

Научный обзор

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-176>

Сравнительный анализ методов изотермической амплификации нуклеиновых кислот

Чемисова О.С., Цырулина О.А.[✉], Трухачев А.Л., Носков А.К.

Ростовский-на-Дону противочумный институт, Ростов-на-Дону, Россия

Аннотация

В обзоре рассмотрены и проанализированы методы изотермической амплификации нуклеиновых кислот, в частности петлевая изотермическая амплификация ДНК и РНК (LAMP/RT-LAMP), хеликазозависимая амплификация (HDA) и рекомбиназная полимеразная амплификация (RPA). Описаны преимущества и недостатки каждой технологии, оценена возможность их применения в молекулярной диагностике инфекционных болезней. Проведён краткий обзор литературы по использованию LAMP, HDA, RPA в диагностике вирусных, бактериальных инфекций и заболеваний протозойной этиологии. Показано, что метод LAMP имеет ряд преимуществ по сравнению с другими методами диагностики: высокую эффективность, специфичность, простоту, скорость постановки реакции и минимальные требования к приборному оснащению. Сделан вывод о том, что LAMP является перспективным методом в определении ДНК/РНК различных патогенов. Приведены данные о внедрении метода LAMP в диагностику особо опасных бактериальных и вирусных инфекций, в том числе для обнаружения РНК новой коронавирусной инфекции (SARS-CoV-2) в клинических образцах.

Ключевые слова: обзор, молекулярная диагностика, полимеразная цепная реакция, петлевая изотермическая амплификация ДНК и РНК, хеликазозависимая амплификация, рекомбиназная полимеразная амплификация

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Чемисова О.С., Цырулина О.А., Трухачев А.Л., Носков А.К. Сравнительный анализ методов изотермической амплификации нуклеиновых кислот. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2022;99(1):126–138.

DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-176>

Review article

<https://doi.org/10.36233/0372-9311-176>

Comparative analysis of methods for isothermal amplification of nucleic acids

Olga S. Chemisova, Oksana A. Tsyulina[✉], Alexey L. Trukhachev, Alexey K. Noskov

Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russia

Annotation

In this review, methods for isothermal amplification of nucleic acids are considered and analyzed, in particular, loop isothermal amplification of DNA and RNA (LAMP/RT-LAMP), helicase-dependent amplification (HDA) and recombinase polymerase amplification (RPA). The advantages and disadvantages of each of the techniques are described. The possibility of their application in the molecular diagnostics of infectious diseases is evaluated. A brief review of the literature on the use of LAMP, HDA, RPA in the diagnostics of viral, bacterial infections and diseases of protozoal etiology was conducted. It has been shown that the LAMP method has a number of advantages over other diagnostic methods: high efficiency, specificity, simplicity, turnaround time and minimum requirements for instrument equipment. As a result, it is concluded that loop isothermal amplification is a promising method for detecting the DNA/RNA of various pathogens. The data on the introduction of the LAMP method in the diagnostics of particularly dangerous bacterial and viral infections, including for the detection of RNA of a new coronavirus infection (SARS-CoV-2) in clinical samples, are presented.

Keywords: review, molecular diagnostics, polymerase chain reaction, loop mediated isothermal amplification of DNA/RNA, helicase-dependent amplification, recombinase polymerase amplification

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Chemisova O.S., Tsyulina O.A., Truhachev A.L., Noskov A.K. Comparative analysis of methods for isothermal amplification of nucleic acids. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology = Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2022;99(1):126–138.
DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-176>

Введение

Молекулярно-генетические методы занимают особое место в диагностике и эпидемиологическом надзоре за инфекционными заболеваниями, т.к. отличаются преимущественно высокой специфичностью, чувствительностью и экспрессностью. Использование молекулярно-генетических подходов, основанных, в частности, на амплификации нуклеиновых кислот, особенно актуально и эффективно в случаях, когда возбудитель относится к группе трудно культивируемых или некультивируемых, а также присутствует в малом количестве. Модернизация лабораторной диагностики инфекционных заболеваний предусматривает внедрение современных высокотехнологичных методов индикации и идентификации возбудителей [1].

На сегодняшний день одним из ключевых методов идентификации патогенов и диагностики инфекционных заболеваний является полимеразная цепная реакция (ПЦР). ПЦР — это метод молекулярной биологии, который позволяет добиться значительного увеличения малых концентраций определённых фрагментов нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) в биологическом материале. Этот процесс включает этап денатурации (разделение двухцепочечной ДНК при высокой температуре на одноцепочечные), который обычно достигается при 95–97°C, этап отжига (отжиг праймеров до одноцепочечной ДНК) и копирование одноцепочечных ДНК-цепей для создания новой двухцепочечной ДНК (этап удлинения, который требует ДНК-полимеразы) [2]. ПЦР, помимо амплификации ДНК, позволяет производить также большое количество других манипуляций с нуклеиновыми кислотами (введение мутаций, сращивание фрагментов ДНК), в связи с чем широко используется в биологической и медицинской практике [3]. Разработанный в 1983 г. Кэри Мюллисом метод ПЦР постоянно совершенствуется и обсуждается на страницах научных журналов [4]. Однако у данного метода при всех очевидных преимуществах есть существенные недостатки. А именно потребность в специализированном лабораторном дорогостоящем оборудовании (термоциклере-амплификаторе, камере для электрофореза и т.д.), что ограничивает его использование в небольших диагностических лабораториях. Процедура анализа занимает длительное время. В связи с этим

была разработана группа методов изотермической амплификации нуклеиновых кислот.

Целью данного обзора является анализ изотермических методов амплификации, альтернативных ПЦР, и оценка перспектив их применения в диагностике и системе эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями.

Изотермические методы амплификации нуклеиновых кислот

К настоящему времени в литературе описано большое количество изотермических методов амплификации нуклеиновых кислот. Самыми распространёнными среди них, на которых остановимся подробнее, являются петлевая изотермическая амплификация ДНК и РНК, хеликазозависимая амплификация и рекомбиназная полимеразная амплификация.

Петлевая изотермическая амплификация

Наиболее перспективной является петлевая изотермическая амплификация ДНК и РНК (Loop mediated isothermal amplification — LAMP и reverse transcription-coupled — RT-LAMP)¹. Понятие «изотермическая» означает, что реакция идет при постоянной температуре [5]. Метод LAMP позволяет провести то же исследование, что и с помощью ПЦР, но значительно быстрее, специфичнее, не требует дорогого приборного оснащения и квалифицированного персонала.

Методика постановки LAMP была разработана японским учёным Tsugunori Notomi и соавт. в 2000 г. [6]. Для проведения данной реакции было предложено использовать 4 или 6 (в более поздней модификации) олигонуклеотидных праймера, что позволяет значительно повысить специфичность реакции, и фермент *Bst*-полимеразу, которая является большой субъединицей ДНК-полимеразы *Bacillus stearothermophilus* и отличается сильной вытесняющей активностью. Амплификация методом LAMP включает следующие стадии: образова-

¹ SkyGen. #28 Петлевая изотермическая амплификация ДНК и РНК (LAMP и RT-LAMP): решения New England Biolabs. Available at: https://www.skygen.com/podderzhka/obzory/28_izotermicheskaya_amplifikatsiyaresheniya_ot_new_england_biolabs

ние базовой гантелеобразной структуры (с петлями на обоих концах), циклическую амплификацию и стадию элонгации и повторения циклов [7, 8]. Метод LAMP, подобно ПЦР, использует термостабильную полимеразу. Было показано, что *Bst*-полимераза нестабильна и быстро выходит из строя при 95°C. Однако она вымещает вторую цепь ДНК без участия ферментов и использования высоких температур, что является большим преимуществом перед Taq-полимеразой. Использование *Bst*-полимеразы в данном методе позволяет проводить реакцию значительно быстрее, т.к. исключается потребность в первом шаге цикла. LAMP проводится при постоянной температуре, обычно около 65°C, поскольку это температурный оптимум *Bst*-полимеразы. Также при этой температуре двухцепочечная ДНК уже менее стабильна, что облегчает посадку праймеров.

Реакция подразумевает использование 4 праймеров (2 внутренних и 2 внешних), специфичных к 6 различным участкам искомой ДНК. Наружные праймеры: F3 — прямой наружный праймер, который комплементарен участку F3с, B3 — обратный наружный праймер, комплементарный участку B3с

(длина 15–25 нуклеотидов). Внутренние праймеры: FIP — прямой внутренний праймер длиной до 50 нуклеотидов, состоящий из 2 частей, F1с(5') и F2(3'), комплементарных участкам F1 и F2с соответственно, и BIP — обратный внутренний праймер из двух частей, B1с(5') и B2(3'), которые комплементарны участкам B1 и B2с. Внутренние праймеры подобраны так, чтобы сформировать петли на концах искомого фрагмента. Для этого к 5'-концу праймера F2 прикреплена вторая часть, комплементарная F1 части матрицы, — F1с. В результате, как только новая цепь ДНК остаётся одна, из-за вымещающей активности *Bst*-полимеразы её конец тут же замыкается в петлю. То же происходит и с праймерами, садящимися на противоположный конец матрицы. В итоге появляется одноцепочечный фрагмент ДНК с петлями с обеих сторон — гантелевидная структура. На этом завершается первая стадия LAMP. Указанная структура служит матрицей для дальнейшей амплификации, в результате которой менее чем за час генерируется до 10⁹ копий целевого фрагмента ДНК. Продукт амплификации представляет собой петлевые структуры ДНК с несколькими инвертированными повторами мишени, собранными во

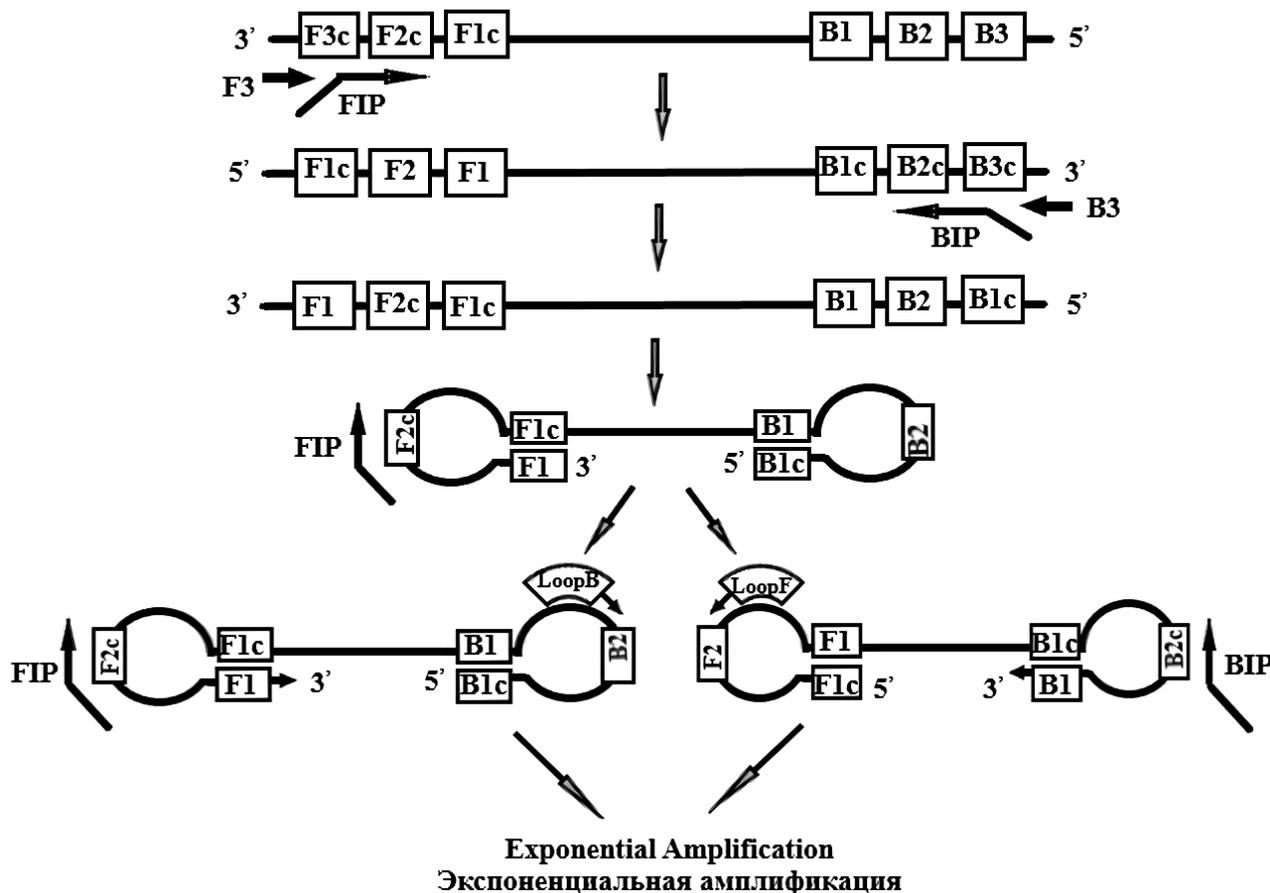


Рис. 1. Схема LAMP.

Fig. 1. Schematic representation of the LAMP.

множественные петли (подобно цветной капусте). Внешние праймеры F3 и B3 необходимы только в самом начале реакции для разделения двух материнских цепей (рис. 1).

Уже через 2 года авторы LAMP в целях ускорения реакции усовершенствовали разработанный метод путём добавления ещё одной пары праймеров LoopF и LoopB, так называемых «петлевых праймеров» (loop-primers), которые комплементарны последовательностям между участками F1 и F2, а также B1- и B2-фрагментам-мишени. Они вступают в реакцию на третьей стадии, отжигаясь на одноцепочечных участках образовавшихся ранее петель ДНК и становясь дополнительными центрами инициации полимеризации. Это повышает чувствительность реакции и уменьшает время её проведения: продукт можно детектировать всего через 10–15 мин после начала реакции [9].

Модификацией реакции LAMP является вариант метода с обратной транскрипцией (RT-LAMP). В этом случае в качестве матрицы используется РНК, а в реакционную смесь добавляется обратная транскриптаза, что позволяет детектировать широкий спектр РНК-содержащих патогенов. RT-LAMP уже успешно применяется для обнаружения РНК-вирусов, в том числе SARS-CoV-2 [10].

Успех в разработке тест-систем на основе LAMP зависит от правильного дизайна праймеров, определения их оптимальных концентраций, подбора нужной концентрации ионов магния, подходящей температуры реакции и буфера [11]. Для конструирования праймеров на основе известной последовательности нуклеотидов компания «Eiken» (Япония) создала интернет-сервис Primer Explorer². На этом же ресурсе представлено руководство с требованиями к LAMP-праймам [12]. Температуру плавления подбирают равной 55–63°C для праймеров F3, B3 и для участков F2 и B2 праймеров FIP и BIP. Для фрагментов F1c и B1c праймеров FIP и BIP (именно они формируют шпильчатые структуры, с которых начинается синтез), а также для петлевых праймеров температуру плавления подбирают равной 60–68°C.

Также большое значение имеет выбранный метод детектирования продуктов реакции. Визуализация продуктов амплификации может быть осуществлена как в режиме реального времени, так и по конечной точке с помощью гель-электрофореза. В последнем случае агарозный гель окрашивают интеркалирующим флуоресцентным красителем, например бромистым этидием или SYBR Green I. Поскольку конечный продукт состоит из цепей различной длины с многочисленными петлями ДНК, электрофорез в агарозном геле определяет продук-

ты с минимальным количеством копий ДНК-мишени в загрузочной лунке. При этом видна характерная «лестница» — конкатемерные продукты различной длины. Однако этот способ относительно трудоёмок и занимает много времени [13].

Визуальное обнаружение ДНК методом LAMP может быть выполнено по окончании LAMP, если реакционную смесь окрасить интеркалирующим красителем (например, SYBR Green, бромистый этидий, пропидиум йодид, PicoGreen) и посмотреть на неё в ультрафиолетовом свете. За изменением флуоресценции окрашенной реакционной смеси можно следить прямо в ходе процесса с помощью real-time амплификатора или специального real-time флуориметра [14]. Некоторые исследователи используют для real-time LAMP/RT-LAMP не красители, а различные варианты FIP или BIP флуоресцентных зондов. В частности, для мультиплексной real-time LAMP/RT-LAMP были предложены FIP/BIP DARQ-зонды [15].

Протекание реакции можно оценить и по другим признакам. В ходе синтеза ДНК в результате гидролиза нуклеозидтрифосфатов получается пирофосфат, который образует белый осадок с присутствующими в буфере ионами магния. Поскольку в ходе реакции LAMP образуется большое количество ДНК, то и побочного продукта (пирофосфата) тоже много. Благодаря этому помутнение реакционной смеси видно невооружённым глазом. Количество образующегося пирофосфата магния пропорционально количеству синтезированной ДНК, поэтому, измеряя концентрацию пирофосфата, можно судить о концентрации ДНК. Был даже разработан специальный прибор — турбидиметр, который позволяет по мутности проводить количественную оценку в реальном времени [16].

Побочными продуктами ферментативного синтеза ДНК, кроме ионов пирофосфата, являются протоны (ионы водорода). И если используемый буфер обладает не очень большой ёмкостью, pH раствора может заметно сдвинуться в кислую сторону. Такое значительное изменение pH сделало возможным детектирование с помощью pH-чувствительных индикаторов. В качестве pH-чувствительных красителей могут быть использованы феноловый, крезоловый или нейтральный красный, которые при добавлении в реакционную смесь меняют свой цвет [17].

Основными преимуществами метода LAMP являются (в сравнении с ПЦР):

- простота в исполнении и дешевизна (в отличие от других методов изотермической амплификации);
- окончательный результат за 5–20 мин, не считая времени на выделение и реверсию [18];
- LAMP более специфичен, потому что для реакции используется целых 4 или 6 праймеров, а в ПЦР — только два;

² LAMP primer designing software:
URL: <http://primerexplorer.jp/e>

- в случае визуальной детекции продуктов амплификации не требуется сложной техники и оборудования;
- на LAMP не оказывает влияния присутствие биологических компонентов, зачастую не позволяющих провести ПЦР. Исследуемый образец можно заносить в реакционную смесь без очистки [19].

Несмотря на очевидные достоинства метода LAMP, имеющего большие перспективы в качестве инструмента обнаружения вирусных и бактериальных нуклеиновых кислот, метод имеет ряд ограничений. Существенным недостатком является сложность, связанная с конструированием праймеров, т.к. необходимо подобрать сразу 6–8 участков на достаточно коротком фрагменте ДНК и избежать при этом амплифицирования других (нежелательных) её последовательностей, особенно в геноме хозяина, что существенно ограничивает выбор целевых участков. Другая проблема связана с оптимизацией условий данной реакции, т.к. рекомендации относительно оптимизации изотермических реакций амплификации подробно не разработаны, в отличие от ПЦР [20]. Факторами, влияющими на скорость и аналитическую чувствительность изотермических реакций амплификации, являются одновременное использование нескольких ферментов, большое количество этапов отжига праймеров и отсутствие многократных этапов денатурации [21]. LAMP менее универсален, чем ПЦР, он не пригоден для многих приложений молекулярной биологии. Подходы к мультиплексированию для LAMP менее развиты, чем для ПЦР. Большее число праймеров на мишень увеличивает вероятность взаимодействий праймер–праймер для мультиплексированных наборов мишеней. Имеются ограничения, связанные с трудностями в специфической детекции продуктов амплификации ДНК, хотя предложены различные стратегии для преодоления ложноположительных результатов [10]. Также необходимо указать на ограниченность предложений на российском рынке реагентов отечественного производства для реакции петлевой изотермической амплификации.

Хеликазозависимая амплификация

В 2004 г. сотрудники компании «New England Biolabs» предложили альтернативу ПЦР — хеликазозависимую амплификацию (helicase-dependent amplification, HDA), в которой этап тепловой денатурации для разделения двухцепочечных ДНК исключается за счёт использования хеликаз, способных разрушать водородные связи [22].

На первом этапе фермент хеликаза разделяет нити двухцепочечной ДНК. Присутствие в реакционной смеси белка MutL стимулирует активность хеликазы, а белок SSB (single-stranded binding protein), связывающийся с одноцепочечными ДНК,

предотвращает регибридизацию уже «расплетённых» хеликазой молекул. На следующем этапе два специфичных праймера отжигаются со свободными однонитевыми молекулами ДНК, а ДНК-полимераза удлиняет их, синтезируя новые двунитевые цепи ДНК-мишени. Вновь синтезированные дуплексы ДНК затем вновь используются в качестве субстратов для ДНК-хеликаз, вступая в следующий раунд реакции, и цикл повторяется. Таким образом развивается одновременная цепная реакция, приводящая к экспоненциальной амплификации выбранной целевой последовательности (**рис. 2**). Реакция проходит при 37°C [23, 24].

Способы детекции продуктов реакции HDA различны. Обычно продукты HDA могут быть визуализированы в режиме реального времени с помощью флюоресценции или электрофореза в агарозном геле. Кроме того, применяются латеральные проточные методы, биочипы и электрохимические биосенсоры.

Праймеры для HDA могут быть разработаны с использованием программы «PrimerQuestSM» («Integrated DNA Technologies»). А для конструирования праймеров обратной транскрипции HDA (RT-HDA) могут быть использованы программы «Primer3»³ и «Primer3web»⁴ [25].

Достоинства метода HDA:

- быстрый и чувствительный метод амплификации нуклеиновой кислоты конкретной мишени при изотермической температуре, который не требует термоциклера (за счёт исключения стадии высокотемпературной денатурации);
- простая схема реакции по сравнению с другими изотермическими методами амплификации;
- по некоторым данным, HDA улавливает в пробе меньшую концентрацию целевой ДНК, чем LAMP [26].

Однако у этого метода есть и недостатки:

- максимальный размер амплифицируемого фрагмента не превышает 120 п.н. А если использовать хелимеразу (особым образом сшитые Tte-UvrD и *Bst*-полимераза), созданную компанией «BioHelix», то размер амплифицируемого фрагмента увеличивается до 1,5 т.п.н.;
- необходимость оптимизации праймеров, а иногда и буферов. Обычно оптимизация праймера и буфера проверяется и достигается с помощью ПЦР, в связи с чем возникает вопрос о необходимости дополнительных затрат на отдельную систему для фактической амплификации;

³ Primer3Plus. URL: <http://primer3plus.com>

⁴ Primer3web. URL: <http://primer3.ut.ee>

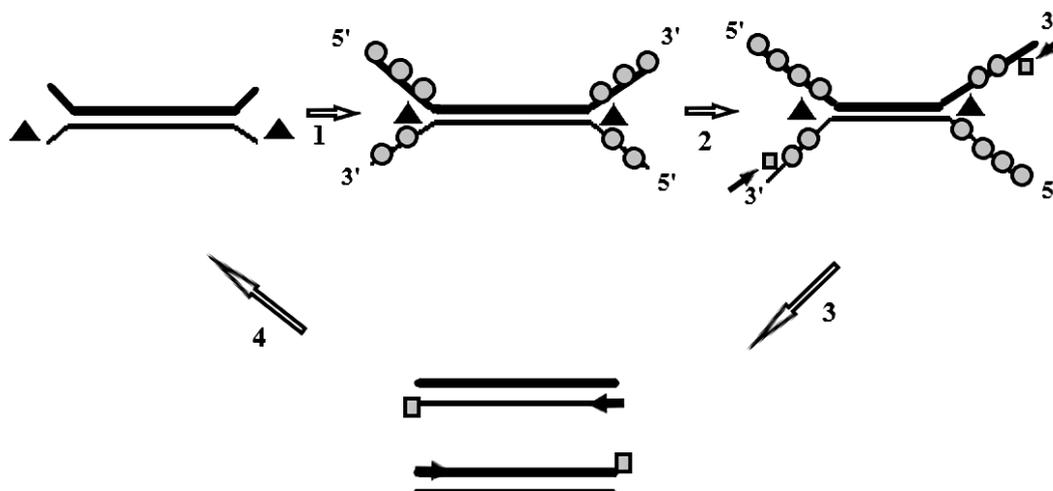


Рис. 2. Схема реакции HDA.

1 — хеликаза разделяет дуплексы ДНК в присутствии SSB и вспомогательных белков; 2 — отжиг праймеров; 3 — одонитевые молекулы ДНК амплифицируются до двух с помощью ДНК-полимеразы; 4 — синтезированные дуплексы ДНК снова вступают в реакцию, и цикл повторяется.

Fig. 2. Schematic diagram of HDA.

1 — helicases unwind DNA duplexes in the presence of SSB and accessory protein; 2 — primers anneal to DNA; 3 — DNA polymerases extend the primers, one duplex is amplified to two duplexes; 4 — DNA are separated by helicases and this chain reaction repeats itself.

- массовая диагностика большого количества образцов ещё не может быть достигнута с помощью HDA;
- стоимость приобретения реагентов для HDA относительно высока по сравнению с реагентами для ПЦР;
- большая часть работы, необходимой для обнаружения потенциально опасных микроорганизмов с использованием метода, выполняется в условиях лаборатории [27].

Рекомбиназная полимеразная амплификация

В 2006 г. британским учёным Найлом Армсом из биотехнологической компании «TwistDX Ltd.» был разработан метод рекомбиназной полимеразной амплификации (recombinase polymerase amplification, RPA) [28].

RPA — это новая изотермическая технология амплификации и детекции ДНК, которая позволяет амплифицировать ДНК в течение 30 мин при постоянной температуре 37–42°C путём моделирования *in vivo* рекомбинации ДНК. Данный метод был использован для амплификации различных мишеней, включая RNA, miRNA, ssDNA и dsDNA, из широкого спектра организмов и образцов.

В RPA используют большой фрагмент *Bsu*-полимеразы (ДНК-полимеразы *Bacillus subtilis*), SSB-белки gp32 фага T4 и его же рекомбиназу *UvsX*, а также два противоположных праймера, подобно ПЦР. Часть молекул рекомбиназы связывают с одним праймером, часть — с другим. После внесения в реакционную смесь такие молекулы сканируют ДНК в поисках комплементарных праймеру участ-

ков и, найдя их, инициируют процесс расплетения двухцепочечной молекулы и присоединения праймера. Расплетённую ДНК стабилизируют SSB-белки, а полимеразы начинают синтез. Процесс АТФ-зависимый, поскольку энергия нужна для освобождения 3'-конца праймера от молекул рекомбиназы. Размер амплифицируемого фрагмента ограничивается тысячей пар нуклеотидов, а минимальная длина праймера должна быть 30 нуклеотидов для повышения его специфичности [29]. Если мы имеем дело с РНК-матрицей, то описанную смесь реагентов дополняет обратная транскриптаза, превращающая реакцию в RT-RPA.

Хотя первоначально считалось, что для RPA необходимы специально разработанные праймеры длиной 30–35 оснований, есть несколько сообщений, демонстрирующих, что можно использовать обычные ПЦР-праймеры и достичь эффективной амплификации [30, 31]. По сравнению с ПЦР, рекомендации по конструированию праймеров и зондов для RPA менее известны.

RPA проводится как в гомогенной, так и в гетерогенной среде. Метод позиционируется как наиболее быстрый среди прочих методов амплификации. Описано использование RPA для определения различных патогенов в сочетании с различными методами детекции продуктов амплификации ДНК [32, 33].

RPA может проводиться в присутствии ингибиторов ПЦР, таких как гепарин, этанол и гемоглобин. Это, в отличие от ПЦР, позволяет проводить амплификацию непосредственно в биологических образцах (молоко, моча, кал, плевральная жидкость) после предварительного термического ли-

зиса. Несмотря на то что RPA — метод быстрый и чувствительный, высокое значение фонового сигнала часто является проблемой при его использовании. Стадия расщепления с помощью эндонуклеазы в RPA служит дополнительным этапом, позволяющим уменьшить фоновый сигнал [34].

J. Gootenberg и соавт. объединили аллель-специфическую сенсорную способность CRISPR-Cas13a (кластеризованные регулярно чередующиеся короткие палиндромные повторы) с RPA для обнаружения специфических последовательностей РНК и ДНК [35]. Этот новейший метод диагностики, получивший название SHERLOCK (Specific High sensitivity Enzymatic Reporter unLOCKing) дает уникальную возможность детектировать отдельные молекулы полинуклеотидов с помощью системы в виде бумажной тест-полоски, которую можно опустить в исследуемый образец и по положению лиловых поперечных линий увидеть, обнаружена ли искомая молекула. Метод не требует специального оборудования, подходит для полевых условий. Система совместима как с ДНК, так и с РНК. Реакция протекает в изотермических условиях с оптимумом в 37–42°C, и единственный прибор, необходимый для работы, — флуориметр.

Метод SHERLOCK начинается со стадии амплификации (RPA или RT-RPA). Затем смесь олигонуклеотидов подвергается транскрипции с помощью T7 РНК-полимеразы, промотор которой содержится в праймерах, использованных в RPA. После 2 или 3 (в случае RT-RPA) реакций синтеза получается смесь нуклеиновых кислот, обогащенная молекулами РНК искомой последовательности. В качестве зонда выступает сРНК, часть последовательности которой комплементарна искомой последовательности полинуклеотида-мишени. Образовавшийся РНК-дуплекс активирует фермент нуклеазу Cas13a из *Leptotrichia wadei*. Связавшись с дуплексом сРНК-мишени, Cas13a начинает неспецифично резать свободные нуклеиновые кислоты, в том числе флюоресцентно меченные РНК-сенсоры. Разрушение РНК приводит к флюоресценции, которая легко детектируется флуориметром [35]. Этот метод может быть использован для выявления патогенов, генотипирования и мониторинга генетических заболеваний. Его можно легко и эффективно применять как в лаборатории, так и в полевых условиях [36].

Применение методов изотермической амплификации нуклеиновых кислот в молекулярной диагностике и системе эпидемиологического надзора за инфекционными заболеваниями

Учитывая, каким большим диагностическим потенциалом обладают методы изотермической амплификации нуклеиновых кислот, они успешно

применяются для выявления возбудителей вирусных и бактериальных инфекций.

Такие характеристики метода LAMP, как высокие эффективность, специфичность, простота и скорость постановки реакции, минимальные требования к приборному оснащению, позволяют использовать его в качестве скринингового метода в клинической лабораторной диагностике и в эпидемиологических исследованиях. В литературе описано применение LAMP для выявления генов широкого круга возбудителей бактериальных инфекций, в том числе особо опасных [37]. Так, в работе О. Mauboroda и соавт. LAMP был использован для определения ДНК *Y. pestis* [38].

Перспективность применения реакции изотермической амплификации в эпидемиологических исследованиях подтверждена при обнаружении гена *ompW* холерного вибриона в чистых культурах патогена, а также искусственно контаминированных образцах молока, испражнений и морской воды [39]. Также данный метод был апробирован в период вспышки холеры в Таиланде в 2000–2008 гг. при исследовании образцов материала от больных, контактировавших с ними лиц и здоровых волонтеров [40]. В 2008 г. W. Yamazaki и соавт. была произведена оценка применения LAMP для выявления токсигенных штаммов *V. cholerae* в реакции с набором из 6 праймеров, фланкирующих участок гена субъединицы А холерного токсина — *ctxA*, и детекцией в режиме real-time [41].

Системы детекции на основе LAMP разработаны для другого клинически значимого микроорганизма рода *Vibrio* — *Vibrio parahaemolyticus*. Показаны высокие чувствительность и специфичность реакции при анализе генов основных факторов патогенности паратегмолитического вибриона — прямого (*tdh*) и связанного (*trh*) термостабильных гемолизин [42].

И.Ю. Щит и соавт. была показана возможность использования петлевой изотермической амплификации ДНК с применением оригинальных праймеров, оптимизированных условий и термостабильного фермента ДНК-полимеразы для выявления и идентификации микроба *Bacillus anthracis* [43]. Авторами доказано, что реакция позволяет воспроизводимо выявлять мишени, специфичные для штаммов *B. anthracis*, на хромосомной и плазмидной ДНК без обнаружения перекрестных реакций со штаммами видов группы *B. cereus*. Однако в случае сложных для LAMP матриц, например ДНК *B. mallei* и *B. pseudomallei*, исследователи рекомендуют использовать для детекции метод real-time ПЦР [44].

С помощью LAMP диагностированы возбудители различных вирусных инфекций: лихорадка Западного Нила, лихорадка Денге, тяжелого острого респираторного синдрома (ТОРС), японского

энцефалита, тропической комариной лихорадки, герпеса, высокопатогенного гриппа А(Н5N1) и новой коронавирусной инфекции, вызванной SARS-CoV-2 [45].

Зарубежные исследования показали успешное применение LAMP для обнаружения РНК новой коронавирусной инфекции (SARS-CoV-2) в клинических образцах, демонстрируя высокие чувствительность и специфичность. Разработанный подход RT-LAMP для скрининга SARS-CoV-2, который требует только нагрева реакционной смеси при постоянной температуре и визуального контроля, облегчит диагностику этой инфекции не только в хорошо оборудованных лабораториях, но и в полевых условиях [46]. Учёными ЦНИИ Эпидемиологии на основе метода LAMP была разработана тест-система для выявления нуклеиновых кислот возбудителя SARS-CoV-2⁵. Тест полностью адаптирован для использования на базе реагентов отечественного производства.

С помощью LAMP можно проводить диагностику не только бактериальных и вирусных инфекций, но и заболеваний, вызываемых простейшими. Например, в исследовании В. Poschl и соавт., где в качестве метода сравнения был использован метод ПЦР, специфичность LAMP для идентификации *Plasmodium falciparum* составила 100% [47], что говорит об оправданности применения метода LAMP [48].

RPA также является инструментом для быстрой, специфической и экономически эффективной идентификации различных патогенов. Данный метод также применяется в сельском хозяйстве для обнаружения трансгенов и выявления паразитов. Так Y. Wu и соавт. разработали способ обнаружения ооцист *Toxoplasma gondii* в почве и воде, который основан на реакции RPA в сочетании с анализом бокового потока (LF) [49]. Было доказано, что метод B1-LF-RPA достаточно толерантен к существующим ингибиторам в окружающей среде. Кроме того, такие преимущества, как простота, скорость и экономичность, делают B1-LF-RPA перспективным молекулярным инструментом для обнаружения *T. gondii* в исследуемом материале.

Метод RPA нашел широкое применение для диагностики возбудителей различных инфекций. Так, К. Shahin и соавт. оптимизировали метод рекомбинантной полимеразной амплификации для быстрого обнаружения *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis* в морепродуктах [50]. В итоге данная технология показала высокую специфичность

без перекрёстного обнаружения близкородственных *Francisella* spp. и других тестируемых бактерий. Xin-jun Du и соавт. предлагают использовать RPA для быстрой и надёжной детекции *Listeria monocytogenes* в пищевых продуктах [51]. W. Jiang и соавт. оптимизировали RPA и анализ бокового потока в сочетании с иммуномагнитной сепарацией для идентификации *V. parahaemolyticus* в сырых устрицах [52]. Благодаря высокой чувствительности, специфичности и скорости анализа разработанный метод открывает новый путь для быстрого скрининга *V. parahaemolyticus* в морепродуктах.

Диагностическая система SHERLOCK, основанная на работе системы CRISPR-Cas13a в сочетании с RPA, была эффективно использована для обнаружения специфических штаммов вируса Зика и Денге [36].

В литературе описано применение HDA в клинической диагностике для выявления различных инфекций бактериальной и вирусной природы, а также для обследования объектов окружающей среды. На основе HDA разработаны тесты для обнаружения в исследуемом материале *Staphylococcus aureus* и MRSA (метициллинрезистентный *S. aureus*), *Clostridium difficile*, ВИЧ, *Herpes simplex*, *Chlamydia trachomatis* и *Neisseria gonorrhoea* с детекцией результатов при использовании специальных кассет [53–55]. Главной составляющей кассеты является тест-полоска с иммобилизованными реагентами, которые в случае положительного результата образуют окрашенные полосы.

Технология HDA в сочетании с электрохимической детекцией сигнала была использована для количественного определения бактерий рода *Salmonella* [56], а в сочетании с латеральным проточным методом — для определения *Salmonella typhimurium* в воде [57]. Кроме детекции патогенов, HDA был успешно использован при разработке флюоресцентного метода анализа микроРНК как перспективных онкомаркеров [58].

Заключение

Высокочувствительное тестирование нуклеиновых кислот имеет важное значение для усовершенствования идентификации патогенов, которые представляют серьёзную угрозу для здоровья населения. Доступные в настоящее время молекулярные анализы, основанные преимущественно на ПЦР, имеют ограничения при работе в полевых условиях или условиях недостаточности ресурсов. Следовательно, существует большой интерес к разработке экономически эффективных, надёжных и портативных платформ для раннего обнаружения патогенов. Изотермические методы амплификации нуклеиновых кислот становятся перспективной альтернативой ПЦР и значительно упрощают реализацию методов амплификации.

⁵ Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. Роспотребнадзор разработал инновационный высокоточный тест для экспресс-диагностики COVID-19. Available at: https://www.rosпотребнадзор.ru/region/rss/rss.php?ELEMENT_ID=16811

При сравнении эффективности LAMP, RPA, и HDA можно сделать вывод, что каждый из методов имеет свои сильные и слабые стороны, которые могут варьироваться в зависимости от поставленной цели и задач. В настоящее время разработаны диагностические тесты на основе этих технологий для детекции ДНК широкого круга бактериальных и вирусных патогенов, в том числе ряда возбудителей особо опасных инфекций. Несмотря на имеющиеся ограничения этих методов (проблемы с конструированием праймеров, сложности с мультиплексированием, трудности в специфической детекции продуктов амплификации ДНК и т.д.), преимущества их использования значительны. Это прежде всего простота применения, высокие специфичность (благодаря использованию большего числа праймеров), результативность и скорость (отсутствие затрат времени на термоциклирование), экономическая эффективность (не требует использования дорогостоящего оборудования) и простая визуальная детекция результатов реакции.

Анализ данных литературы указывает на необходимость продолжения интенсивных научных исследований по оценке использования в лабораторной диагностике и усовершенствованию изотермических методов амплификации, а также по разработке на их основе высокочувствительных и высокоэффективных методов анализа, необходимых для практического применения.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

- Онищенко Г.Г., Ежлова Е.Б., Дёмина Ю.В., Мельникова А.А. О мерах по совершенствованию эпидемиологического надзора в части индикации возбудителей инфекционных заболеваний. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы*. 2013; (2): 4–13.
- Зорина В.В. *Основы полимеразной цепной реакции*. М.: ДНК-технология; 2012.
- Bartlett J.M., Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol. Biol.* 2003; 226: 3–6. <https://doi.org/10.1385/1-59259-384-4:3>
- Mullis K. B. Process for amplifying, detecting, and/or-cloning nucleic acid sequences. U.S. Patent 4 683 195; 1987.
- Зубик А.Н., Рудницкая Г.Е., Евстапов А.А. Изотермическая петлевая амплификация LAMP в формате микрочипов (Обзор). *Научное приборостроение*. 2021; 31(1): 3–43. <https://doi.org/10.18358/np-31-1-i343>
- Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(12): E63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
- Миронова Л.В., Адельшин Р.В., Бикетов С.Ф., Щит И.А., Дятлов И.А., Балахонов С.В. Петлевая изотермическая амплификация ДНК: принцип метода и перспективы применения в молекулярной диагностике холеры (Обзор). *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62(2): 120–4. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-2-120-124>
- Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat. Protoc.* 2008; 3(5): 877–82. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.57>
- Mori Y., Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J. Infect. Chemother.* 2009; 15(2): 62–9. <https://doi.org/10.1007/s10156-009-0669-9>
- Хафизов К.Ф., Петров В.В., Красовитов К.В., Золкина М.В., Акимкин В.Г. Экспресс-диагностика новой коронавирусной инфекции с помощью реакции петлевой изотермической амплификации (обзор). *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(1): 17–28. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-42>
- Wong Y.P., Othman S., Lau Y.L., Radu S., Chee H.Y. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *J. Appl. Microbiol.* 2018; 124(3): 626–43. <https://doi.org/10.1111/jam.13647>
- Shirshikov F.V., Pekov Y.A., Miroshnikov K.A. MorphoCatcher: a multiple-alignment based web tool for target selection and designing taxon-specific primers in the loop-mediated isothermal amplification method. *PeerJ*. 2019; 7: e6801. <https://doi.org/10.7717/peerj.6801>
- Iwamoto T., Sonobe T., Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis complex*, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(6): 2616–22. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.6.2616-2622.2003>
- Notomi T., Mori Y., Tomita N., Kanda H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J. Microbiol.* 2015; 53(1): 1–5. <https://doi.org/10.1007/s12275-015-4656-9>
- Tanner N.A., Zhang Y., Evans T.C. Jr. Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification. *Biotechniques*. 2012; 53(2): 81–9. <https://doi.org/10.2144/0000113902>
- Mori Y., Kitao M., Tomita N., Notomi T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2004; 59(2): 145–57. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2003.12.005>
- Becherer L., Borst N., Bakheit M. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) — review and classification of methods for sequence-specific detection. *Anal. Methods*. 2020; 12(6): 717–46. <https://doi.org/10.1039/C9AY02246E>
- Tanner N.A., Evans T.C. Jr. Loop-mediated isothermal amplification for detection of nucleic acids. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2014; 105: Unit 15.14. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1514s105>
- Shirato K., Yano T., Senba S., Akachi S., Kobayashi T., Nishinaka T., et al. Detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Virol. J.* 2014; 11: 139. <https://doi.org/10.1186/1743-422x-11-139>
- Khorosheva E.M., Karymov M.A., Selck D.A., Ismagilov R.F. Lack of correlation between reaction speed and analytical sensitivity in isothermal amplification reveals the value of digital methods for optimization: validation using digital real-time RT-LAMP. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(2): e10. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv877>
- Kimura Y., de Hoon M.J., Aoki S., Ishizu Y., Kawai Y., Kogo Y., et al. Optimization of turn-back primers in isothermal amplification. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(9): e59. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr041>
- Тупик А.Н., Рудницкая Г.Е., Лукашенко Т.А., Евстапов А.А. Хеликаза-зависимая изотермическая амплификация нуклеиновых кислот на микрофлюидном чипе. *Биотехнология*. 2018; 34(5): 77–85. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2018-34-5-77-85>
- Vincent M., Xu Y., Kong H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO Rep.* 2004; 5(8): 795–800. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400200>

ОБЗОРЫ

24. Chow W.H., McCloskey C., Tong Y., Hu L., You Q., Kelly C.P., et al. Application of isothermal helicase-dependent amplification with a disposable detection device in a simple sensitive stool test for toxigenic *Clostridium difficile*. *J. Mol. Diagn.* 2008; 10(5): 452–8.
<https://doi.org/10.2353/jmoldx.2008.080008>
25. Goldmeyer J., Kong H., Tang W. Development of a novel one-tube isothermal reverse transcription thermophilic helicase-dependent amplification platform for rapid RNA detection. *J. Mol. Diagn.* 2007; 9(5): 639–44.
<https://doi.org/10.2353/jmoldx.2007.070012>
26. Zahradnik C., Kolm C., Martzy R., Mach R.L., Krska R., Farnleitner A.H., et al. Detection of the 35S promoter in transgenic maize via various isothermal amplification techniques: a practical approach. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014; 406(27): 6835–42.
<https://doi.org/10.1007/s00216-014-7889-2>
27. Motré A., Li Y., Kong H. Enhancing helicase-dependent amplification by fusing the helicase with the DNA polymerase. *Gene.* 2008; 420(1): 17–22.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.04.017>
28. Kersting S., Rausch V., Bier F.F., Nickisch-Rosenegk M. Rapid detection of *Plasmodium falciparum* with isothermal recombinase polymerase amplification and lateral flow analysis. *Malar. J.* 2014; 13: 99. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-99>
29. Lobato I.M., O'Sullivan C.K. Recombinase polymerase amplification: basics, applications and recent advances. *Trends Anal. Chem.* 2018; 98: 19–35.
<https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015>
30. Martorell S., Palanca S., Maquieira A., Tortajada-Genaro L. A blocked recombinase polymerase amplification for mutation analysis of *PIK3CA* gene. *Anal. Biochem.* 2017; 544: 49–56.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.12.013>
31. Yamanaka E.S., Tortajada-Genaro L.A., Maquieira A. Low-cost genotyping method based on allele-specific recombinase polymerase amplification and colorimetric microarray detection. *Microchim. Acta.* 2017; 184: 1453–1462.
<https://doi.org/10.1007/s00604-017-2144-0>
32. Tsaloglou M.N., Nemiroski A., Camci-Unal G., Christodouleas D.C., Murray L.P., Connelly J.T., et al. Handheld isothermal amplification and electrochemical detection of DNA in resource-limited settings. *Anal. Biochem.* 2018; 543: 116–21.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.11.025>
33. Yang B., Kong J., Fang X. Bandage-like wearable flexible microfluidic recombinase polymerase amplification sensor for the rapid visual detection of nucleic acids. *Talanta.* 2019; 204: 685–92.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.06.031>
34. Бодулев О.Л., Сахаров И.Ю. Изотермические методы амплификации нуклеиновых кислот и их применение в биоанализе (Обзор). *Биохимия.* 2020; 85(2): 174–96.
<https://doi.org/10.31857/S0320972520020037>
35. Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Lee J.W., Essletzbichler P., Dy A.J., Joung J., et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science.* 2017; 356(6336): 438–42.
<https://doi.org/10.1126/science.aam9321>
36. Myhrvold C., Freije C.A., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Metsky H.C., Durbin A.F., et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science.* 2018; 360(6387): 444–8.
<https://doi.org/10.1126/science.aas8836>
37. Saharan P., Dhingolia S., Khatri P. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based detection of bacteria: Review. *Afr. J. Biotechnol.* 2014; 13(19): 1920–8.
<https://doi.org/10.5897/AJB2013.134459>
38. Mayboroda O., Gonzalez Benito A., Sabaté del Rio J., Svobodova M., Julich S., Tomaso H., et al. Isothermal solid-phase amplification system for detection of *Yersinia pestis*. *Anal. Bioanal. Chem.* 2016; 408(3): 671–6.
<https://doi.org/10.1007/s00216-015-9177-1>
39. Ke X.M., Chen Y.Y., Gao L.L., DU Z.P., Feng X.M., Liao R.Y., et al. Establishment and application of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Vibrio cholerae*. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2009; 29(10): 2059–63. (in Chinese)
40. Okada K., Chantaroj S., Taniguchi T., Suzuki Y., Roobthaisong A., Puiprom O., et al. A rapid, simple, and sensitive loop-mediated isothermal amplification method to detect toxigenic *Vibrio cholerae* in rectal swab samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2010; 66(2): 135–9.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.09.004>
41. Yamazaki W., Seto K., Taguchi M., Ishibashi M., Inoue K. Sensitive and rapid detection of cholera toxin-producing *Vibrio cholerae* using a loop-mediated isothermal amplification. *BMC Microbiol.* 2008; 8: 94.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-94>
42. Yamazaki W., Ishibashi M., Kawahara R., Inoue K. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *BMC Microbiol.* 2008; 8: 163.
<https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-163>
43. Цит И.Ю., Игнатов К.Б., Кудрявцева Т.Ю., Шишкова Н.А., Миронова Р.И., Маринин Л.И. и др. Использование петлевой изотермической амплификации ДНК для выявления и идентификации сибирязвенного микроба. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология.* 2017; 35(2): 69–76.
<https://doi.org/10.18821/0208-0613-2017-35-2-69-76>
44. Цит И.Ю., Игнатов К.Б., Бикетов С.Ф. Сравнительный анализ методов LAMP и ПЦР-РВ для обнаружения возбудителей сапа и мелиоидоза. *Клиническая лабораторная диагностика.* 2018; 63(6): 378–84.
<https://doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-378-384>
45. Жумина А.Г. Петлевая изотермическая амплификация нуклеиновых кислот: принцип и применение. *Вестник Карагандинского университета. Серия: Биология. Медицина. География.* 2015; 79(3): 37–43.
46. Kashir J., Yaqinuddin A. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19. *Med. Hypotheses.* 2020; 141: 109786.
<https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109786>
47. Pöschl B., Waneesorn J., Thekisoe O., Chutipongvivate S., Karanis P. Comparative diagnosis of malaria infections by microscopy, nested PCR, and LAMP in northern Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2010; 83(1): 56–60.
<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0630>
48. Gao X., Sun B., Guan Y. Pullulan reduces the non-specific amplification of loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Anal. Bioanal. Chem.* 2019; 411(6): 1211–8.
<https://doi.org/10.1007/s00216-018-1552-2>
49. Wu Y.D., Xu M.J., Wang Q.Q., Zhou C.X., Wang M., Zhu X.Q., et al. Recombinase polymerase amplification (RPA) combined with lateral flow (LF) strip for detection of *Toxoplasma gondii* in the environment. *Vet. Parasitol.* 2017; 243: 199–203.
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.06.026>
50. Shahin K., Gustavo Ramirez-Paredes J., Harold G., Lopez-Jimena B., Adams A., Weidmann M. Development of a recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of *Francisella noatunensis* subsp. *orientalis*. *PLoS One.* 2018; 13(2): e0192979.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192979>
51. Du X.J., Zang Y.X., Liu H.B., Li P., Wang S. Recombinase polymerase amplification combined with lateral flow strip for listeria monocytogenes detection in food. *J. Food Sci.* 2018; 83(4): 1041–7.
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.14078>
52. Jiang W., Ren Y., Han X., Xue J., Shan T., Chen Z., et al. Recombinase polymerase amplification-lateral flow (RPA-LF) assay combined with immunomagnetic separation for rapid visual detection of *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters. *Anal. Bioanal. Chem.* 2020; 412(12): 2903–14.
<https://doi.org/10.1007/s00216-020-02532-9>

53. An L., Tang W., Ranalli T.A., Kim H.J., Wytiaz J., Kong H. Characterization of a thermostable UvrD helicase and its participation in helicase-dependent amplification. *J. Biol. Chem.* 2005; 280(32): 28952–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.m503096200>
54. Jeong Y.J., Park K., Kim D.E. Isothermal DNA amplification *in vitro*: the helicase-dependent amplification system. *Cell Mol. Life Sci.* 2009; 66(20): 3325–36. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0094-3>
55. Chow W.H., McCloskey C., Tong Y., Hu L., You Q., Kelly C.P., et al. Application of isothermal helicase-dependent amplification with a disposable detection device in a simple sensitive stool test for toxigenic *Clostridium difficile*. *J. Mol. Diagn.* 2008; 10(5): 452–8. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2008.080008>
56. Barreda-García S., Miranda-Castro R., de-Los-Santos-Álvarez N., Miranda-Ordieres A.J., Lobo-Castañón M.J. Solid-phase helicase dependent amplification and electrochemical detection of *Salmonella* on highly stable oligonucleotide-modified ITO electrodes. *Chem. Commun. (Camb)*. 2017; 53(70): 9721–4. <https://doi.org/10.1039/c7cc05128j>
57. Tang R., Yang H., Gong Y., You M., Liu Z., Choi J.R., et al. A fully disposable and integrated paper-based device for nucleic acid extraction, amplification and detection. *Lab. Chip*. 2017; 17(7): 1270–9. <https://doi.org/10.1039/c6lc01586g>
58. Ma F., Liu M., Tang B., Zhang C.Y. Sensitive quantification of MicroRNAs by isothermal helicase-dependent amplification. *Anal. Chem.* 2017; 89(11): 6182–7. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01113>
10. Khafizov K.F., Petrov V.V., Krasovtsov K.V., Zolkina M.V., Akimkin V.G. Rapid diagnostics of novel coronavirus infection by loop-mediated isothermal amplification. *Voprosy virusologii.* 2021; 66(1): 17–28. <https://doi.org/10.36233/0507-4088-42> (in Russian)
11. Wong Y.P., Othman S., Lau Y.L., Radu S., Chee H.Y. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *J. Appl. Microbiol.* 2018; 124(3): 626–43. <https://doi.org/10.1111/jam.13647>
12. Shirshikov F.V., Pekov Y.A., Miroshnikov K.A. MorphoCatcher: a multiple-alignment based web tool for target selection and designing taxon-specific primers in the loop-mediated isothermal amplification method. *PeerJ*. 2019; 7: e6801. <https://doi.org/10.7717/peerj.6801>
13. Iwamoto T., Sonobe T., Hayashi K. Loop-mediated isothermal amplification for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex, *M. avium*, and *M. intracellulare* in sputum samples. *J. Clin. Microbiol.* 2003; 41(6): 2616–22. <https://doi.org/10.1128/jcm.41.6.2616-2622.2003>
14. Notomi T., Mori Y., Tomita N., Kanda H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): principle, features, and future prospects. *J. Microbiol.* 2015; 53(1): 1–5. <https://doi.org/10.1007/s12275-015-4656-9>
15. Tanner N.A., Zhang Y., Evans T.C. Jr. Simultaneous multiple target detection in real-time loop-mediated isothermal amplification. *Biotechniques*. 2012; 53(2): 81–9. <https://doi.org/10.2144/0000113902>
16. Mori Y., Kitao M., Tomita N., Notomi T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2004; 59(2): 145–57. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2003.12.005>
17. Becherer L., Borst N., Bakheit M. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) — review and classification of methods for sequence-specific detection. *Anal. Methods*. 2020; 12(6): 717–46. <https://doi.org/10.1039/C9AY02246E>
18. Tanner N.A., Evans T.C. Jr. Loop-mediated isothermal amplification for detection of nucleic acids. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2014; 105: Unit 15.14. <https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1514s105>
19. Shirato K., Yano T., Senba S., Akachi S., Kobayashi T., Nishinaka T., et al. Detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Virol. J.* 2014; 11: 139. <https://doi.org/10.1186/1743-422x-11-139>
20. Khorosheva E.M., Karymov M.A., Selck D.A., Ismagilov R.F. Lack of correlation between reaction speed and analytical sensitivity in isothermal amplification reveals the value of digital methods for optimization: validation using digital real-time RT-LAMP. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44(2): e10. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv877>
21. Kimura Y., de Hoon M.J., Aoki S., Ishizu Y., Kawai Y., Kogo Y., et al. Optimization of turn-back primers in isothermal amplification. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(9): e59. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr041>
22. Tupik A.N., Rudnitskaya G.E., Lukashenko T.A., Evstrapov A.A. Helicase-dependent isothermal amplification of nucleic acids on microfluidic array chip. *Biotechnologiya*. 2018; 34(5): 77–85. <https://doi.org/10.21519/0234-2758-2018-34-5-77-85> (in Russian)
23. Vincent M., Xu Y., Kong H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO Rep.* 2004; 5(8): 795–800. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400200>
24. Chow W.H., McCloskey C., Tong Y., Hu L., You Q., Kelly C.P., et al. Application of isothermal helicase-dependent amplification with a disposable detection device in a simple sensitive stool test for toxigenic *Clostridium difficile*. *J. Mol. Diagn.* 2008; 10(5): 452–8. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2008.080008>

REFERENCES

1. Onishchenko G.G., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Mel'nikova A.A. On measures to improve epidemiological surveillance in the indication of infectious pathogens. *Epidemiology and infectious diseases. Aktual'nye voprosy*. 2013; (2): 4–13. (in Russian)
2. Zorina V.V. *Fundamentals of the Polymerase Chain Reaction [Osnovy polimeraznoy tsepnoy reaktsii]*. Moscow: DNK-tehnologiya; 2012. (in Russian)
3. Bartlett J.M., Stirling D. A short history of the polymerase chain reaction. *Methods Mol. Biol.* 2003; 226: 3–6. <https://doi.org/10.1385/1-59259-384-4:3>
4. Mullis K. B. Process for amplifying, detecting, and/or-cloning nucleic acid sequences. U.S. Patent 4 683 195; 1987.
5. Zubik A.N., Rudnitskaya G.E., Evstrapov A.A. Loop-mediated isothermal amplification (lamp) technique in microdevice format (review). *Nauchnoe priborostroenie*. 2021; 31(1): 3–43. <https://doi.org/10.18358/np-31-1-i343> (in Russian)
6. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(12): E63. <https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
7. Mironova L.V., Adel'shin R.V., Biketov S.F., Shchit I.A., Dyatlov I.A., Balakhonov S.V. The loop mediated isothermal amplification of DNA: principle of method and perspectives of application in molecular diagnostic of cholera: publications review. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2017; 62(2): 120–4. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2017-62-2-120-124> (in Russian)
8. Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat. Protoc.* 2008; 3(5): 877–82. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.57>
9. Mori Y., Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J. Infect. Chemother.* 2009; 15(2): 62–9. <https://doi.org/10.1007/s10156-009-0669-9>

25. Goldmeyer J., Kong H., Tang W. Development of a novel one-tube isothermal reverse transcription thermophilic helicase-dependent amplification platform for rapid RNA detection. *J. Mol. Diagn.* 2007; 9(5): 639–44. <https://doi.org/10.2353/jmol dx.2007.070012>
26. Zahradnik C., Kolm C., Martzy R., Mach R.L., Krska R., Farnleitner A.H., et al. Detection of the 35S promoter in transgenic maize via various isothermal amplification techniques: a practical approach. *Anal. Bioanal. Chem.* 2014; 406(27): 6835–42. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-7889-2>
27. Motré A., Li Y., Kong H. Enhancing helicase-dependent amplification by fusing the helicase with the DNA polymerase. *Gene.* 2008; 420(1): 17–22. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.04.017>
28. Kersting S., Rausch V., Bier F.F., Nickisch-Rosenegk M. Rapid detection of *Plasmodium falciparum* with isothermal recombinase polymerase amplification and lateral flow analysis. *Malar. J.* 2014; 13: 99. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-99>
29. Lobato I.M., O'Sullivan C.K. Recombinase polymerase amplification: basics, applications and recent advances. *Trends Anal. Chem.* 2018; 98: 19–35. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015>
30. Martorell S., Palanca S., Maquieira A., Tortajada-Genaro L. A blocked recombinase polymerase amplification for mutation analysis of *PIK3CA* gene. *Anal. Biochem.* 2017; 544: 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.12.013>
31. Yamanaka E.S., Tortajada-Genaro L.A., Maquieira A. Low-cost genotyping method based on allele-specific recombinase polymerase amplification and colorimetric microarray detection. *Microchim. Acta.* 2017; 184: 1453–1462. <https://doi.org/10.1007/s00604-017-2144-0>
32. Tsaloglou M.N., Nemiroski A., Camci-Unal G., Christodouleas D.C., Murray L.P., Connelly J.T., et al. Handheld isothermal amplification and electrochemical detection of DNA in resource-limited settings. *Anal. Biochem.* 2018; 543: 116–21. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.11.025>
33. Yang B., Kong J., Fang X. Bandage-like wearable flexible microfluidic recombinase polymerase amplification sensor for the rapid visual detection of nucleic acids. *Talanta.* 2019; 204: 685–92. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2019.06.031>
34. Bodulev O.L., Sakharov I.Yu. Isothermal nucleic acid amplification techniques and their use in bioanalysis. *Biokhimiya.* 2020; 85(2): 174–96. <https://doi.org/10.31857/S0320972520020037> (in Russian)
35. Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Lee J.W., Essletzbichler P., Dy A.J., Joung J., et al. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. *Science.* 2017; 356(6336): 438–42. <https://doi.org/10.1126/science.aam9321>
36. Myhrvold C., Freije C.A., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Metsky H.C., Durbin A.F., et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science.* 2018; 360(6387): 444–8. <https://doi.org/10.1126/science.aas8836>
37. Saharan P., Dhingolia S., Khatri P. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) based detection of bacteria: Review. *Afr. J. Biotechnol.* 2014; 13(19): 1920–8. <https://doi.org/10.5897/AJB2013.134459>
38. Mayboroda O., Gonzalez Benito A., Sabaté del Rio J., Svobodova M., Julich S., Tomaso H., et al. Isothermal solid-phase amplification system for detection of *Yersinia pestis*. *Anal. Bioanal. Chem.* 2016; 408(3): 671–6. <https://doi.org/10.1007/s00216-015-9177-1>
39. Ke X.M., Chen Y.Y., Gao L.L., DU Z.P., Feng X.M., Liao R.Y., et al. Establishment and application of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid diagnosis of *Vibrio cholerae*. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2009; 29(10): 2059–63. (in Chinese)
40. Okada K., Chantaroj S., Taniguchi T., Suzuki Y., Roobthaisong A., Puiprom O., et al. A rapid, simple, and sensitive loop-mediated isothermal amplification method to detect toxigenic *Vibrio cholerae* in rectal swab samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2010; 66(2): 135–9. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2009.09.004>
41. Yamazaki W., Seto K., Taguchi M., Ishibashi M., Inoue K. Sensitive and rapid detection of cholera toxin-producing *Vibrio cholerae* using a loop-mediated isothermal amplification. *BMC Microbiol.* 2008; 8: 94. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-94>
42. Yamazaki W., Ishibashi M., Kawahara R., Inoue K. Development of a loop-mediated isothermal amplification assay for sensitive and rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*. *BMC Microbiol.* 2008; 8: 163. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-163>
43. Shchit I.Yu., Ignatov K.B., Kudryavtseva T.Yu., Shishkova N.A., Mironova R.I., Marinin L.I., et al. The use of loop-mediated isothermal DNA amplification for the detection and identification of the anthrax pathogen. *Molekulyarnaya genetika, mikrobiologiya i virusologiya.* 2017; 35(2): 100–8. <https://doi.org/10.3103/S0891416817020094>
44. Shchit I.Yu., Ignatov K.B., Biketov S.F. Comparative analysis of lamp and real time pcr methods to detect pathogens of glanders and melioidosis. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika.* 2018; 63(6): 378–84. <https://doi.org/10.18821/0869-2084-2018-63-6-378-384> (in Russian)
45. Zhumina A.G. Loop-mediated isothermal amplification of nucleic acids: principle and application. *Vestnik Karagandinskogo universiteta. Seriya: Biologiya. Meditsina. Geografiya.* 2015; 79(3): 37–43. (in Russian)
46. Kashir J., Yaqinuddin A. Loop mediated isothermal amplification (LAMP) assays as a rapid diagnostic for COVID-19. *Med. Hypotheses.* 2020; 141: 109786. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2020.109786>
47. Pöschl B., Waneesorn J., Thekisoe O., Chutipongvivate S., Karanis P. Comparative diagnosis of malaria infections by microscopy, nested PCR, and LAMP in northern Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2010; 83(1): 56–60. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0630>
48. Gao X., Sun B., Guan Y. Pullulan reduces the non-specific amplification of loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Anal. Bioanal. Chem.* 2019; 411(6): 1211–8. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-1552-2>
49. Wu Y.D., Xu M.J., Wang Q.Q., Zhou C.X., Wang M., Zhu X.Q., et al. Recombinase polymerase amplification (RPA) combined with lateral flow (LF) strip for detection of *Toxoplasma gondii* in the environment. *Vet. Parasitol.* 2017; 243: 199–203. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.06.026>
50. Shahin K., Gustavo Ramirez-Paredes J., Harold G., Lopez-Jimena B., Adams A., Weidmann M. Development of a recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of *Francisella noatunensis subsp. orientalis*. *PLoS One.* 2018; 13(2): e0192979. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0192979>
51. Du X.J., Zang Y.X., Liu H.B., Li P., Wang S. Recombinase polymerase amplification combined with lateral flow strip for listeria monocytogenes detection in food. *J. Food Sci.* 2018; 83(4): 1041–7. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14078>
52. Jiang W., Ren Y., Han X., Xue J., Shan T., Chen Z., et al. Recombinase polymerase amplification-lateral flow (RPA-LF) assay combined with immunomagnetic separation for rapid visual detection of *Vibrio parahaemolyticus* in raw oysters. *Anal. Bioanal. Chem.* 2020; 412(12): 2903–14. <https://doi.org/10.1007/s00216-020-02532-9>
53. An L., Tang W., Ranalli T.A., Kim H.J., Wytiaz J., Kong H. Characterization of a thermostable UvrD helicase and its participation in helicase-dependent amplification. *J. Biol. Chem.* 2005; 280(32): 28952–8. <https://doi.org/10.1074/jbc.m503096200>
54. Jeong Y.J., Park K., Kim D.E. Isothermal DNA amplification in vitro: the helicase-dependent amplification system. *Cell Mol. Life Sci.* 2009; 66(20): 3325–36. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0094-3>

55. Chow W.H., McCloskey C., Tong Y., Hu L., You Q., Kelly C.P., et al. Application of isothermal helicase-dependent amplification with a disposable detection device in a simple sensitive stool test for toxigenic *Clostridium difficile*. *J. Mol. Diagn.* 2008; 10(5): 452–8. <https://doi.org/10.2353/jmoldx.2008.080008>
56. Barreda-García S., Miranda-Castro R., de-Los-Santos-Álvarez N., Miranda-Ordieres A.J., Lobo-Castañón M.J. Solid-phase helicase dependent amplification and electrochemical detection of Salmonella on highly stable oligonucleotide-modified ITO electrodes. *Chem. Commun. (Camb)*. 2017; 53(70): 9721–4. <https://doi.org/10.1039/c7cc05128j>
57. Tang R., Yang H., Gong Y., You M., Liu Z., Choi J.R., et al. A fully disposable and integrated paper-based device for nucleic acid extraction, amplification and detection. *Lab. Chip*. 2017; 17(7): 1270–9. <https://doi.org/10.1039/c6lc01586g>
58. Ma F., Liu M., Tang B., Zhang C.Y. Sensitive quantification of MicroRNAs by isothermal helicase-dependent amplification. *Anal. Chem.* 2017; 89(11): 6182–7. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b01113>

Информация об авторах

Чемисова Ольга Сергеевна — к.б.н., и.о. зав. Музея живых культур с Центром патогенных для человека вибрионов Ростовского-на-Дону противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-4059-2878>

Цырулина Оксана Алексеевна[✉] — к.б.н., с.н.с. Музея живых культур с Центром патогенных для человека вибрионов Ростовского-на-Дону противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, rykowskaya.oxana@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6176-2605>

Трухачев Алексей Леонидович — к.м.н., в.н.с. лаб. микробиологии чумы и других иерсиниозов Ростовского-на-Дону противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0002-3531-1146>

Носков Алексей Кимович — к.м.н., директор Ростовского-на-Дону противочумного института, Ростов-на-Дону, Россия, <https://orcid.org/0000-0003-0550-2221>

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 30.06.2021;
принята к публикации 26.01.2022;
опубликована 28.02.2022

Information about the authors

Olga S. Chemisova — Cand. Sci. (Biol.), acting Head of the Museum of living cultures with the Center for vibriosis pathogenic to humans, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-4059-2878>

Oksana A. Tsyulina[✉] — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Museum of living cultures with the Center for human pathogenic vibriosis, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russia, rykowskaya.oxana@yandex.ru, <https://orcid.org/0000-0001-6176-2605>

Alexey L. Trukhachev — Cand. Sci. (Med), leading researcher, Yersinia laboratory, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0002-3531-1146>

Alexey K. Noskov — Cand. Sci. (Med), Director, Rostov-on-Don Plague Control Research Institute, Rostov-on-Don, Russia, <https://orcid.org/0000-0003-0550-2221>

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published.

The article was submitted 30.06.2021;
accepted for publication 26.01.2022;
published 28.02.2022