoda; plathyhelminthes) // *J. Clin. Microbiol.* 2012. Vol. 50. P. 1178–1184.
20. Almasi M.A., Ojaghkandi M.A., Hemmatabadi A., Hamidi F., Aghaei S. Development of colorimetric loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of the Tomato Yellow Leaf Curl Virus // *J Plant Pathol Microbiol.* 2013. Vol. 4, no. 1. Article ID 153 (6 p.).
21. 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. Vol. 4, no. 11. e865 (6 p.).

22. 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. Vol. 3, no. 5. P. 877–882.
23. Goto M., Honda E., Ogura A., Nomoto A., Hanaki K. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxyl naphthol blue // *BioTechniques*. 2009. Vol. 46, no. 3. P. 167–172.
24. Safavieh M., Ahmed M.U., Sokullu E., Ng A., Braescu L., Zourob M. A simple cassette as point-of-care diagnostic device for naked-eye colorimetric bacteria detection // *Analyst*. 2013. Vol. 139. P. 482–487.
25. Wang X., Fu Z., Chen X., Peng C., Xu X., Wei W., Li F., Xu J. Use of a novel metal indicator to judge loop-mediated isothermal amplification for detecting the 35S promoter // *Anal. Bioanal. Chem.* 2017. Vol. 409, no. 4. P. 884–889.
26. Oh S.J., Park B.H., Jung J.H., Choi G., Lee D.C., Kim D.H., Seo T.S. Centrifugal loop-mediated isothermal amplification microdevice for rapid, multiplex and colorimetric foodborne pathogen detection // *Biosens. Bioelectron.* 2016. Vol. 75. P. 293–300.
27. Gadkar, V.J., Goldfarb, D.M., Gantt, S. et al. Real-time detection and monitoring of loop mediated amplification (LAMP) reaction using self-quenching and de-quenching fluorogenic probes // *Sci Rep.* 2018. Vol. 8. Article ID 5548.
28. Biswas G., Sakai M. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for detection and identification of aquaculture pathogens: current state and perspectives // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2014. Vol. 98, no. 7. P. 2881–2895.
29. Shang Y., Sun J., Ye Y., Zhang J., Zhang Y., Sun X. Loop-mediated isothermal amplification-based microfluidic chip for pathogen detection // *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2020. Vol. 60, no. 2. P. 201–224.
30. Lee S., Lee C., Mark H., Meldrum D.R., Lin C. Efficient, specific, compact hepatitis B diagnostic device: Optical detection of the hepatitis B virus by isothermal amplification // *Sens. Actuators B Chem.* 2007. Vol. 127, no. 7. P. 598–605.
31. Fang X., Liu Y., Kong J., Jiang X. Loop-mediated isothermal amplification integrated on microfluidic chips for point-of-care quantitative detection of pathogens // *Anal. Chem.* 2010. Vol. 82, no. 7. P. 3002–3006.
32. Santiago-Felipe S., Tortajada-Genaro L.A., Carrascosa J., Puchades R., Maquieira A. Real-time loop-mediated isothermal DNA amplification in compact disc microreactors // *Biosens. Bioelectron.* 2016. Vol. 79. P. 300–306.
33. Yan H., Zhu Y., Zhang Y., Wang L., Chen J., Lu Y., Xu Y., Xing W. Multiplex detection of bacteria on an integrated centrifugal disk using bead-beating lysis and loop-mediated amplification // *Scientific Reports*. 2017. Vol. 7. Article ID 1460.
34. Chen J., Xu Y., Yan H., Zhu Y., Wang L., Zhang Y., Lu Y., Xing W. Sensitive and rapid detection of pathogenic bacteria from urine samples using multiplex recombinase polymerase amplification // *Lab Chip*. 2018. Vol. 18. P. 2441–2452.
35. Kiatpathomchai W., Jaroenram W., Arunrut N., Jitrapakdee S., Flegel TW. Shrimp Taura syndrome virus detection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick // *Journal of Virological Methods*. 2008. Vol. 153. P. 214–217.
36. HybriDetect, Milenia Biotec GmbH. URL: <https://www.milenia-biotec.com/en/product/hybridetect/> (дата обращения 10.10.2020).
37. Jung J.H., Oh S.J., Kim Y.T., Kim S.Y., Kim W.-J., Jung J. Seo T.S. Combination of multiplex reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification with an immunochromatographic strip for subtyping influenza A virus // *Anal. Chim. Acta*. 2015. Vol. 853. P. 541–547.
38. Jung J.H., Park B.H., Oh S.J., Choi G., Seo T.S. Integration of reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification with an immunochromatographic strip on a centrifugal microdevice for influenza A virus identification // *Lab Chip*. 2015. Vol. 15. P. 718–725.
39. Zhu H., Fohlerova Z., Pekarek J., Basova E., Neuzil P. Recent advances in lab-on-a-chip technologies for viral diagnosis // *Biosens. Bioelectron.* 2020. Vol. 153. Article ID 112041.
40. Hsieh K., Patterson A.S., Ferguson B.S., Plaxco K.W., Soh H.T. Rapid, sensitive, and quantitative detection of pathogenic DNA at the point of care through microfluidic electrochemical quantitative loop-mediated isothermal amplification // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2012. Vol. 51. P. 4896–4900.
41. Ahmed M.U., Saito M., Hossain M.M., Rao S.R., Furui S., Hino A., Takamura Y., Takagi M., Tamiya E. Electrochemical genosensor for the rapid detection of GMO using loop-mediated isothermal amplification // *Analyst*. 2009. Vol. 134. P. 966–972.
42. Ahmed M.U., Nahar S., Safavieh M., Zourob M. Real-time electrochemical detection of pathogen DNA using electrostatic interaction of a redox probe // *Analyst*. 2013. Vol. 138. P. 907–915.
43. Chuang T.L., Wei S.C., Lee S.Y., Lin C.W. A polycarbonate based surface plasmon resonance sensing cartridge for high sensitivity HBV loop-mediated isothermal amplification // *Biosens. Bioelectron.* 2012. Vol. 32. P. 89–95.
44. LaBarre P., Gerlach J., Wilmoth J., Beddoe A., Singleton J., Weigl B. Noninstrumented nucleic acid amplification (NINA): instrument-free molecular malaria diagnostics for low-resource settings // *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc*. 2010. Vol. 2010. P. 1097–1099.
45. LaBarre P., Hawkins K.R., Gerlach J., Wilmoth J., Beddoe A., Singleton J., Boyle D., Weigl B. A simple, inexpensive device for nucleic acid amplification without electricity — toward instrument-free molecular diagnostics in low-resource settings // *PLoS One*. 2011. Vol. 6, no. 5. Article ID e19738 (8 p.).
46. Liu C., Mauk M.G., Hart R., Qiu X.B., Bau H.H. A self-heating cartridge for molecular diagnostics // *Lab Chip*. 2011. Vol. 11. P. 2686–2692.
47. Song J., Pandian V., Mauk M.G., Bau H.H., Cherry S., Tisi L.C., Liu C. Smartphone-based mobile detection platform for molecular diagnostics and spatiotemporal disease mapping // *Anal. Chem.* 2018. Vol. 90, no. 7. P. 4823–4831.

48. Wang J., Cai K., Zhang R. *et al.* Novel one-step single-tube nested quantitative real-time PCR assay for highly sensitive detection of SARS-CoV-2 // *Anal. Chem.* 2020. Vol. 92, no. 13. P. 9399–9404.
49. Li Q., Guan X., Wu P., *et al.* Early transmission dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus — Infected Pneumonia. // *N Engl J Med.* 2020. Vol. 382. P. 1199–1207.
50. Guan W.J., Ni Z.Y., Hu Y. *et al.* Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China // *N Engl J Med.* 2020. Vol. 382. P. 1708–1720.
51. Carter L.J., Garner L.V., Smoot J.W., *et al.* Assay techniques and test development for COVID-19 diagnosis // *ACS Cent. Sci.* 2020. Vol. 6, no. 5. P. 591–605.
52. Udugama B., Kadhiresan P., Kozlowski H.N., *et al.* Diagnosing COVID-19: the disease and tools for detection // *ACS Nano.* 2020. Vol. 14, no. 4. P. 3822–3835.
53. Feng W., Newbigging A.M., Le C. *et al.* molecular diagnosis of COVID-19: challenges and research needs // *Anal. Chem.* 2020. Vol. 92, no. 15. P. 10196–10209.
54. Corman V.M., Landt O., *et al.* Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR // *Euro Surveill.* 2020. Vol. 25, no. 3. Article ID 2000045.
55. Liu R., Han H., Liu F., Lv Z., Wu K., Liu Y., Feng Y., Zhu C. Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020 // *Clin. Chim. Acta.* 2020. Vol. 505. P. 172–175.
56. 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. Vol. 26, no. 6. P. 773–779.
57. 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. Vol. 66, no. 7. P. 975–977.
58. 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. Vol. 9, no. 1. P. 998–1007.
59. 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 // *Virologica Sinica.* 2020. Vol. 35. P. 344–347.
60. Как проверяют на коронавирус: обзор тестов. URL: https://ntinews.ru/in_progress/likbez/kak-proveryayut-na-koronavirus-obzor-testov.html (дата обращения 20.10.2020).
61. НАБОР РЕАГЕНТОВ "АмпЛИзо-SARS-CoV-2". URL: <http://www.syntol.ru/catalog/nabory-reagentov-dlya-ptsr-v-realnom-vremeni/amplizo-sars-cov-2.html> (дата обращения 20.10.2020).
62. Ganguli A., Mostafa A., Berger J., *et al.* Rapid isothermal amplification and portable detection system for SARS-CoV-2 // *PNAS.* 2020. Vol. 117, no. 37. P. 22727–22735.
63. ФМБА России представило тест-системы на основе чипов для диагностики новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2. URL: https://fmba.gov.ru/press-centr/novosti/detail/?ELEMENT_ID=38232&sphrase_id=12026 (дата обращения 20.10.2020).
64. "Индикатор-БИО". URL: <http://old.rsmu.ru/21025.html> (дата обращения 20.10.2020).
65. Rateni G., Dario P., Cavallo F. Smartphone-based food diagnostic technologies: a review // *Sensors.* 2017. Vol. 17, no. 6. Article ID 1453 (22 p.).
66. Theuns S., Vanmechelen B., Bernaert Q., Deboutte W., Vandenhole M., Beller L., Matthijssens J., Maes P., Nauwynck H.J. Nanopore sequencing as a revolutionary diagnostic tool for porcine viral enteric disease complexes identifies porcine kobuvirus as an important enteric virus // *Scientific Reports.* 2018. Vol. 8, no. 1. Article ID 9830 (13 p.).

**Институт аналитического приборостроения РАН,
Санкт-Петербург**

Контакты: Зубик Александра Николаевна,
tunix@yandex.ru

Материал поступил в редакцию 06.11.2020

LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) TECHNIQUE IN MICRODEVICE FORMAT (REVIEW)

A. N. Zubik, G. E. Rudnitskaya, A. A. Evstrapov

Institute for Analytical Instrumentation of RAS, Saint Petersburg, Russia

Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is widely used as a fast and sensitive diagnostic method and is most promising for analysis in conditions of limited time and resources, for example, in places of care. The paper discusses the basic principles of LAMP technique, methods for detecting reaction products, as well as some microfluidic devices and analytical systems based on LAMP, including those developed for express diagnostics in the context of the COVID-19 pandemic.

Keywords: microfluidic devices, Loop-mediated isothermal amplification, LAMP, point-of-care (POC), COVID-19

INTRODUCTION

Nucleic acid amplification methods are an important tool for significantly increasing the sensitivity of molecular genetic analysis. The most popular amplification technology today is the polymerase chain reaction (PCR). PCR-based amplification requires sophisticated equipment for high-precision (± 0.5 °C) and fast (> 10 °C/s) thermal cycling, which is not always suitable for routine clinical practice or diagnostics in resource-limited settings. In addition, relatively high temperatures (up to ~ 100 °C) require good sealing of the reaction volume to prevent evaporation.

Isothermal amplification techniques have developed rapidly over the past two decades. An important difference between PCR and isothermal amplification is the temperature regime of the reaction. Isothermal nucleic acid amplification technologies operate at one optimum temperature, resulting in simpler, cheaper and more reliable technical solutions for instrument designs. Isothermal methods for amplifying nucleic acids are becoming an alternative to PCR and greatly simplify the implementation of amplification methods in medical diagnostic devices and analytical equipment.

Isothermal amplification of DNA / RNA, which provides comparable or even higher sensitivity and specificity than traditional PCR, represents a promising direction in the development of methods for the rapid detection of infectious diseases pathogens: in food; in water, air and soil; for diagnosis at the patient's bedside, etc.

LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) TECHNOLOGY

Isothermal amplification, which uses enzymes with

high strand displacement activity and proceeds with the formation of DNA loop structures, is a simple, fast, efficient and promising method for amplifying nucleic acids. The loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method was developed at Eiken Chemical Co., Ltd (Japan) by Tsugunori Notomi and his colleagues in 2000 [1].

The LAMP method uses DNA polymerases with chain-displacing activity and four (or six) primers, which increases the specificity of the reaction. The end product of this reaction is a specific structure consisting of several repetitive inverted sequences of the original target DNA, connected by single-stranded DNA loops. The method provides a high efficiency of DNA amplification, the amount of which increases 10^9 – 10^{10} times in 15–60 min. When combined with reverse transcription by adding reverse transcriptase to the reaction mixture, the LAMP method is also suitable for RNA amplification.

The advantages of isothermal loop amplification include simplicity, velocity, specificity and sensitivity, cost-effectiveness, and high productivity. Besides:

- there is no need for a step (stage) of denaturation of double-stranded forms into single-stranded ones;
- the amplification reaction occurs continuously under isothermal conditions;
- the amplification performance is extremely high;
- the total cost can be reduced, since LAMP does not require special reagents and complex equipment;
- RNA targets can also be amplified by the same procedure as DNA targets, simply by adding AMV reverse transcriptase to the test tube. Reverse transcription and amplification can be performed at constant temperature in one step.

To carry out this reaction, the enzyme Bst polymerase is used, which is a large subunit of *Bacillus stearothermophilus* DNA polymerase. The optimum temperature for this enzyme is 60–65 °C.

Bst 2.0 DNA polymerase is an *in silico* homologue of the large fragment of *Bacillus stearothermophilus* DNA polymerase I (Bst DNA polymerase, large fragment). This enzyme has 5' → 3' DNA polymerase activity and good DNA strand displacement ability, but does not exhibit 5' → 3' exonuclease activity. Bst 2.0 DNA polymerase is characterized by an increased rate of amplification, a high product yield, increased tolerance to the salt content, and greater thermal stability compared to a large fragment of wild-type Bst DNA polymerase.

Bst 3.0 DNA polymerase is the latest novelty for isothermal amplification — an *in silico* altered homologue of a large fragment of DNA polymerase I isolated from *Bacillus stearothermophilus*, which has been modified to improve the performance of the isothermal amplification reaction and to improve the activity of such an enzyme as reverse transcriptase. Bst 3.0 possesses 5'–3' DNA polymerase activity, using both DNA and RNA as a template, and can also unwind nucleic acid chains by itself. At the same time, the enzyme lacks 5'–3' and 3'–5' exonuclease activity. Bst 3.0 demonstrates reliable performance of the reaction and is characterized by significantly increased activity as a reverse transcriptase compared to Bst DNA polymerase.

SD-polymerase [2] is a new artificial thermostable DNA polymerase with high strand displacement activity, which is suitable for both PCR and isothermal amplification. Unlike wild-type enzymes with high strand displacement activity, which are only active below 68 °C (eg Bst polymerase), SD polymerase is stable up to 93–94 °C. This allows to carry out isothermal LAMP amplification with preheating to increase the specificity of the reaction. SD-polymerase combines such features as (5'–3') — polymerase activity, (5'–3') — strand displacement activity, as well as the absence of exonuclease activity [3] of the enzyme.

The LAMP method uses a set of 4 (or 6) specially

selected primers to recognize 6 different specific regions of the analyzed DNA sequence that flank the target template: regions F3c, F2c and F1c at the 3'-end, and regions B1, B2 and B3 at the 5'-end (Fig. 1). The Forward Inner Primer (FIP) contains the region F2 at the 3' end and the F1c region at the 5' end. The Forward Outer Primer contains the region F3 that is complementary to the F3c region. The Backward Inner Primer (BIP) contains the B2 region at the 3'-end and the B1c region at the 5'-end. The Backward Outer Primer contains the B3 region that is complementary to the B3c region. External primers F3 and B3 are required to initiate the reaction and are involved only at the initial stage.

The internal primers FIP and BIP have a complex structure. Each of them consists of two specific areas connected by a same-sense linker (usually polythymine is used). Inner primers are involved in the formation of loop structures; therefore, they are selected in such a way as to form loops at the ends of the target fragment.

Correct primer design is essential for a successful LAMP. Eiken (Japan) Co has created the Primer Explorer Internet service (LAMP primer designing software: <http://primerexplorer.jp/e/>), which can be used to design primers based on a known nucleotide sequence.

LAMP amplification is a self-sustaining autocyclable DNA synthesis reaction catalyzed by a DNA polymerase enzyme with a high strand displacement activity at a constant temperature of 60–(~ 65) °C (Fig. 2). At this temperature, single- and double-stranded forms of DNA are in dynamic equilibrium, therefore, heating to complete denaturation is not required to initiate the reaction.

The reaction begins with the annealing of one of the inner primers, BIP or FIP, which binds to the template only partially only by the corresponding region (B2 or F2), and initiates the synthesis of the complementary strand using DNA polymerase.

Fig. 1. LAMP primer set and target DNA [4]

Fig. 2. LAMP reaction principle [5]

An outer primer, for example F3, is attached to the F3c-fragment of the target, and polymerase completes the strand, thus displacing the newly synthesized sequence. The displaced strand forms loop-like structures at the 5'-end, the so-called stem-loop structures, since the F1c-region hybridizes to the F1 region. The process is repeated at the opposite 3'-end. The result is a new dumbbell-like structure with loops at both ends

This is followed by a cyclic amplification step initiated by one of the inner primers complementary to

the loop region on the product. Outer primers are not involved at this stage. The cyclic stage consists in the formation of a large number of products with a complex structure. The final product of the reaction is a set of amplified DNA sequences of various lengths, consisting of alternately inverted repeats of the target fragment on the same strand.

In two years in order to accelerate the reaction, the authors of LAMP improved the developed method by adding one more pair of primers — loop primers [6].

Loop primers (Loop Primer B and Loop Primer F) hybridize to loop structures and initiate DNA synthesis with strand displacement. Loop primers contain sequences complementary to single-stranded loop regions (between B1 and B2 or between F1 and F2) at the 5' end of the dumbbell structure, providing an increased number of starting points for starting DNA synthesis. An example is shown in Fig. 3, where the

Fig. 3. Amplification of LAMP using loop primers [7]

The end products of the reaction are, in addition to the amplified target sequences in the form of inverted repeats, a variety of by-products with a branched secondary structure (structure similar to that of cauliflower).

It should be emphasized that loop primers are not mandatory components of the reaction, but their use can reduce the analysis time. They increase the amount of amplification products by interacting with loop structures in the regions other than the binding sites of inner primers, and therefore accelerate the achievement of the detectable amount of DNA in the reaction mixture by 1.5–2 times as compared with the original method [6]. As the graph shows (Fig. 4), it is possible to register a sufficient amount of the product in 10–20 min.

LAMP amplification products can be detected both in real time and by endpoint using gel electrophoresis, turbidimetry, fluorimetry and photometry, or simply with the naked eye. Achieving efficient genetic analysis with LAMP depends not only on the efficiency of the DNA amplification itself, but also on the method chosen to detect the reaction products. In [9], the authors discuss the basic monitoring methods for LAMP. Tab. 1 shows the detection methods and their comparative characteristics.

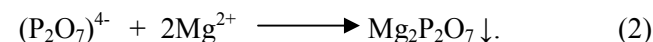
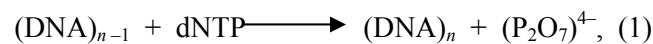
During the DNA synthesis reaction, a large amount of pyrophosphate ions $(\text{P}_2\text{O}_7)^{4-}$ is formed as a by-product. It was noted that pyrophosphate forms a noti-

Tab. 1. Comparative characteristics of detection methods for LAMP [9]

Fig. 5. Detection of the LAMP reaction by turbidity
Left, no target (negative control); on the right, with a DNA target (positive reaction) [13]

ceable insoluble white precipitate with divalent metal ions [10]:

ceable insoluble white precipitate with divalent metal ions [10]:



Equation (1) describes the Bst-polymerase mediated DNA polymerization reaction in the LAMP method. When a large number of pyrophosphate ions are produced, they react with magnesium ions in the reaction buffer (equation 2) to produce a white precipitate of $\text{Mg}_2\text{P}_2\text{O}_7 \downarrow$ [11, 12]. The presence or absence of a white precipitate makes it possible to assess the performance of DNA amplification by the LAMP method visually, with the naked eye (Fig. 5). It was reported that the increase in turbidity in the reaction solution is proportional to the amount of amplified products [12].

The real-time turbidimetric method allows the quantitative determination of the initial amount of target DNA in the samples under study. By-products of enzymatic DNA synthesis, in addition to pyrophosphate ions, are also hydrogen ions. Ion Torrent platforms sequencing technologies are based on the detection of protons as by-products of DNA strand synthesis [14–16].

Tab. 2. Acid-base indicators

Indicator	Range pH	Coloring the reaction solution	
		Negative result	Positive result
Phenol red	6.8–8.4	Red	Yellow
Cresol red	7.2–8.8	Purplish red	Amber yellow
Neutral red	6.8–8.4	Amber yellow	Red
M-cresol purple	7.4–9	Purple	Yellow

A modification of such a pH sensor was used to control DNA amplification using LAMP and PCR methods [17]. These studies have demonstrated the ability of DNA polymerase to efficiently carry out the amplification reaction even in dilute buffer solutions.

The authors of [18] used this property of the enzyme to carry out LAMP reactions in the presence of low buffer concentrations and observed a significant change in the pH-reaction mixture from the initial alkaline value to the final acidic one. This significant change in pH made detection possible by means of pH-sensitive indicators. The paper shows that visual color change detection by LAMP detection of DNA is an easy-to-use, fast and reliable method.

In [18], the sensitivity of the LAMP reaction was demonstrated by means of use of acid-base indicators (Tab. 2): phenol red, cresol red, neutral red, and m-cresol purple, so that to detect the amount of genomic DNA in the range 0.01–100.00 ng (~ 3–30.000 copies) for the gene of transmembrane regulator of conductance (*CFTR* gene).

Thus, colorimetric visualization of the amplification reaction by means of pH indicators can facilitate the use of the amplification method as a diagnostic tool that allows for field diagnostics with fast and reliable visual detection.

The advantage of the visual method of endpoint detection is the absence of instrumental costs. However, Le T.H. and co-authors [19] have shown that it is difficult to determine the sensitivity and variability (difference) between tubes with the naked eye when illuminated by sunlight. In addition, the turbidity of positive samples is stable for only a short time, which means that monitoring should be carried out as soon as possible after completion of the reaction [20]. Wastling S.L. notes that a “trained eye” is required for successful visual DNA monitoring [21].

Visual detection of DNA by LAMP amplification can be performed using a fluorescent metal indicator — calcein. Calcein (CAS No. 1461-15-0) is a metal indicator that produces strong fluorescence due to forming complexes with divalent metal ions such as

calcium and magnesium. In [22], calcein was added to the initial reaction mixture to monitor the concentration of magnesium ions in solution during LAMP amplification. The concentration of magnesium ions in solution decreases because of binding with pyrophosphates formed during the DNA synthesis reaction and the precipitation of an insoluble precipitate. However, the decrease in the concentration of magnesium ions by the LAMP reaction was not sufficient for the color change to provide visual detection. Therefore, manganese ions were introduced into the initial reaction mixture, which quench the fluorescence of calcein due to complexation and form insoluble salts with pyrophosphates during the reaction (Fig. 6).

In this case, calcein in the reaction mixture initially binds to manganese ions (Mn^{2+}), and the fluorescence is quenched. When the amplification reaction is performed, calcein is deprived of manganese ions due to the binding of the latter to the generated pyrophosphate ions ($P_2O_7^{4-}$), which leads to fluorescence. And free calcein is able to bind with the magnesium ion (Mg^{2+}) in the reaction mixture, which leads to increased fluorescence. The presence of fluorescence indicates the presence of a target DNA, and therefore visual detection can be achieved.

It was found that the fluorescence intensity is proportional to the initial concentration of the target DNA in LAMP reactions. The fluorescence of calcein complexes can also be used to monitor LAMP responses in real time.

Another dye with a similar effect is hydroxy naphthol blue (HNB, CAS No. 63451-35-4), which dyes the solution purple in the presence of Mg^{2+} . During the amplification process, a significant amount of insoluble magnesium pyrophosphate is formed, which causes a significant decrease in the concentration of Mg^{2+} in solution. This decrease in concentration leads to a change in the color of the reaction solution from violet to sky blue in the presence of HNB [23]. The sky blue color of the sample indicates the presence of the target DNA, while the purple color is observed in the negative control.

Fig. 6. The principle of detection using a fluorescent metal indicator — calcein [22]

Wastling S.L. et al. [21] reported that Hydroxy Naphthol Blue does not inhibit the LAMP response. It is widely used to monitor the LAMP response in one-step methods [21, 23, 24]. The advantage of this approach is the ability to perform analysis in a microtiter plate and to quantify the results colorimetrically using a reader.

HNB changes the color of the reaction solution from violet to light blue. However, the color change was negligible because two colors refer to the same tone. This makes it difficult to detect changes with the naked eye, especially when samples contain only small amounts of target DNA. In [25], a simpler colorimetric analysis for visual detection of LAMP results was proposed using another metal indicator — acid chromium blue K. The color of the reaction changes from red to blue, since Mg^{2+} binds to $P_2O_7^{4-}$ and the complex precipitates during the reaction, while decreasing concentration of magnesium in solution.

Colorimetric detection of LAMP amplification products can be obtained using Eriochrome Black T (EBT), a complexometric indicator [26]. Indeed, during the LAMP reaction, a decrease in Mg^{2+} concentration due to a complexation with EBT leads to a color change that is visible to the naked eye. After amplification of the target DNA sequence, the original magenta color of the LAMP reaction mixture changes to cyan.

The main disadvantage of LAMP technology is the use of indirect detection methods (for example, electrophoresis, precipitation, turbidimetric method, non-specific dyes: SYBR Green I, hydroxy naphthol blue, calcein / Mn^{2+}), which cannot differ target products from non-specific amplification products, which often leads to the false positives results. A direct detection method was developed in [27]. A fluorophore-labeled

loop probe is used that does not fluoresce in a free unbound state, but only fluoresces when it is bound to its target (amplicon). This is called the Fluorescence of Loop Primer Upon Self Dequenching–LAMP (FLOS-LAMP). The method allows the detection of LAMP-amplicons specific to the target sequence. The FLOS-LAMP concept has been validated for the rapid detection of the human pathogen, varicella-zoster virus, in clinical samples. FLOS-LAMP had a detection limit of 500 target copies with clinical sensitivity and specificity of 96.8 % and 100 %, respectively. The high level of specificity is a great achievement and eliminates one of the main disadvantages of LAMP technology — false positive results.

In [28], a comparative analysis of the LAMP isothermal amplification method and the widely used methods of standard PCR and real-time PCR was carried out. The LAMP isothermal loop amplification method has high sensitivity and efficiency and has more advantages than disadvantages compared to PCR. The authors conclude that LAMP is a simple, fast and highly effective method with excellent specificity and can be widely applied in clinical diagnostics, environmental monitoring, food quality assessment and human health. These data are shown in Tab. 3.

When using the LAMP method, the main difficulty lies in the design of the primers. But the method is more specific, because it is necessary to recognize as many as six regions in the desired DNA molecule, but in PCR — only two ones. In addition, LAMP is not affected by the presence of biological components that often do not allow PCR to be performed, i.e. LAMP is less susceptible to inhibitors.

Tab. 3. Comparison of the advantages and disadvantages of LAMP amplification and widely used PCR-based methods [28]

	LAMP	PCR	PCR-RT
Advantages	<ul style="list-style-type: none"> ◆ No need for an expensive thermal cycler as the reaction is carried out under isothermal conditions ◆ Easy to perform in the field using an inexpensive water bath or heating block ◆ Highly specific and efficient 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Widely used molecular instrument ◆ Easy way of preliminary confirmation 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Monitoring the progress of the reaction in real time ◆ Quantitative method for amplifying target sequence ◆ Use of sealed tubes minimizes contamination ◆ Increased sensitivity

	amplification due to the use of loop primers <ul style="list-style-type: none"> ◆ Less labor intensive, can be finished within an hour ◆ Real-time measurement and quantitative measurement using an inexpensive instrument ◆ Confirmation of the success of the reaction by visual observation with the naked eye for turbidity or color change at the endpoint using fluorescent dyes such as SYBR Green I or calcein ◆ Less sensitive to inhibiting substances present in biological samples 		due to the addition of a fluorescent dye in the reaction <ul style="list-style-type: none"> ◆ Highly reliable analysis resulting from work with programmed control
Disadvantages	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Sensitivity to false positives results due to carryover or cross-contamination ◆ Complex primer design requiring software ◆ Requirement of two long primers of the highest purity ◆ Problems with reagent availability worldwide 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ More time-consuming method (> 3 h) ◆ Requires thermal cycling and gel documentation systems ◆ Technique of high quality indicating a positive or negative result ◆ Higher likelihood of contamination after reaction 	<ul style="list-style-type: none"> ◆ Expensive equipment and reagents ◆ Need for fluorescent probes ◆ Time consuming (2 h)

Fig. 7. An octopus-like microchip for LAMP with simultaneous amplification of fragments of different nucleic acids.

а — Image of the microchip.

б — Scheme of microstructures: chambers 1 / 1', 2 / 2', and 3 / 3' contain dried primers for influenza A subtype, seasonal influenza A (H1N1) and influenza A (H1N1) pandemic 2009, respectively; chambers 4 / 4' contain primers for human β -actin, which was used as a positive control, chambers 5 / 5' were used as a negative control.

в — Visual assessment of the result for white turbidity from the formation of magnesium pyrophosphate.

г — Detection of the result by the fluorescence signal from the intercalating dye SYBR Green I.

д — Confirmation of the results of the analysis by electrophoresis in agarose gel, in which a characteristic step pattern of the LAMP product is observed [31]

ISOTHERMAL LOOP AMPLIFICATION DEVICES

Microfluidic devices offer many attractive features such as high throughput, fast analysis and low reagent consumption. By choosing isothermal LAMP amplification instead of PCR, the power consumption of nucleic acid analysis devices can be significantly reduced by eliminating the thermal cycling technique.

Due to its superior performance, LAMP is more suitable for miniaturization than traditional PCR. Advances and developments in LAMP technology suggest its use as a useful diagnostic tool in microfluidic devices and portable point-of-care diagnostic tools (POCs) operated in the point of care and in resource-limited settings. The integration of LAMP technology into microfluidic devices has shown great potential for molecular biological diagnostics: cost reduction, over-

all analysis time, and the impact of potential pollution sources [29].

One of the first works on carrying out an isothermal loop reaction in a microchip dates back to 2004: the researchers combined LAMP and electrophoresis on a polymer microchip [5]. Later, in 2007, work [30] presented a microchip made of polymethyl methacrylate (PMMA) with a 25 μL reaction chamber. The LAMP reaction was carried out for 60 min at 65 °C using an external heater. A mini-spectrometer was used for quantitative registration in real time.

For the simultaneous amplification of several fragments of nucleic acids, immobilized primers were

used in [31]. The microchip was a polydimethylsiloxane (PDMS) disk, in which 10 reaction chambers-channels were formed from the center to the edges (Fig. 7). Preliminarily, primer solutions were introduced into microchannels through external holes, where were then dried. When the ready mixture for LAMP (50 μL) was introduced into the central loading chamber, the liquid filled all channels under the influence of capillary forces. All holes were then sealed with uncured PDMS to prevent evaporation and contamination. Amplification was carried out at

Fig. 8. Centrifugal microfluidic device for detecting foodborne pathogens.

a — Layer-by-layer image of a centrifugal device: I — polycarbonate disc (1 mm thick) with supply channels, II — adhesive layer (30 μm), III — polycarbonate disc (1 mm) with reagent reservoirs, main and connecting channels and reaction chambers, IV — one-sided adhesive film.
б — Schematic representation of one block of microstructures [26]

63 °C; a water bath was used for heating. The reaction products were recorded at the end point — the formation of pyrophosphate in the channels was observed with the naked eye, as well as in real time the change in optical density was quantified using an optical fiber and a digital sensor. Amplification of 10 fg / μl of target DNA with positive and negative controls was performed in less than 1 hour.

A device for the quantitative detection of a target DNA in real time was developed by the authors [32]. As a basis, they used standard disks (CD, DVD), on which an array of microreactors for LAMP was formed. The LAMP disc consisted of three layers: 1) a modified optical disc backing (CD, digital versatile disc, or Blu-ray disc), 2) a double-sided pressure-sensitive adhesive, and 3) acetate film to seal the system. Since the original polycarbonate surface of the disc had hydrophobic properties, it was necessary to ensure that the surface was hydrophilic. For this, various methods of surface modification were tested: treatment with surfactants, acid and alkali, as well as UV irradiation, plasma treatment. Plasma treatment in an oxygen atmosphere was recognized as the most effective, since it allowed reducing the contact angle to 20 °. The detection was carried out by cyclic scanning of the disk surface using a standard CD / DVD drive, and was based on the change in the signal intensity from the laser drive due to the presence of turbidity or color change of solutions in the microreactors.

Also, for LAMP, microchips are used, in which the fluid movement is controlled by centrifugal devices. Such devices, called lab-on-CD, due to microstructures (a network of channels, chambers, valves, etc.) of a special shape, dimensions and surface properties of working channels and chambers allow automatic

transportation, dosing and mixing reagents when changing the speed of rotation of the disk, thereby eliminating the need for external pumps.

For example, a centrifugal microfluidic device (12 cm in diameter) for simultaneous amplification of 25 samples was presented by Oh et al [26]. The device was designed to detect several foodborne pathogens by the LAMP method with the possibility of dosing and mixing various components of the reaction mixture using a commercial centrifuge, as well as visual detection of the results. The main liquid components for LAMP (reaction mixture, primers and sample) were injected separately into special holes on the microchip. The liquid, under the impact of capillary forces, filled the supply channels, which were connected to the main channel by a narrow connecting microchannel (Fig. 8). As the microchip rotated, centrifugal forces forced the liquid to overcome the microchannels and flow through the main channel into the reaction chamber. The size of the connecting channels was set in order to that to overcome the hydraulic resistance for each next component, it was required to increase the disk rotation frequency by about 2 times. In particular, the cross-section of the connecting channel (width \times depth) for the reaction mixture was 500 \times 250 μm , for primers — 250 \times 125 μm , for the sample — 100 \times 125 μm . According to the calculations, the rotational speed for “switching on” such microchannels was 522, 808 and 1739 rpm, which corresponded to 500, 1000 and 2000 rpm in practice. After collecting all three solutions in the reaction chambers, the reagents were mixed with short rotations of the microchip.

Fig. 9. Diagram of one sector of a centrifugal microchip for the detection of bacteria (a) and illustration of the successive stages of the analysis (б).

On the (b): I — preliminary introduction of the sample with lysate into the lysis chamber, and the reaction mixture for LAMP— into the storage chamber, II — under the impact of centrifugal forces, the liquid passes into the following chambers (for the selected sample and LAMP reagents, respectively) and then fills the channels-siphons, III — mixing the sample with the reaction mixture for LAMP in a special chamber, IV — dividing the sample into aliquots according to the number of reaction chambers, V — filling the reaction chambers, the chip is ready for isothermal amplification [33]

Then the inlets were sealed with special tape and the microchip was heated to 65 °C. Visual detection was performed using an Eriochrome Black T (EBT) indicator, which after amplification changed the original purple color of the liquid to sky blue. The absorption spectra of the liquid were also analyzed using a conventional spectrophotometer. When testing the device, the sensitivity was 380 copies of *E. coli* DNA fragments, and the analysis duration did not exceed 60 min.

Carrying out sample preparation on a microchip is important for creating portable microanalytical systems designed for use in conditions of limited resources. In [33], a centrifugal microfluidic device (with a radius of 6 cm) for multiplex amplification to detect bacteria is presented. Cell lysis, mixing of the sample with reagents, and isothermal amplification were performed on a polymethyl methacrylate disk,

on which two or four sets of identical microstructures were milled (Fig. 9, a) with ten reaction chambers each. In addition to centrifugal force, hydrophobic valve channels, siphon channels and air exhaust channels were used to control the fluid. As soon as the centrifugal forces (created during rotation) exceeded the capillary forces, the liquid began to move along the hydrophobic channels-valves. EGC-1700 perfluorocarbon liquid (3M, China) was used to treat the surface of these channels. The siphon-shaped channels were filled with 2 % alcohol solution of Tween 20. After the ethanol was evaporated, Tween 20 was adsorbed on the surface of the channels, making the siphon channels hydrophilic. When the rotation speed decreased to a certain value, the channels were filled under the influence of capillary forces. Offtake channels are used to ensure air circulation in the microchip, since the chip is completely sealed before analysis.

Fig. 10. Detection of LAMP reaction products on a test strip.

a — General principle of operation of HybriDetect (Milenia Biotec, Germany) [36].

б — Multiplex assay to determine the type of influenza A. After the reaction, amplicons contain specific probes with antigens and biotin embedded in double-stranded DNA. Gold nanoparticles coated with streptavidin and mouse IgG bind to the amplicons. The test strip contains anti-bodies for digoxigenin, Texas Red and controls, which bind to the corresponding antigens [37]

Prior to analysis, primers were loaded into a well with a reaction chamber and dried at room temperature. Then, zirconia balls (~ 100 μm in diameter) and a magnetic bar (7 mm long) were placed in the lysis chamber. The disk with prepared microstructures was sealed with a film using adhesives (PSA, Adhesive Research, China). The sample (60 μl) and LAMP mix (60 μl) were injected through the holes located on the back of the chip, they were also sealed using adhesive tape. The chip was then placed over the magnets and the cells were lysed for 3 min. Rotating magnets activated a magnetic bar that stirred the zirconia balls.

The balls, colliding with bacteria, destroyed them.

Fig. 9, б, shows a diagram of the movement of fluid flows in a microchip under the impact of rotation. After the stage of cell lysis at a rotational speed of 3000 rpm, the liquids overcame hydrophobic valves and moved: the DNA solution — into the chamber for the isolated sample, and the LAMP mixture — into the storage chamber 2. Then the rotation speed decreased so that the liquid could fill the siphon channel under the impact of capillary forces. During this stage, cellular "debris" remaining in the lysate was precipitated and filtered out. Thus, unlike chemical methods,

no DNA purification step or concentration step was carried out. Therefore, chip sample preparation for purification from proteins and other impurities had been performed preliminarily. Later, researchers optimized the microchip topology by eliminating the first chamber for storing the reaction mixture [34].

For successful LAMP amplification, it is necessary to ensure that the reaction mixture is mixed with the isolated sample homogeneously. The best mixing is achieved with the V-shaped position of the siphon channels, when the trajectories of the solutions motion intersect during disk rotation and they mix. It is also stated that a short change in the direction of rotation of the disc can be used to improve mixing. After mixing the sample and LAMP reagents, the mixture should fill the reaction chambers. The volume of each reaction chamber was 10 μL . To prevent cross-contamination during the filling of the reaction chambers, the microchip design includes a liquid pre-dispensing device in which aliquots of the mixture are dispensed into ten supply pockets at 1000 rpm (Fig. 9, 6-IV). Then, with an increase in the centrifugation speed to 4000 rpm, the mixture entered the reaction chambers through the valve channels, where it dissolved the primers. At this stage, the reagent solution is completely ready for the reaction. After the completion of the rotation program, heating was carried out to 65 °C to initiate and perform amplification. The LAMP duration in the experiments was 60 min, and the time required to complete the entire analysis was approximately 70 min. The analysis results could be recorded using a fluorescent detector or with the naked eye.

The use of test strips for the visual detection of amplicons seems to be interesting in genetic analysis. This is a simple and fast way to detect amplification products, which does not require special qualifications of personnel and detecting devices. For the first time, the use of test strips for registration of LAMP products was demonstrated in 2008 in the case of the detection of the virus that causes Taura syndrome in shrimp [35]. The detection principle is shown in Fig. 10, a. Initially, one of the internal primers FIP was labeled with biotin. The reaction product, which contains biotin after amplification, was mixed with FITC-labeled DNA probes. The probes hybridized complementarily with the amplicons for several min. Hybridized amplicons were added to a solution containing gold particles labeled with antibodies to FITC, and an LFS test strip (Milenia Biotec, Germany) was dipped into the resulting mixture. Antibodies with gold particles bound to the reaction product, staining them, and the solution spreads along the LFS due to capillary forces. With the biotin end, amplicons were deposited in the analyzed area (on the streptavidin layer), thereby forming a dark red strip that lasted 15 min at room temperature. Results were considered

positive if two bands were visible (control and test), and negative if only one control band was visible.

In 2015, a centrifugal microfluidic device was proposed for the detection and confirmation of type A influenza by the LAMP method and reverse transcription with a built-in test strip for visual detection [38]. The disc 7 cm in diameter consisted of polycarbonate layers in which three-dimensional structures with dried primers were made. The microchip made it possible to automatically separate the injected mixture of sample and reagents (total volume of 7 μL) into three reaction chambers, perform LAMP with reverse transcription and wet the test strip, while simultaneously mixing the resulting solution with a buffer containing probes and gold particles. A feature of the work was the simultaneous detection of two genes — H1 and conservative M, for which different antigen-antibody complexes were used to form bands (Fig. 10, 6). Thus, primers LF and LB for the H1 gene fragment were labeled with a Texas Red hapten, and the LF primer for the M gene was labeled with digoxigenin. Therefore, on the test strip, the first strip was coated with digoxigenin monoclonal antibodies and the second strip was coated with Texas Red antibodies. The third control strip contained anti-mouse IgG. In this case, gold nanoparticles were modified with streptavidin and murine immunoglobulins IgG, and the LAMP solution contained free biotin, which, during amplification, was incorporated into the double-stranded product on the principle of intercalation [37]. The microchip was able to distinguish the subtype of the influenza A virus at a concentration of 10 copies of viral RNA in 55 min.

Registration of LAMP products with disposable test strips is a promising approach in the development of rapid diagnostic systems. Due to the fact that the probe is complementary to the amplicon, such tests provide additional specificity, and the combination of simple implementation with visual detection makes test strips attractive for use in resource-limited settings. Combining this method with stand-alone microfluidic systems eliminates the risk of cross-contamination, ensuring continuous and fast analysis. However, the use of test strips for registration of amplification products is limited exclusively to qualitative analysis, which is associated with low detection accuracy. The result is influenced by different lighting conditions and variations in the color perception of users. To achieve quantitative analysis, it is necessary to use special devices for detecting stripes and color sensors to register the color intensity with subsequent use of software for image processing and analysis [39].

Electrochemical sensors are also promising for creating fast, sensitive, miniaturized and inexpensive diagnostic systems. A microchip for LAMP with a built-in electrochemical sensor was presented in [40].

The LAMP reaction is carried out inside a single-chamber microchip, the reaction chamber of which (with a volume of 20 μL) is simultaneously an electrochemical measuring cell. Methylene blue (MB) was added to the reaction mixture. Before amplification, MB was freely in solution, and due to its diffusion to the surface of the gold working electrode, it facilitated the generation of a redox current. As the reaction product was formed, MS was incorporated into the synthesized double-stranded amplicons, this process was accompanied by a decrease in the current (Fig. 11). The initial amount of target DNA was quantified by measuring time required to reach the threshold signal — the point at which amplification occurs with maximum efficiency, similar to optical real-time PCR methods. The microchip was made of polydimethylsiloxane and glass with platinum and gold electrodes. The detection limit of such a system was 16 copies of the target DNA of *S. typhimurium* salmonella.

Paper [41] describes an original portable device for the detection and quantitative determination of corn GMO CBH 351, which is a tube with a separating

valve. LAMP with reagents and a target DNA was carried out in one part of the tube, then, by gentle shaking, the dividing septum was damaged, mixing the reaction products with a solution of the active redox substance Hoechst 33258. Electrochemical detection was performed by voltammetry using a disposable electronic chip attached to the tube from the side of the detection chamber. Similar to the previous example, intercalation of Hoechst 33258 molecules caused a significant drop in current intensity. Unlike methylene blue, the presence of Hoechst 33258 inhibits the LAMP reaction, so this substance can only be used for endpoint detection. Subsequently, in [42], the same authors used ruthenium hexamine, which makes it possible to register LAMP products in real time. For electrochemical detection, a special electronic chip strip with electrodes was developed, which was placed in a polypropylene test tube. The sensitivity of this system was 20 copies / μL for DNA in 30 min.

A simple cartridge for LAMP with detection by surface plasmon resonance was presented in [43]. A polymethyl methacrylate cartridge with two reaction chambers (25 μL each) was combined with a polycarbonate trapezoidal prism (Fig. 12). The prism was

Fig. 11. Microchip for detecting foodborne pathogens with a built-in electrochemical sensor.
 а — A chip with a reaction chamber and built-in electrodes.
 б — The principle of operation of the detector: first, free methylene blue provides a redox current at the surface of the working electrode; as amplicons are synthesized, the concentration of free molecules of the intercalating dye decreases with a corresponding change in the current value.
 в — Diagram of the experimental setup. Д) Measurement of redox current in real time over the duration of the reaction [40]

made by injection molding and covered with a 47 nm thick gold film. It was shown that a polycarbonate prism (refractive index $n = 1.51$) can be used for LAMP detection by the plasmon resonance method along with glass prisms. Detection of hepatitis B virus was demonstrated within 17 min with a minimum concentration of 2 fg / ml. The change in the volumetric refractive index of the solution after the LAMP reaction was approximately 0.0011 refractive index units (RI). The advantages of the surface plasmon resonance method are the relatively high sensitivity and

short duration of the analysis, as well as the absence of additional reaction components (dyes).

To carry out isothermal amplification as a heat source, along with traditional electric heaters (Peltier elements, thin-layer heaters or water baths), heaters based on exothermic reactions are also used, for example: hydration of calcium oxide, calcium chloride or magnesium coatings, as well as iron oxidation and crystallization sodium acetate. Such devices can be a variant of heaters with disposable modules that can operate autonomously, regardless of access to the mains.

Fig. 12. System for LAMP with plasmon surface resonance detection.
 а — Diagram of a polymer cartridge: a polymer base with reaction chambers is connected by a trapezoidal prism covered with a layer of gold
 б — Diagram of a device for LAMP with detection by the method of plasmon surface resonance. The light source module consists of a light-emitting diode (850 nm), a lens and a polarizer to generate a parallel polarized light flux. The heater block consists of a copper plate with two thin-film heaters and a thermocouple, and 60 W power supply [43]

Heating due to chemical reactions for LAMP was first demonstrated in 2010 [44]. A calcium oxide hydration reaction in combination with a modified material with phase change properties (solid-liquid) was used as a heat source. Heat was generated by the reaction of calcium oxide with water, and the required temperature around the reaction chamber was maintained with a modified fat-containing compound having a high specific heat and a melting range of about 65 °C. It was shown that 20 g of calcium oxide and 6.8 ml of water provided heating sufficient to melt the applied modified material, which made it possible to maintain the temperature in the range of (65 ± 0.75) °C for 45 min. Amplification of the *Plasmodium falciparum* target DNA in polypropylene tubes (0.2 ml volume) was detected by the endpoint with measurement of the fluorescence signal and light transmission (by turbidity). The results of the amplification with the use of the chemical heater were compared with the results obtained on a commercial instrument for PCR. The detection limit for *Plasmodium falciparum* for both systems was approximately 50 copies of the target DNA. The addition of a container for storing food (thermos) and a simple spring-loaded timer with an audible signal made this device even more attractive for use in resource-limited settings [45]. Among the disadvantages of such a device are: the need for additional time (15 min) for complete warming up of the heater and the reaction volume, the difficulty of providing detection in real time, and the impossibility of

reusing the phase-changed material after the reaction. The use of a microchip instead of test tubes reduces the preheating time due to the low thermal mass of the microdevice. In [46], a self-heating microfluidic cartridge made of PMMA was demonstrated, in which an exothermic reaction between an Mg–Fe alloy and water was used, as well as a modified material with a phase transition (PureTemp 68, Entropy Solutions Inc., UK). The heat released by the exothermic reaction heated the microchip to a temperature of about 63 °C through a modified material and an aluminum radiator. The fluorescence signal was detected by SYTO 9 dye at the end point: visually and using a portable digital camera. It took 60 min to amplify 10 copies of the *E. coli* DNA fragment.

Later, the authors improved their system by adding a mobile application for detection and quantitative analysis using smartphones [47]. Now the analytical system, in addition to the microchip, consisted of: 1) a chemical heater — a "mug" (in a thermos with vacuum insulation), 2) a smartphone with a user application, 3) an adapter stand, printed on a 3D printer, and combining a microchip, a heater and smartphone (Fig. 13). The smartphone in this system performed the functions of both an optical recorder and a fluorescence excitation source for conducting LAMP in real time. The developed custom application for Android made it possible to carry out: registration and recording of a fluorescence signal in real time, image processing, quantitative assessment of nucleic acid concentration,

Fig. 13. System for quantitative analysis of nucleic acids with a microchip for LAMP, a chemical heater and fluorescence detector in real time based on a smartphone [47]

report generation and transmission of results. The system's performance was demonstrated by the quantitative detection of Zika virus in urine, saliva and HIV in blood within 45 min. A user smartphone application allows, if necessary, to transmit data wirelessly to a remote server, where it can be recorded into the client file and, together with GPS coordinates, will be entered into an up-to-date map of the territorial distribution of the disease for the purpose of epidemiological surveillance.

ISOTHERMAL LAMP LOOP AMPLIFICATION FOR THE NOVEL SARS-COV-2 CORONAVIRUS

In 2020, coronavirus infection (COVID-19) caused a public health emergency around the world [48]. The new coronavirus SARS-CoV-2 is a recently emerging strain that has never been detected in humans before.

Epidemic data have shown that the virus has a strong ability to transmit from human to human and spreads by airborne droplets, infecting susceptible subjects through direct contact and other possible transmission routes [49, 50].

Molecular diagnosis of COVID-19 is primarily based on the detection of the virus RNA [51, 52]. Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) is currently the main method for confirming COVID-19 infection. RT-PCR provides sensitive detection of specific gene sequences encoding RNA dependent RNA polymerase (RdRP), nucleocapsid (N), envelope (E) and spike (S) protein of the virus. However, the urgent need for rapid and large-scale testing for COVID-19 requires new diagnostic tools. The authors of [53] note that in very short time, tremendous progress has been made in the molecular diagnosis of COVID-19, and many tests have been

developed. But current testing capabilities cannot meet the unprecedented global demand for rapid molecular diagnostics. Although RT-PCR is currently the gold standard for molecular diagnostics of COVID-19 [54, 55], alternative exponential amplification methods such as LAMP have great potential, especially for POC applications.

Several variants of isothermal amplification with RT-LAMP reverse transcription have been developed: with fluorescence signal detection [56] or colorimetric detection [57, 58].

Yan et al. [56] developed an RT-LAMP assay for the visual detection of SARS-CoV-2 using calcein. They correctly identified 58 of 58 positive and 72 of 72 negative patients, that was confirmed by parallel

RT-PCR. This RT-LAMP assay of patient RNA extract samples required only 60 min incubation at 63 °C.

For visual reading of RT-LAMP results, Baek et al. [58] used acid-base Phenol Red indicator, which changes color from red (pH 8.8) to yellow (pH <8.0), that indicates a positive result of amplification. After a 30-min incubation of the reaction mixture at 65 °C, RT-LAMP detected 200 copies of SARS-CoV-2 RNA isolated from samples of patients with COVID-19.

The work [59] proposed a real-time RT-LAMP method with intercalating SYTO 9 dye. The reaction was carried out at 63 °C for 50 min using the Light Cycler 96 real-time PCR system (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Fig. 14. Sensitivity of SARS-CoV-2 RT-LAMP test
OK: negative control [59]

The results showed that RT-LAMP can detect only 3 copies of SARS-CoV-2 RNA in 25 µl (Fig. 14). On the amplification graphs, a positive reaction is recorded for 300 copies within 20 min.

In Russia, the biopharmaceutical company Gene-rium registered the Isotherm SARS-CoV-2 RNA-screen test system in Roszdravnadzor, system was developed by the Medico-Biological Union group of companies [60]. The test system uses the method of loop isothermal amplification (LAMP). Rapid testing includes two stages: the isolation of coronavirus RNA from the analyzed samples and loop isothermal amplification (LAMP), which confirms the presence or absence of SARS-CoV-2 RNA. The reaction is carried out at a constant temperature of 65 °C.

Among the distinctive features of the method, the developers note: the rapid accumulation of reaction products (15–60 min), low sensitivity to impurities, high specificity, an ability to use blood or other biological fluids as an initial matrix. Sample preparation takes 35 min. The manufacturer plans to release up to 500 thousand rapid tests per week.

The Syntol company (Moscow) produces the Amplizo-SARS-CoV-2 reagent kit [61], which allows the detection of nucleic acid fragments of the SARS-CoV-2 coronavirus by reverse transcription combined with real-time isothermal loop amplification (RT-LAMP) in one microtube, which reduces the number of manipulations with the reaction mixture and thereby minimizes the number of errors and the possibility of contamination during the process. Analysis time is no more than 40 min. The detection threshold is no more than 20 copies of SARS-CoV-2 cDNA fragments. For the current period, the kit does not have a

Registration Certificate from Roszdravnadzor.

In addition to the need for cheap and fast approaches for on-site diagnosis, alternative testing platforms are required that are accurate, simple and portable.

[62] demonstrates the RT-LAMP detection of SARS-CoV-2 using a simple and portable POC diagnostic system based on an additive three-dimensional (3D) cartridge and a smartphone-based reader (Fig. 15).

Samples were loaded into the cartridge manually using syringes. The portable device contained: heating elements providing thermal amplification mode; optical elements required for registration of reactions and power supplies. Fig. 15, a–b show schematics and photographs of the microfluidic cartridge (top and bottom view with serpentine mixing channel) used for rapid detection of SARS-CoV-2. The cartridge contains six chambers for amplification and detection. The cartridge is made of polyurethane on a Carbon M2 printer using standard technology. The top and bottom of the cartridge are covered with transparent biocompatible tape (ARSeal 90880, Adhesive Research) for sealing. The transparent tape allows visual inspection during filling and visualization during detection. In the serpentine channel of the cartridge, the sample is mixed with amplification reagents by means of syringe pumps. After stirring, the reaction mixture enters the amplification tanks. The geometry and dimensions of the tanks are specially selected to ensure synchronous and uniform filling of all chambers (20 µL each). After the amplification chambers are fully loaded, they are sealed with biocompatible glue, and the cartridge is inserted into the reader for the reac-

tion. The built-in heater maintains a temperature of 65 °C. A smartphone (Huawei P30 Pro, Huawei) was used to register and analyze images of the amplification reaction product in the cameras. Fig. 15, г shows an illustration of a POC with a cartridge. Fig. 15, д,

shows the component composition of the POC device. The LEDs and filters are matched to the excitation and emission wavelengths of the used intercalating fluorescent dye (EvaGreen). The smartphone takes photos of the reaction chambers at 10 min intervals

Fig. 15. Additive microfluidic cartridge and portable POC instrument.

а — Diagram of a microfluidic diagnostic cartridge used for the rapid detection of SARS-CoV-2. Fluid inlets connect to syringes that inject RT-LAMP reagents and a thermally lysed patient sample into the mixer's 3D serpentine channel prior to filling the amplification and detection reaction chambers.

б — Photos of the disposable microfluidic cartridge.

в — 3D microfluidic cartridge and an enlarged image of the cameras for amplification and detection of the cartridge.

г — Photo of the POC device.

д — Component composition of a portable POC device: smartphone, microlenses, light filters, batteries, switches for LED and heater, heater, chip, 1 ml syringes [62]

in the first 30 min of analysis, and then at 2 min intervals for more amplification data points over the next 10 min.

Prior to testing clinical samples, an initial platform assessment was performed by adding inactivated SARS-CoV-2 (5000 copies / μl) and negative control. With this sample, a positive result was obtained in just 30 min from the start of the reaction. The created POC device demonstrated a detection limit of 50 copies / μl with genomic RNA and inactive viruses in buffer, which meets clinical needs.

The authors of the work note that the proposed approach allows to detect the virus quickly (in less than 40 min), without the need for an RNA extraction kit

and appropriate tools. These results can enable scalable deployment of COVID-19 diagnostics in regions without advanced laboratory-level infrastructure and resources, especially in settings where immediate diagnostics are required at the point of collecting samples, such as in schools, care facilities for the elderly or disabled, or at sporting events.

From the information published on the Internet, it follows that the Federal Scientific and Clinical Center for Physical and Chemical Medicine (FSCC PCM) of FMBA of Russia has developed diagnostic test systems for the new coronavirus infection SARS-CoV-2 [63].

Fig. 16. Device "Indicator-Bio" with microfluidic chips [65]

The testing is based on the isothermal amplification method and is carried out using special microfluidic chips. The research time was reduced to 15–20 min. The test system is designed for use in the "Indicator-Bio" device (Fig. 16), which was created at the Troitsk Engineering Center by order and in cooperation with the Russian National Research Medical University named after N.I. Pirogov (headed by Prof. D.V. Rebrikov). FMBA of Russia has its own pilot production of test systems based on microfluidic chips, which is located in the Center for Technologies and Microfabrication of FSCC PCM. Manufacturing, processing and sintering methods are adapted to the requirements of isothermal amplification. The pilot production capacity, according to [64], is more than 50 chips per day. However, no scientific publications and technical characteristics on the joint use of the developed test system and the "Indicator-Bio" device were found.

CONCLUSION

Since LAMP is an attractive method of isothermal amplification for portable devices, the number of works offering different versions of such devices is growing every year. The popularization of the method is also facilitated by the emergence of commercial reagent kits for LAMP and the ability at first to use equipment and devices developed for PCR.

The duration of analysis by the LAMP method on a microchip is from 15 min to an hour, which is less than the average duration of PCR. Comparison of microsystems for PCR and for LAMP shows that the latter are equally sensitive and specific, but in addition, they are simpler and cheaper due to the isothermal regime. The variety of visual methods for detecting LAMP products allows to select options where no measuring equipment is required to differ positive and

negative results. The use of such systems is relevant for conducting preliminary tests or monitoring.

Quantitative LAMP assays require standard dilutions or internal controls. In this case, one cannot do without detectors and special software.

A limitation of LAMP is the difficulty in doing multiplex analysis. Immobilization of primers in the microstructures of the chip allows amplification and detection of different DNA fragments simultaneously in different chambers, using, for example, the same intercalating dye. At the moment, this possibility of spatial separation is also used for detection on test strips. For example, Milenia Biotec (Germany) has developed a commercial HybriDetect 2T system, which allows registering two analytes from one sample on one test strip at the same time. The versatility of such a system for the detection of various molecules (proteins, antibodies, amplification products) creates excellent prospects for the study of complex samples.

The use of isothermal heaters based on exothermic reactions, as well as the simplification of technical solutions of the results registration system up to an adapter for a mobile phone, along with the use of test strips, reflects the current trends in analysis with a portable "pocket" device [66, 67]. For LAMP-based analytical systems, the next step can be the integration and automation of all functionalities on a single complex device with a set of disposable components, which will allow a complete analysis of the original sample similar to a sensor with a quick Yes / No response.

REFERENCES

- Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.*, 2000, vol. 28, no. 12, e63 (7 p.). DOI: 10.1093/nar/28.12.e63
- BIORON GmbH. URL: <https://www.bioron.net/product-category/polymerases/sd-polymerase/> (accessed 10.10.2020).
- Ignatov K.B., Barsova E.V., Fradkov A.F., Blagodatskikh K.A., Kramorova T.V., Kramorov V.M. A strong strand displacement activity of thermostable DNA polymerase markedly improves the results of DNA amplification. *BioTechniques*, 2014, vol. 57, no. 2, pp. 81–87. DOI: 10.2144/000114198
- Shevyakov A.G., Vetchinin S.S., Biketov S.F. [Loop isothermal amplification and immunomagnetic separation in microbial contamination diagnostics]. *Sbornik statej Mezhdunarodnoj nauchno-prakticheskoj konferencii "Biotehnologiya i obshchestvo v XXI v."* [Collection of articles of the International Scientific and Practical Conference "Biotechnology and Society in the 21st Century"]. Barnaul, September 15–18, 2015. Altai State University Publ., pp. 93–96. (In Russ.).
- Hataoka Y., Zhang L., Mori Y., Tomita N., Notomi T., Baba Y. Analysis of specific gene by integration of isothermal amplification and electrophoresis on poly(methyl methacrylate) microchips. *Anal. Chem.*, 2004, vol. 76, no. 13, pp. 3689–3693. DOI: 10.1021/ac035032u
- Mori Y., Kitao M., Tomita N., Notomi T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2004, vol. 59, pp. 145–157.
- Nagamine K., Hase T., Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol. Cell. Probes*, 2002, vol. 16, pp. 223–229. DOI: 10.1006/mcpr.2002.0415
- Eiken Chemical Co. URL: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/loop.html> (accessed 10.10.2020).
- Zhang X., Lowe S.B., Gooding J.J. Brief review of monitoring methods for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biosens. Bioelectron.*, 2014, vol. 61, pp. 491–499. DOI: 10.1016/j.bios.2014.05.039
- 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, vol. 289, pp. 150–154. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5921
- Abdul-Ghani R., Al-Mekhlafi A.M., Karanis P. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for malarial parasites of humans: Would it come to clinical reality as a point-of-care test? *Acta Trop.*, 2012, vol. 122, pp. 233–240. DOI: 10.1016/j.actatropica.2012.02.004
- Mori Y., Kitao M., Tomita N., Notomi T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2004, vol. 59, pp. 145–157. DOI: 10.1016/j.jbbm.2003.12.005
- Mori Y., Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J. Infect. Chemother.*, 2009, vol. 15, pp. 62–69. DOI: 10.1007/s10156-009-0669-9
- Pourmand N., Karhanek M., Persson H.H.J., Webb C.D., Lee T.H., Zahradnikova A., Davis R.W. Direct electrical detection of DNA synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, vol. 103, no. 17, pp. 6466–6470. DOI: 10.1073/pnas.0601184103
- Purushothaman S., Toumazou C., Ou C. Protons and single nucleotide polymorphism detection: a simple use for the ion sensitive field effect transistor. *Sens. Actuators B Chem.*, 2006, vol. 114, pp. 964–968. DOI: 10.1016/j.snb.2005.06.069
- Rothberg J.M., Hinz W., Rearick T.M., et al. An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature*, 2011, vol. 475, pp. 348–352.
- Toumazou C., Shepherd L.M., Reed S.C., et al. Simultaneous DNA amplification and detection using a pH-sensing semiconductor system. *Nat. Methods*, 2013, vol. 10, pp. 641–646. DOI: 10.1038/nmeth.2520
- Tanner N.A., Zhang Y., Evans Jr. T.C. Visual detection of isothermal nucleic acid amplification using pH-sensitive dyes. *BioTechniques*, 2015, vol. 58, no. 2, pp. 59–68. DOI: 10.2144/000114253

19. Le T.H., Nguyen N.T.B., Truong N.H., De N.V. Development of mitochondrial loop-mediated isothermal amplification for detection of the small liver fluke *opisthorchis viverrini* (opisthorchiidae; trematoda; platyhelminthes). *J. Clin. Microbiol.*, 2012, vol. 50, pp. 1178–1184. DOI: 10.1128/JCM.06277-11
20. Almasi M.A., Ojaghkandi M.A., Hemmatabadi A., Hamidi F., Aghaei S. Development of colorimetric loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of the Tomato Yellow Leaf Curl Virus. *J Plant Pathol Microbiol.*, 2013, vol. 4, no. 1, article ID 153 (6 p.).
21. 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, vol. 4, no. 11, e865 (6 p.). DOI: 10.1371/journal.pntd.0000865
22. 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, vol. 3, no. 5, pp. 877–882. DOI: 10.1038/nprot.2008.57
23. Goto M., Honda E., Ogura A., Nomoto A., Hanaki K. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxyl naphthol blue. *BioTechniques*, 2009, vol. 46, no. 3, pp. 167–172. DOI: 10.2144/000113072
24. Safavieh M., Ahmed M.U., Sokullu E., Ng A., Braescu L., Zourob M. A simple cassette as point-of-care diagnostic device for naked-eye colorimetric bacteria detection. *Analyst*, 2013, vol. 139, pp. 482–487. DOI: 10.1039/C3AN01859H
25. Wang X., Fu Z., Chen X., Peng C., Xu X., Wei W., Li F., Xu J. Use of a novel metal indicator to judge loop-mediated isothermal amplification for detecting the 35S promoter. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2017, vol. 409, no. 4, pp. 884–889. DOI: 10.1007/s00216-016-0084-x
26. Oh S.J., Park B.H., Jung J.H., Choi G., Lee D.C., Kim D.H., Seo T.S. Centrifugal loop-mediated isothermal amplification microdevice for rapid, multiplex and colorimetric foodborne pathogen detection. *Biosens. Bioelectron.*, 2016, vol. 75, pp. 293–300. DOI: 10.1016/j.bios.2015.08.052
27. Gadkar, V.J., Goldfarb, D.M., Gantt, S. et al. Real-time detection and monitoring of loop mediated amplification (LAMP) reaction using self-quenching and de-quenching fluorogenic probes. *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8, article ID 5548. DOI: 10.1038/s41598-018-23930-1
28. Biswas G., Sakai M. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays for detection and identification of aquaculture pathogens: current state and perspectives. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2014, vol. 98, no. 7, pp. 2881–2895. DOI: 10.1007/s00253-014-5531-z
29. Shang Y., Sun J., Ye Y., Zhang J., Zhang Y., Sun X. Loop-mediated isothermal amplification-based microfluidic chip for pathogen detection. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, vol. 60, no. 2, pp. 201–224. DOI: 10.1080/10408398.2018.1518897
30. Lee S., Lee C., Mark H., Meldrum D.R., Lin C. Efficient, specific, compact hepatitis B diagnostic device: Optical detection of the hepatitis B virus by isothermal amplification. *Sens. Actuators B Chem.*, 2007, vol. 127, no. 7, pp. 598–605. DOI: 10.1016/j.snb.2007.05.015
31. Fang X., Liu Y., Kong J., Jiang X. Loop-mediated isothermal amplification integrated on microfluidic chips for point-of-care quantitative detection of pathogens. *Anal. Chem.*, 2010, vol. 82, no. 7, pp. 3002–3006. DOI: 10.1021/ac1000652
32. Santiago-Felipe S., Tortajada-Genaro L.A., Carrascosa J., Puchades R., Maquieira A. Real-time loop-mediated isothermal DNA amplification in compact disc microreactors. *Biosens. Bioelectron.*, 2016, vol. 79, pp. 300–306. DOI: 10.1016/j.bios.2015.12.045
33. Yan H., Zhu Y., Zhang Y., Wang L., Chen J., Lu Y., Xu Y., Xing W. Multiplex detection of bacteria on an integrated centrifugal disk using bead-beating lysis and loop-mediated amplification. *Scientific Reports*, 2017, vol. 7, article ID 1460. DOI: 10.1038/s41598-017-01415-x
34. Chen J., Xu Y., Yan H., Zhu Y., Wang L., Zhang Y., Lu Y., Xing W. Sensitive and rapid detection of pathogenic bacteria from urine samples using multiplex recombinase polymerase amplification. *Lab Chip*, 2018, vol. 18, pp. 2441–2452. DOI: 10.1039/C8LC00399H
35. Kiatpathomchai W., Jaroenram W., Arunrut N., Jitrapakdee S., Flegel T.W. Shrimp Taura syndrome virus detection by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with a lateral flow dipstick. *Journal of Virological Methods*, 2008, vol. 153, pp. 214–217. DOI: 10.1016/j.jviromet.2008.06.025
36. HybriDetect, Milenia Biotec GmbH. URL: <https://www.milenia-biotec.com/en/product/hybridetect/> (accessed 10.10.2020).
37. Jung J.H., Oh S.J., Kim Y.T., Kim S.Y., Kim W.-J., Jung J., Seo T.S. Combination of multiplex reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification with an immunochromatographic strip for subtyping influenza A virus. *Anal. Chim. Acta*, 2015, vol. 853, pp. 541–547. DOI: 10.1016/j.aca.2014.10.020
38. Jung J.H., Park B.H., Oh S.J., Choi G., Seo T.S. Integration of reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification with an immunochromatographic strip on a centrifugal microdevice for influenza A virus identification. *Lab Chip*, 2015, vol. 15, pp. 718–725. DOI: 10.1039/C4LC01033G
39. Zhu H., Fohlerova Z., Pekarek J., Basova E., Neuzil P. Recent advances in lab-on-a-chip technologies for viral diagnosis. *Biosens. Bioelectron.*, 2020, vol. 153, article ID 112041. DOI: 10.1016/j.bios.2020.112041
40. Hsieh K., Patterson A.S., Ferguson B.S., Plaxco K.W., Soh H.T. Rapid, sensitive, and quantitative detection of pathogenic DNA at the point of care through microfluidic electrochemical quantitative loop-mediated isothermal amplification. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 2012, vol. 51, pp. 4896–4900. DOI: 10.1002/anie.201109115
41. Ahmed M.U., Saito M., Hossain M.M., Rao S.R., Furui S., Hino A., Takamura Y., Takagi M., Tamiya E. Electrochemical genosensor for the rapid detection of GMO using loop-mediated isothermal amplification. *Analyst*, 2009, vol. 134, pp. 966–972. DOI: 10.1039/b812569d
42. Ahmed M.U., Nahar S., Safavieh M., Zourob M. Real-time electrochemical detection of pathogen DNA using electrostatic interaction of a redox probe. *Analyst*, 2013, vol. 138, pp. 907–915. DOI: 10.1039/C2AN36153A

43. Chuang T.L., Wei S.C., Lee S.Y., Lin C.W. A polycarbonate based surface plasmon resonance sensing cartridge for high sensitivity HBV loop-mediated isothermal amplification. *Biosens. Bioelectron.*, 2012, vol. 32, pp. 89–95. DOI: 10.1016/j.bios.2011.11.037
44. LaBarre P., Gerlach J., Wilmoth J., Beddoe A., Singleton J., Weigl B. Noninstrumented nucleic acid amplification (NINA): instrument-free molecular malaria diagnostics for low-resource settings. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc.*, 2010, vol. 2010, pp. 1097–1099. DOI: 10.1109/IEMBS.2010.5627346
45. LaBarre P., Hawkins K.R., Gerlach J., Wilmoth J., Beddoe A., Singleton J., Boyle D., Weigl B. A simple, inexpensive device for nucleic acid amplification without electricity — toward instrument-free molecular diagnostics in low-resource settings. *PLoS One*, 2011, vol. 6, no. 5, article ID e19738 (8 p.). DOI: 10.1371/journal.pone.0019738
46. Liu C., Mauk M.G., Hart R., Qiu X.B., Bau H.H. A self-heating cartridge for molecular diagnostics. *Lab Chip*, 2011, vol. 11, pp. 2686–2692. DOI: 10.1039/c1lc20345b
47. Song J., Pandian V., Mauk M.G., Bau H.H., Cherry S., Tisi L.C., Liu C. Smartphone-based mobile detection platform for molecular diagnostics and spatiotemporal disease mapping. *Anal. Chem.*, 2018, vol. 90, no. 7, pp. 4823–4831. DOI: 10.1021/acs.analchem.8b00283
48. Wang J., Cai K., Zhang R. et al. Novel one-step single-tube nested quantitative real-time PCR assay for highly sensitive detection of SARS-CoV-2. *Anal. Chem.*, 2020, vol. 92, no. 13, pp. 9399–9404. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c01884
49. Li Q., Guan X., Wu P., et al. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus — Infected Pneumonia. *N Engl J Med*, 2020, vol. 382, pp. 1199–1207.
50. Guan W.J., Ni Z.Y., Hu Y. et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *N Engl J Med.*, 2020, vol. 382, pp. 1708–1720.
51. Carter L.J., Garner L.V., Smoot J.W., et al. Assay techniques and test development for COVID-19 diagnosis. *ACS Cent. Sci.*, 2020, vol. 6, no. 5, pp. 591–605. DOI: 10.1021/acscentsci.0c00501
52. Udugama B., Kadhiresan P., Kozlowski H.N., et al. Diagnosing COVID-19: the disease and tools for detection. *ACS Nano*, 2020, vol. 14, no. 4, pp. 3822–3835. DOI: 10.1021/acsnano.0c02624
53. Feng W., Newbigging A.M., Le C. et al. molecular diagnosis of COVID-19: challenges and research needs. *Anal. Chem.*, 2020, vol. 92, no. 15, pp. 10196–10209. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c02060
54. Corman V.M., Landt O., et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. *Euro Surveill*, 2020, vol. 25, no. 3, article ID 2000045.
55. Liu R., Han H., Liu F., Lv Z., Wu K., Liu Y., Feng Y., Zhu C. Positive rate of RT-PCR detection of SARS-CoV-2 infection in 4880 cases from one hospital in Wuhan, China, from Jan to Feb 2020. *Clin. Chim. Acta*, 2020, vol. 505, pp. 172–175. DOI: 10.1016/j.cca.2020.03.009
56. 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, vol. 26, no. 6, pp. 773–779. DOI: 10.1016/j.cmi.2020.04.001
57. 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, vol. 66, no. 7, pp. 975–977. DOI: 10.1093/clinchem/hvaa102
58. 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, vol. 9, no. 1, pp. 998–1007.
59. 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. *Virologica Sinica*, 2020, vol. 35, pp. 344–347. DOI: 10.1007/s12250-020-00218-1
60. *Kak proveryayut na koronavirus: obzor testov* [How to check for coronavirus: a review of tests]. URL: https://ntinews.ru/in_progress/likbez/kak-proveryayut-na-koronavirus-obzor-testov.html (accessed 20.10.2020). (In Russ.).
61. *NABOR REAGENTOV "Amplizo-SARS-CoV-2"* ["Amplizo-SARS-CoV-2" REAGENT KIT]. URL: <http://www.syntol.ru/catalog/nabory-reagentov-dlya-ptsr-v-realnom-vremeni/amplizo-sars-cov-2.html> (accessed 20.10.2020).
62. Ganguli A., Mostafa A., Berger J., et al. Rapid isothermal amplification and portable detection system for SARS-CoV-2. *PNAS*, 2020, vol. 117, no. 37, pp. 22727–22735. DOI: 10.1073/pnas.2014739117
63. *FMBA Rossii predstavilo test-sistemy na osnove chipov dlya diagnostiki novoj koronavirusnoj infekcii SARS-CoV-2* [FMBA of Russia has presented chip-based test systems for diagnosing a new coronavirus infection SARS-CoV-2]. URL: https://fmba.gov.ru/press-sentr/novosti/detail/?ELEMENT_ID=38232&sphrase_id=12026 (accessed 20.10.2020). (In Russ.).
64. *"Indikator-BIO"* ["Indicator BIO"]. URL: <http://old.rsmu.ru/21025.html> (accessed 20.10.2020). (In Russ.).
65. Rateni G., Dario P., Cavallo F. Smartphone-based food diagnostic technologies: a review. *Sensors*, 2017, vol. 17, no. 6, article ID 1453 (22 p.). DOI: 10.3390/s17061453
66. Theuns S., Vanmechelen B., Bernaert Q., Deboutte W., Vandenhole M., Beller L., Matthijssens J., Maes P., Nauwincq H.J. Nanopore sequencing as a revolutionary diagnostic tool for porcine viral enteric disease complexes identifies porcine kobuvirus as an important enteric virus. *Scientific Reports*, 2018, vol. 8, no. 1, article ID 9830 (13 p.). DOI: 10.1038/s41598-018-28180-9