



**ПЕТЛЕВАЯ LAMP АМПЛИФИКАЦИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ.
II. ДЕТЕКЦИЯ КОРОНАВИРУСА SARS-COV-2 С ПОМОЩЬЮ РАЗЛИЧНЫХ
ВАРИАНТОВ ОБРАТНО-ТРАНСКРИПЦИОННОЙ ПЕТЛЕВОЙ АМПЛИФИКАЦИИ**

¹Гарафутдинов Р.Р.*, ^{2,3}Ахметзянова Л.У., ¹Сахабутдинова А.Р., ⁴Чемерис Д.А., ^{2,3}Губайдуллин И.М., ¹Чемерис А.В.

¹Институт биохимии и генетики Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия, *Email: garafutdinovr@mail.ru

²Институт нефтехимии и катализа Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Уфа, Россия

³Уфимский государственный нефтяной технический университет, Уфа, Россия

⁴ООО «ГЕНВЕД», Москва, Россия

Резюме

Несмотря на то, что «золотым стандартом» для диагностики нового коронавируса SARS-CoV-2 остается ОТ-ПЦР, все активнее начинает применяться обратнo-транскрипционная петлевая изотермическая амплификация (RT-LAMP). Она имеет определенные преимущества ввиду изотермичности процесса и относительной простоты детекции лампликонов. Это позволяет позиционировать эту реакцию как проводимую по месту лечения, в том числе применительно к выявлению SARS-CoV-2. Способы детекции результатов любой разновидности LAMP можно подразделить на специфичные (прямые), рассчитанные на использование гибридизационных зондов, и косвенные, при которых контролируется общее накопление лампликонов или побочных продуктов реакции (пирофосфата и протонов). Для обнаружения генетического материала SARS-CoV-2 в клинических образцах с помощью RT-LAMP предложено большое количество вариантов, основанных на разных способах детекции. Важным является обеспечение высокой специфичности любых вариантов LAMP, которая зависит от качества подбора праймеров, осуществляемого с помощью компьютерных программ.

Ключевые слова: коронавирус, SARS-CoV-2, РНК, RT-LAMP, лампликон, , изотермическая амплификация, обратнo-транскрипционная петлевая амплификация, детекция, программа дизайна праймеров

Цитирование: Гарафутдинов Р.Р., Ахметзянова Л.У., Сахабутдинова А.Р., Чемерис Д.А., Губайдуллин И.М., Чемерис А.В. Петлевая LAMP амплификация нуклеиновых кислот. II. Детекция коронавируса SARS-CoV-2 с помощью различных вариантов обратнo-транскрипционной петлевой амплификации // *Biomics*. 2023. Т.15(4). С. 272-290. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2023-24

© Авторы

LAMP AMPLIFICATION OF NUCLEIC ACIDS. II. DETECTION OF THE SARS-COV-2 CORONAVIRUS USING VARIOUS VARIANTS OF REVERSE-TRANSCRIPTION LOOP AMPLIFICATION

¹Garafutdinov R.R.*, ^{2,3}Akhmetzyanova L.U., ¹Sakhabutdinova A.R., ⁴Chemers D.A., ^{2,3}Gubaidullin I.M., ¹Chemers A.V.

¹Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia, *Email: garafutdinovr@mail.ru

²Ufa State Petroleum Technological University, Ufa, Russia

³Institute of Petrochemistry and Catalysis, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russia

⁴GENVED LLC, Moscow, Russia,

Resume

Despite the fact that RT-PCR remains the “gold standard” for diagnostics of SARS-CoV-2 coronavirus, reverse transcription loop isothermal amplification (RT-LAMP) is increasingly being used. It has certain advantages due to the isothermal nature of the process and the relative simplicity of lamplicons detection. This allows this reaction to be positioned as point-of-care testing, including in relation to the detection of SARS-CoV-2. Methods for the results detection of any type of LAMP can be divided into specific (direct), designed to use hybridization probes, and indirect,

in which the total accumulation of lampicons or reaction by-products (pyrophosphate and protons) is controlled. For the detection of SARS-CoV-2 genetic material in clinical samples using RT-LAMP, a large number of options have been proposed, based on different detection methods. It is important to ensure high specificity of any LAMP variants, which depends on the quality of primer selection carried out using computer programs.

Keywords: coronavirus, SARS-CoV-2, RNA, RT-LAMP, lampicon, isothermal amplification, reverse transcriptional loop amplification, detection, primer design program

Citation: Garafutdinov R.R., Akhmetzyanova L.U., Sakhabutdinova A.R., Chemeris D.A., Gubaydullin I.M., Chemeris A.V. LAMP amplification of nucleic acids. II. Detection of the SARS-CoV-2 coronavirus using various variants of reverse transcription loop amplification. *Biomics*. 2023. V.15(4). P. 272-290. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2023-24

© The Authors

Введение

Внезапно появившаяся новая коронавирусная инфекция уже несколько лет заставляет ученых разных специальностей обращать на нее внимание, тем более тех, чьи исследования раньше лежали в смежных областях, включая молекулярную диагностику других этиологических агентов. Коронавирус SARS-CoV-2 заметно ускорил разработку и совершенствование различных вариантов уже хорошо известных реакций высокочувствительной детекции специфичных последовательностей нуклеиновых кислот, в том числе протекающих в изотермических условиях.

Ранее нами были рассмотрены структурная организация SARS-CoV-2, генетическое разнообразие его изолятов, большое число диагностических тест-систем (преимущественно на основе ПЦР), выявляющих этот коронавирус в клиническом материале и в окружающей среде, а также ряд других вопросов [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2020; 2020a; Мавзютов и др. (Mavzyutov et al.), 2020; 2021]. Также в связи с 20-летием со времени разработки метода петлевой изотермической амплификации LAMP (Loop-mediated isothermal AMPlification) [Notomi et al., 2000] нами был подготовлен обзор, посвященный способам проведения этой реакции и различным вариантам контроля за ее протеканием [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2021], ставший наиболее полным сводом практически всех описанных на тот момент подходов, которых (с учетом вариаций) было рассмотрено более сотни. В схожей обзорной публикации немецких авторов [Becherer et al., 2020] таковых приводится менее четырех десятков.

На сегодняшний день в молекулярной диагностике в подавляющем большинстве случаев используется ПЦР, которая регулируется сменой температур, поэтому для ее проведения требуется наличие специальных приборов – термоциклеров. При этом температурные изменения в реакционном блоке происходят не мгновенно, что приводит к сдерживанию амплификации, поскольку при ПЦР циклически производится смена этапов. При 95°C происходит денатурация цепей ДНК (исходных

молекул и/или ампликонов), отжиг праймеров (обычно при 50-60°C) и их элонгация (72°C). Эти этапы начинаются по достижении нужной температуры, поэтому ПЦР больше «стоит», чем «идет». В этой связи представляют интерес изотермические реакции, протекающие при одной температуре и всегда с максимально возможной в данный момент скоростью, определяемой свойствами фермента и наличием в реакционной смеси других ингредиентов, в том числе праймеров. То есть при проведении таких реакций не происходит искусственного сдерживания работы фермента, что весьма важно для ускорения амплификации. Другое преимущество заключается в отсутствии необходимости использовать ДНК-термоциклеры, обеспечивающие циклическую смену температур. LAMP может проводиться в обычном термостате, хотя в некоторых вариантах изотермических реакций подобные приборы для проведения амплификации в режиме реального времени все же используются, но без термоциклирования.

Если в ПЦР появление одноцепочечных ДНК, на которых отжигаются праймеры и начинается их элонгация, возникает при денатурации двуцепочечной ДНК под действием высокой температуры, то в изотермических реакциях появление новых одноцепочечных матриц решается чаще всего за счет использования ДНК-полимераз с цепь-вытесняющей активностью.

Методология петлевой изотермической амплификации LAMP

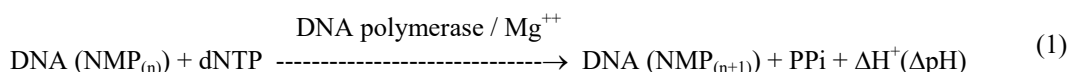
LAMP является одной из множества изотермических реакций амплификации и детекции специфичных фрагментов нуклеиновых кислот с накоплением продуктов в геометрической прогрессии. Метод был разработан еще в 2000 г. [Notomi et al., 2000], он характеризуется довольно сложной системой праймеров. Процессы, протекающие в ходе LAMP-амплификации, приводят к формированию гантелеподобных ДНК-структур, на основе которых синтезируются гетерогенные продукты разной (увеличивающейся) длины, что нагляднее всего представлено в анимации фирмы Eiken Chemical Co.,

Ltd (<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/anim.html>) и в видеодемонстрации фирмы New England Biolabs, Inc. (<https://international.neb.com/products/m1800-warmstart-colorimetric-lamp-2x-master-mix-dna-ma#Product%20Information>). Возможность обходиться без сложного оборудования способствует развитию перспективных подходов диагностики в виде так называемых анализов по месту лечения (у постели больного) – РОСТ (Point-of-Care-Testing) или коротко – РОС и LAMP для этого вполне подходит.

Поскольку в нашей обзорной статье [Гарафутдинов и др. (Garafutdinov et al.), 2021] довольно подробно рассмотрено протекание LAMP и способы детекции образующихся продуктов, здесь

приведем лишь схему расположения мест отжига праймеров на участке ДНК, служащем мишенью для LAMP-амплификации, и структуру ключевого продукта (рис. 1), а также химические уравнения, демонстрирующие происходящие в ходе LAMP молекулярные процессы.

Так как в LAMP образуется большое количество ДНК-продуктов, в ощутимых количествах в реакционную смесь высвобождаются пирофосфат и протоны. В уравнении (1) $\Delta H^+(\Delta pH)$ обозначает изменение концентрации протонов в реакционной смеси, приводящее к сдвигу (снижению) pH раствора:



Пирофосфат PPi ($\text{P}_2\text{O}_7^{2+}$), реагируя с присутствующими в реакционной смеси ионами магния, образует нерастворимый осадок по уравнению (2):



Закисление раствора (специально слабо забуференного) и появление в реакционной смеси пирофосфата лежат в основе косвенных методов оценки результатов LAMP, основанных на турбидиметрии (по мутности), колориметрии (по окраске) и потенциометрии, тогда как синтезирующиеся ДНК-цепи ($\text{NMP}_{(n+m)}$) позволяют регистрировать появление специфичных лампликонов при условии использования гибридизационных зондов.

С учетом серьезных отличий между ампликонами¹, образующимися в ПЦР, и продуктами LAMP, последние могут быть названы «лампликонами»², что ранее уже предлагалось разными авторами [Yang et al., 2012; 2013; Ahsan et al., 2017]. В одной из статей был использован такой вариант их обозначения – LAMPlicons [Bektaş, 2017]. Но термин пока не нашел широкого распространения, хотя возможно заслуживает того, чтобы им оперировали, тем более, что интерес к петлевой изотермической амплификации особенно в последние «коронавирусные» годы растет.

ОТ-ПЦР и RT-LAMP для детекции SARS-CoV-2

Как уже отмечалось выше, появление нового коронавируса SARS-Cov-2 и его быстрое распространение заставило исследователей в максимально короткие сроки разработать специальные тест-системы для его детекции, которые были коммерциализованы и внесли серьезную лепту в борьбу с этой опасной инфекцией. Большинство таких разработок и коммерческих тест-систем основаны на являющейся «золотым стандартом» ОТ-ПЦР (Обратно-Транскрипционная ПЦР), но и петлевая изотермическая амплификация не оказалась забыта. Каждая из этих реакций характеризуется своими преимуществами, и имеется немало публикаций, в том

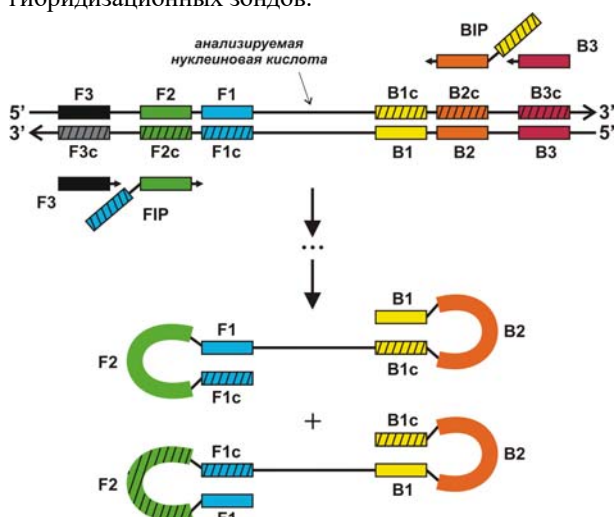


Рис. 1. Схема расположения мест отжига праймеров на участке ДНК, служащем мишенью для LAMP-амплификации (без петлевых праймеров), и структура ключевого продукта.

Fig. 1. The scheme of the primer annealing sites on the DNA site serving as a target for LAMP amplification (without loop primers), and the types of the main amplification products.

¹ Здесь можно заметить, что термин “amplicon” для продуктов ПЦР предложен в 1991 г. [Mullis, 1991], хотя первоначально им называли векторную конструкцию, усиливающую клонирование [Spaete, Frenkel, 1982].

² Набор ампликонов увеличивающегося размера нарабатывается также при протекании некоторых других реакций изотермической амплификации, однако они заметно уступают по популярности LAMP. Кроме того, образующиеся в них ампликоны имеют иную структуру.

числе отечественных авторов, в которых сравниваются ОТ-ПЦР и RT-LAMP (Reverse Transcription LAMP), включая имеющиеся коммерческие наборы [Акимкин и др. (Akimkin et al.), 2021; Varlamov et al., 2020; Artik et al., 2021; Minami et al., 2021; Pourakbari et al., 2024].

При этом отмечается, что обе реакции близки по наиболее важным показателям, среди которых чувствительность и достоверность получаемых результатов. Серьезным преимуществом RT-LAMP является возможность обходиться без дорогостоящего оборудования. Также важно, что RT-LAMP менее чувствительна к ингибиторам амплификации и может выполняться без экстракции РНК из клинических образцов, что заметно сокращает продолжительность анализа. К тому же RT-LAMP протекает быстрее, чем ОТ-ПЦР. Изотермический режим предоставляет более широкий спектр возможностей для детекции как непосредственно целевых лампликонов, так и косвенного их накопления, что в ПЦР обычно не практикуется. Однако RT-LAMP имеет и недостатки, главным среди которых можно считать необходимость использования гораздо большего числа праймеров, нежели в ОТ-ПЦР – обычно четыре и даже шесть праймеров. Из-за этого, а также ввиду особого устройства LAMP-праймеров резко возрастает сложность их подбора.

RT-LAMP и прочие коронавирусы

Помимо «старых» коронавирусов человека, часть из которых известна еще со второй половины XX века, серьезное внимание к себе привлек появившийся в начале наступившего тысячелетия новый коронавирус, в 2002-2003 г. вызвавший довольно быстро завершившуюся эпидемию. В отличие от прежних коронавирусов он получил название, отражающее его высокую патогенность - SARS-CoV (Severe Acute Respiratory Syndrome). Для его детекции были созданы различные тест-системы, основанные преимущественно на ОТ-ПЦР. Однако разработавшая метод LAMP и получившая на него патент США³ японская фирма Eiken Chemical Co., Ltd еще в 2003 г. (но уже после окончания эпидемии 2002-2003 г.) выпустила специальный набор Loopamp SARS Coronavirus Detection Reagent kit для обнаружения SARS-CoV, но использованная для этого мишень из вирусного генома не сообщалась⁴. Его чувствительность была оценена в 10 копий РНК вируса, детектируемых по степени мутности раствора благодаря увеличению количества водонерастворимого пирофосфата магния в ходе реакции, продолжительность которой составила 45 минут. Позже с участием сотрудников фирмы Eiken Chemical Co., Ltd была

разработана тест-система на основе RT-LAMP для обнаружения участка гена репликазы SARS-CoV размером 196 нуклеотидов [Hong et al., 2004]. Детекция велась в приборе Loopamp real-time turbidimeter LA-200, регистрирующем в режиме реального времени мутность раствора. Другими авторами в те же годы были опубликованы две экспериментальные статьи по выявлению у пациентов SARS-CoV [Poon et al., 2004; 2005]. В первой работе мишенью служил фрагмент *ORF1b* вирусного генома. Во второй авторы использовали упоминаемый выше готовый набор Loopamp SARS Coronavirus Detection Reagent kit. При этом было отмечено отсутствие ложноположительных результатов амплификации.

После появления через десятилетие другого опасного коронавируса MERS-CoV его детекция (помимо ОТ-ПЦР) также стала осуществляться с помощью RT-LAMP, обеспечивая чувствительность на уровне единичных копий менее чем за один час [Shirato et al., 2014]. При этом накопление лампликонов велось в режиме реального времени, которое отслеживали путем измерения мутности раствора в турбидиметре модели LA-3200C. Подбор праймеров, ограничивающих мишень (участок гена нуклеокапсидного белка размером 113 нт), осуществлялся с помощью программы PrimerExplorer V4. Для обнаружения MERS-CoV с помощью RT-LAMP другими авторами были выбраны две мишени в генах *ORF1a* и *ORF1b*, а также третья мишень из зоны, предшествующей гену *E* [Bhadra et al., 2015]. В их экспериментах детекция накопления целевых продуктов велась в ДНК-термоциклере модели LightCycler 96 (при одной температуре без термоциклирования) с использованием зонда, свечение которого тушилось гуанином после его отжига на комплементарной цепи. Аналогичный подход с тушением зонда был использован в другой работе для детекции MERS-CoV с тем отличием, что мишенями служили два разных участка гена нуклеокапсидного белка и *ORF1a* [Shirato et al., 2018]. Еще в одной работе для детекции MERS-CoV с помощью RT-LAMP использовался интеркалирующий краситель EvaGreen, и амплификация велась в специальных полимерных микроемкостях [Lee et al., 2017]. В другой статье [Huang et al., 2018] описывается подход, согласно которому после получасовой LAMP-амплификации проводили 5-ти минутное хроматографическое разделение лампликонов, меченных по одному концу флуоресцеином, а по другому - биотином, приводившее в случае наличия генетического материала SARS-CoV-2 к образованию окрашенной полосы из коллоидного золота, конъюгированного со стрептавидином. В обеих работах была показана высокая специфичность детекции.

Отдельный интерес представляет исследование авторов из Южной Кореи, выполненное незадолго до появления нового коронавируса SARS-CoV-2, но

³ US Patent 6,410,278 B1, Jun. 25, 2002 (PCT filed: Nov. 8, 1999)

⁴ что вполне естественно для коммерческих наборов

посвященное коронавирусу SARS-CoV [Kim et al., 2019]. Рукопись была получена редакцией журнала 15 июля 2019 г., а 11 ноября 2019 г., непосредственно перед первым сообщением о SARS-CoV-2, статья была опубликована. В этой работе сообщалось о применении мультиплексной RT-LAMP для детекции коронавируса SARS-CoV, мишенями для чего послужили *ORF1b* и ген нуклеокапсидного белка. При этом ввиду отсутствия самого вируса использовали искусственно созданные транскрипты выбранных участков генома, которые удалось детектировать за 20-25 минут в количестве около 10^4 - 10^5 копий.

Помимо коронавируса человека, RT-LAMP с успехом использовалась для детекции коронавирусов животных, в частности, кошек FCoV (Feline) [Stranieri et al., 2017] и свиней SADS-CoV (Swine Acute Diarrhea Syndrome) [Wang et al., 2018].

SARS-CoV-2 и его детекция с помощью RT-LAMP

Как уже отмечалось выше, мониторинг протекания LAMP в режиме реального времени может вестись двояко – путем контроля за накоплением или лампликонов (непосредственно), или пирофосфата/протонов (косвенно). Для обоих подходов предложено множество вариантов детекции, причем в первом случае используемые зонды в виде молекулярных маяков (биконов, Molecular Beacon) или иных гибридизационных структур дополнительно свидетельствуют о специфичности амплификации и наработке целевого лампликона. Во втором же случае можно детектировать только протекание ДНК-синтеза в целом, но появляется возможность визуального (колориметрического) контроля, в том числе «невооруженным глазом», за ходом амплификации с использованием некоторых красителей-индикаторов, что будет рассматриваться дальше применительно к обнаружению SARS-CoV-2. С учетом значительного количества подобных публикаций коснемся лишь некоторых экспериментальных статей преимущественно последнего времени.

Как и в случае с ПЦР, для обнаружения SARS-CoV-2 с помощью RT-LAMP применяются флуоресцентные красители, свечение которых вызывается разными способами, а контроль за этим осуществляется с помощью ДНК-термоциклеров, оснащенных оптическим модулем, но настроенных на работу при постоянной температуре. Хотя LAMP позиционируется как метод, не требующий дорогостоящего оборудования и тем самым наиболее подходящий для ПОС-анализов, тем не менее, приборное оснащение для контроля флуоресценции в ней используется, в том числе портативное [Natoli et al., 2021]. Описано также применение и дорогостоящей техники, в частности, ДНК-термоциклера AriaMX Real-Time PCR System (Agilent Technologies, США), работающего в реальном времени и детектирующего SARS-CoV-2 с помощью SYBR-подобного

интеркалирующего флуорохрома [Jones et al. 2021]. В одной из статей для детекции SARS-CoV-2 с помощью RT-LAMP с использованием интеркалирующего флуоресцентного красителя фирмы Lucigen (аналога SYBR Green I) авторы задействовали пять моделей ДНК-термоциклеров разных фирм, работающих в реальном времени [Alhamid et al., 2023].

Специфичная детекция SARS-CoV-2 успешно ведется с помощью молекулярных биконов [Sherrill-Mix et al., 2021]. Для детекции нескольких мишеней в SARS-CoV-2 описана мультиплексная RT-LAMP, основанная на так называемой HFmap пробе, изменение флуоресценции которой контролировалось авторами в ДНК-термоциклере модели CFX 1000 (Bio-Rad Laboratories, США) [Dong et al., 2022]. Для обнаружения SARS-CoV-2 использовалась мультиплексная RT-LAMP со смещаемыми универсальными флуоресцентными пробами [Kline et al., 2022]. Мультипробы в виде молекулярных маяков, а также смещаемых проб (OSD – One-Step Displacement) использовались для детекции SARS-CoV-2 другими авторами [Talap et al., 2022].

Весьма распространенным способом детекции лампликонов является иммунохроматографический анализ на специальных тест-полосках, получивших название Lateral Flow Device или Biosensor, для чего один из праймеров метится FITC и затем выявляется антителами к нему, несущими частицы коллоидного золота. Популярность такого подхода, помимо подтверждения достоверности амплификации, объясняется его быстротой, поскольку по завершению основной реакции требуется около 5 минут на такое иммуноферментное взаимодействие и хроматографическое разделение, с высокой чувствительностью свидетельствующее о наличии или об отсутствии (благодаря специальному контролю) искомым нуклеотидных последовательностей. Для таких анализов необходимо дополнительно метить гибридизационный зонд биотином, что не составляет большой проблемы и практически не удорожает данную реакцию. Неудивительно, что данный подход нашел применение и для диагностики SARS-CoV-2 [Agarwal et al., 2023]

Определение точного количества вирусных частиц в клиническом образце осуществлялось с помощью цифровой LAMP – sdd RT-LAMP (shaken digital droplet) с использованием гибридизационного зонда, меченного красителем FAM [Weisgerber et al., 2023]. Эмульсионные капли получали встряхиванием пробирок вручную (из-за чего метод и получил название shaken), а детекция свечения флуорохрома велась с помощью модернизированного смартфона, превращенного по сути во флуоресцентный микроскоп. Ранее другими авторами для точного подсчета вирусных частиц SARS-CoV-2 была предложена цифровая LAMP, особенностью которой было формирование из специального гидрогеля микрососудов на стеклянной

пластине, в которых распределение исходного исследуемого образца производилось без выделения из него РНК [Yang et al., 2023]. Детекция светящихся точек в таком геле, благодаря добавленному в реакционную смесь интеркалирующему красителю SYBR Green I, велась с использованием флуоресцентного микроскопа или модернизированного смартфона.

Как уже говорилось выше, опосредованно о появлении лампиконов в ходе петлевой амплификации можно судить благодаря пирофосфату, высвобождающемуся из дНТФ при полимеризации ДНК при присоединении к ней дНМФ, а также выделяющимся в реакционную среду протонам. Поскольку в LAMP процесс полимеризации ДНК идет намного интенсивнее, чем в ПЦР, то количества пирофосфата и протонов становятся таковыми, что вызывают даже визуально заметное изменение мутности или окраски реакционной смеси (возможен также мониторинг с помощью весьма дорогостоящих приборов).

Рассмотрение подобных работ начнем с одной из первых публикаций февраля 2020 г., размещенной тогда в medRxiv [Yu et al., 2020]. Она интересна тем, что авторы назвали свой подход iLACO (isothermal LAMP based method for COVID-19). Для колориметрической детекции ими применялся специальный набор WarmStart master mix kit фирмы New England Biolabs, Inc. (<https://www.neb.com/en/products/e1700-warmstart-lamp-kit-dna-rna#Product%20Information>), включающий в свой состав краситель феноловый красный (меняющий окраску в зависимости от pH среды и при снижении становящийся желтым, что свидетельствует о наработке лампиконов), а также ряд других компонентов, среди которых гидрохлорид гуанидина, улучшающий протекание LAMP [Zhang et al., 2020]. В последующем этот набор использовался в очень большом числе работ для детекции SARS-CoV-2 с помощью RT-LAMP. Кроме клинических образцов, SARS-CoV-2 детектировался с использованием WarmStart master mix kit в сточных водах [Amoah et al., 2021; Akter et al., 2024]. Ранее в одной из работ на основе колориметрической тест-системы для детекции SARS-CoV-2 с помощью фенолового красного приведен пример создания передвижной лаборатории на базе автомобильного прицепа, разделенного на четыре изолированных блока с десятью аналитическими зонами [Chow et al., 2020].

«Оригинальное» название для своего подхода – SARSCOV (Simple, Affordable, Rapid, Stabilized, Colorimetric, Versatile RT-LAMP Assay), предложили другие авторы [García-Bernalt Diego et al., 2021]. В нем детекцию вели с помощью флуоресцентного красителя SYBR Green I, дающего зеленое окрашивание в случае позитивного результата или остающегося оранжевым для негативных образцов. Еще одной особенностью данной работы было то, что реакционная смесь могла храниться в сухом виде при комнатной температуре до полугода. В

ряде работ визуально наблюдавшееся изменение окраски реакционной смеси при амплификации с помощью LAMP и pH-чувствительного красителя фенолового красного, приобретающего вместо розовой желтую окраску, свидетельствовало о наличии в анализируемом образце вирусного материала SARS-CoV-2 [Baek et al., 2020]. С использованием других pH-чувствительных красителей - ксиленолового оранжевого и лавандового зеленого показана возможность детекции SARS-CoV-2 по месту лечения [Jagoenram et al., 2022]. Для детекции SARS-CoV-2 предложено также использовать пищевой краситель кармуазин, смешиваемого с продуктами RT-LAMP в присутствии сульфата меди и перекиси водорода, ликвидирующих его красную окраску за счет образующихся гидроксидов, но наличие большого количества ДНК (лампионов) связывало гидроксильные радикалы и сохраняло красное окрашивание реакционной смеси, наблюдаемое визуально [Nguyen et al., 2022]. Предлагалось также результаты RT-LAMP оценивать визуально с помощью добавленной в реакционную смесь лейко-формы кристаллического фиолетового, приобретающего окраску за счет появления большого количества молекул ДНК [Park et al., 2020]. В ряде работ при детекции SARS-CoV-2 с помощью различных устройств продемонстрировано использование смартфонов для регистрации изменения окраски реакционной смеси, содержащей малахитовый зеленый [García-Bernalt Diego et al., 2022], либо путем контроля диффузии специальных флуоресцентных частиц [Colbert et al., 2022].

При обнаружении SARS-CoV-2 феноловый красный был использован для электрохимической детекции образующихся лампиконов [Rioboó-Legaspi et al., 2024]. Показано, что феноловый красный за счет окислительно-восстановительной реакции с молибдатом натрия позволяет детектировать SARS-CoV-2 с помощью циклической вольтамметрии [Borah Slater et al., 2023]. Использование такого редокс-индикатора как метиленовый синий дало возможность с помощью циклической вольтамметрии детектировать SARS-CoV-2, причем было отмечено совпадение полученных результатов с таковыми при ОТ-ПЦР [Kim et al., 2023]. Циклическая вольтамметрия для обнаружения SARS-CoV-2 была использована и в ранее не применявшимся для генетических анализов методе, основанном на каталитических способностях нанокластеров палладия, реагирующих на изменение pH раствора и позволяющих вести электрохимическую детекцию лампиконов [Rodriguez-Penedo et al., 2023].

В модельном эксперименте, в котором в ходе транскрипции T7 РНК-полимеразой синтезированы фрагменты генома SARS-CoV-2 в присутствии красителя политиофенового ряда, связывающегося с ДНК электростатически и меняющего цвет в зависимости от ее одно- или двуцепочечного состояния,

показана принципиальная возможность обнаружения 6 копий вируса за 30 мин [Su et al., 2023]. Недостатком этого подхода является необходимость добавления данного красителя после окончания реакции, что вынуждает экспериментатора открывать пробирки.

Накопление большого количества ДНК в ходе петлевой амплификации позволило при детекции SARS-CoV-2 использовать специальный наносенсор, позволяющий регистрировать ток, проходящий через нанопору в стекле диаметром 10 нм, что дало возможность отличать образцы с прошедшей амплификацией от тех, где она не протекала [Tang et al., 2022]. При этом авторы отметили, что их результаты совпали с таковыми, полученными путем ОТ-ПЦР. Описаны способы детекции SARS-CoV-2 с помощью RT-LAMP, в которых задействованы наночастицы золота, покрытые хитозаном [Grammatikos et al., 2023], а также наночастицы серебра, покрытые золотом, но в этом случае еще был необходим этап расщепления лампиконов подходящей рестрикционной эндонуклеазой [Ye et al., 2022].

Мутность раствора из-за выпадения в осадок пирофосфата магния при детекции двух мишеней SARS-CoV-2 амплификации контролировали в специальном приборе Turbidimeter фирмы Eiken Chemical Co [Yan et al., 2020]. Было показано, что возможно обнаружение от 20 до 200 копий вирусной РНК за 20-30 мин реакции. При этом достигнута 100% специфичность детекции. Показана возможность колориметрической детекции в клинических образцах SARS-CoV-2 с помощью метало-индикаторов кальцеина [Rivas-Macho et al., 2023] и гидроксинафтола [Werbajh et al., 2023]. Регистрация пирофосфата в реальном времени была осуществлена также с помощью биолюминесцентного подхода BART (Bioluminescent Assay in Real Time), использованного для детекции SARS-CoV-2 [Iijima et al., 2023]. В этом случае запускался каскад ферментативных реакций, когда выделяющийся пирофосфат под действием АТФ-сульфуриказы превращал находящийся в реакционной смеси аденозинфосфосульфат в АТФ, который в свою очередь способствовал окислению люциферина люциферазой с выделением света.

В одной из работ для детекции SARS-CoV-2 описано применение вместо центрифуги детской игрушки спиннера для создания центробежных сил, требующихся для преодоления гидрофобной зоны продуктами RT-LAMP, протекавшей до этого в микрофлюидном чипе с флуоресцентным красителем SYBR Green I [de Oliveira et al., 2021]. Еще целый ряд микрофлюидных устройств разной сложности и с различными способами визуализации продуктов RT-LAMP был предложен для обнаружения SARS-CoV-2 в клинических образцах [Jhou et al., 2022; Papadakis et al., 2022; Torezin Mendonça et al., 2022; Fu et al., 2023;

Mytzka et al., 2023; Papamatthaiou et al., 2023; Tarim et al., 2023; Das et al., 2024].

С учетом сверхвысокой чувствительности LAMP важное значение приобретает исключение ложноположительных результатов [Kim et al., 2023]. Ранее мы тоже уделили внимание данному аспекту, но в отношении ПЦР [Чемерис и др. (Chemeris et al.), 2012], однако многие подходы являются общими для обеих реакций. Одной из причин ложноположительных результатов может быть загрязнение реакционных смесей лампиконами из предыдущих реакций. Для недопущения этого предлагается использовать урацил-ДНК гликозилазу, что продемонстрировано и при детекции SARS-CoV-2 [Lai et al., 2022]. Другой причиной ложноположительных результатов в LAMP может стать образование димеров праймеров, и если в ПЦР это обязательно приведет к ложной наработке двуцепочечной ДНК, то в LAMP следствием образования димеров могут стать как ложноположительные, так и ложноотрицательные результаты. В этой связи важное значение приобретает высокое качество подбора праймеров.

Стоит отметить, что несмотря на то, что РНК-зависимая РНК-полимераза коронавируса обладает редактирующей активностью (при репликации устраняет ошибки копирования), SARS-CoV-2 размножился по миру настолько, что его количество перешло в качество, под которым в данном случае следует понимать разнообразие его нуклеотидных последовательностей. Фактически любой вирус – это квазивид. Появление с высокой частотой мутаций в нуклеотидных последовательностях вирусных генов накладывает определенный отпечаток на диагностику SARS-CoV-2, требуя тщательного подбора праймеров, которые периодически приходится пересматривать. LAMP в этом отношении не является исключением, а с учетом большего числа необходимых для нее праймеров следует внимательнее относиться к вариативности мест их отжига. В то же время в одной из статей показано, что успешная диагностика SARS-CoV-2 с помощью RT-LAMP возможна даже при неполном отжиге праймеров на матрице [Tamanaha et al., 2022].

Дизайн праймеров для петлевой амплификации

Отдельно необходимо коснуться вопроса дизайна праймеров для проведения LAMP. Если для проведения ПЦР программ дизайна праймеров разработано уже более полутора сотен [Чемерис и др., 2016], то для LAMP ситуация значительно хуже. И это при том, что праймеры для обычной ПЦР опытный специалист может подобрать и вручную, тогда как для LAMP сделать это практически невозможно (хотя разработчикам данного метода приходилось это делать [Notomi et al., 2000; Mori et al., 2001; Nagamine et al., 2002], поскольку специализированного программного обеспечения тогда еще не было). В статье 2003 г. [Enosawa et al., 2003] уже говорится о том, что дизайн

праймеров осуществлялся с помощью программы “Primer Designing Support software (Fujitsu, Tokyo, Japan)”, позже преобразованной в PrimerExplorer.

В настоящее время на сайте фирмы Eiken Chemical Co. (<https://www.eiken.co.jp/en/products/lamp/>) есть линк на страницу <https://primerexplorer.jp/e/>, на которой размещена в свободном доступе программа PrimerExplorer версии 4 и 5. Относительно недавно для PrimerExplorer отечественными специалистами создан находящийся также в свободном доступе (для академических сотрудников и некоммерческих пользователей) специальный web-плагин MorphoCatcher (<http://morphocatcher.ru/>), позволяющий на основе множественного выравнивания нуклеотидных последовательностей вести выбор участков для создания таксон-специфичных праймеров, фактически готовя их для загрузки в PrimerExplorer V5 [Shirshikov et al., 2019].

Еще одна бесплатная on-line программа NEB LAMP Primer Design Tool не так давно⁵ была размещена на сайте фирмы New England Biolabs, Inc. (<https://lamp.neb.com/#/>). При этом данная фирма производит большую линейку продуктов для LAMP, включая усовершенствованные Bst ДНК-полимеразы, в том числе версию Bst 3.0, обладающую ревертазной активностью, а также реагенты для контроля за протеканием петлевой амплификации путем колориметрической детекции.

Программа GLAPD (Genome based LAMP Primer Design) позволяет создавать наборы праймеров для петлевой амплификации на основе полных геномов, при этом есть возможность подбирать общие, специфичные и группоспецифичные праймеры (<https://cgm.sjtu.edu.cn/GLAPD/>) [Jia et al., 2019]. Программа Electric LAMP (eLAMP), размещенная на сайте Ботанического сада Нью-Йорка (<https://www.nybg.org/files/scientists/dlittle/eLAMP.html>), рассчитана на электронную симуляцию LAMP. Она лишь дает возможность пользователям тестировать предполагаемые праймеры LAMP на целевых последовательностях, предсказывая, с какими комплектами праймеров будет протекать амплификация [Salinas et al., 2012]. Некоторое время назад имелся доступный программный продукт LAVA (LAMP Assay Versatile Analysis), в котором дизайн праймеров был основан на методе отбора праймеров Primer3, но, к сожалению, уже неработающий [Torres et al., 2011]. В статье, описывающей программу STITCHER, предназначенную для дизайна перекрывающихся праймеров для ПЦР [O’Haloran, 2015], упоминается возможность подбора праймеров для LAMP, но в следующей статье данных авторов, посвященной новой версии STITCHER 2.0 [O’Haloran et al., 2017] про LAMP уже не упоминается, как и на сайте

http://www.ohalloranlab.net/STITCHER_2_0/index.html.

Программа lamprim <https://github.com/lamprim> позволяет подбирать LAMP-праймеры для целевой последовательности, работая в двух режимах: дизайн праймеров и анализ праймеров, но она не имеет on-line версии и мало доступна рядовым пользователям. Среди коммерческих программных продуктов фирмы Premier Biosoft имеется программа LAMP Designer (<https://www.premierbiosoft.com/isothermal/index.html>), характеризующаяся относительно большим функционалом и позволяющая подбирать наборы, состоящие как из четырех, так и из шести (с учетом петлевых) праймеров. Программа FastPCR фирмы Primer Digital Ltd. (<https://primerdigital.com/fastpcr.html>) позволяет вести дизайн праймеров для различных видов ПЦР (стандартной, в реальном времени, мультиплексной и т.д.), а также и LAMP (четыре праймера) [Kalendar et al., 2017].

Нами недавно для дизайна праймеров для петлевой изотермической амплификации создана программа LAMPprimers iQ, способная обрабатывать длинные последовательности ДНК или РНК и при подборе праймеров исключать те, что могут образовывать гомо- и гетеродимеры [Akhmetzianova et al., 2024]. Программа пока не имеет on-line версии и доступна для скачивания по адресу <https://github.com/Restily/LAMPprimers-iQ>.

Насколько нам известно, перечень приведенных здесь программ для дизайна LAMP-праймеров является исчерпывающим. Стоит отметить, что часть из них уже не работает. Учитывая растущую популярность LAMP, можно считать, что имеющихся программ дизайна праймеров недостаточно, поскольку существующие не позволяют решать вновь появляющиеся задачи. Так, в методе, получившем название LAMP-Seq, предложенном для изучения представленности вариантов SARS-CoV-2 в популяции путем их массового секвенирования, необходимо включение специальных баркодированных последовательностей, например, в праймер FIP между его двумя значимыми участками, отжигающимися на уникальной последовательности из десяти нуклеотидов [Ludwig et al., 2021], что требуется учитывать при дизайне праймеров для исключения возможных димеров. Другими авторами [He et al., 2022] с целью повышения чувствительности обнаружения SARS-CoV-2 было предложено использовать дополнительные внутренние праймеры, что позволило им назвать свой вариант как RT-MIPLAMP (Multiple Inner Primers) и хотя для дизайна набора праймеров использовались программы PrimerExplorer и NEB Primer Design Tool для лучших результатов требуется отдельная программа для MIPLAMP амплификации или хотя бы соответствующая опция в уже имеющихся.

Заключение

Из изложенного выше можно видеть что, для обнаружения нового коронавируса SARS-CoV-2 в клинических образцах и во внешней среде довольно активно

⁵ это произошло в августе 2020 г. и возможно повлияло как раз появление SARS-CoV-2

применяется петлевая изотермическая амплификация и используются различные способы детекции как непосредственно целевых лампликонов, так и побочных продуктов амплификации (пирофосфата и протонов).

Рассмотренное в данном обзоре разнообразие подходов свидетельствует о возможностях дальнейшего улучшения диагностики новой коронавирусной инфекции, которые могут быть применены для выявления и других этиологических агентов. Учитывая относительную доступность тест-систем и оборудования для RT-LAMP и изотермический характер реакции, этот метод позволяет использовать его по месту лечения. При этом проведенное разными авторами сопоставление эффективности детекции SARS-CoV-2 с помощью ОТ-ПЦР и RT-LAMP демонстрирует получение в них схожих результатов.

К преимуществам LAMP можно отнести большую скорость анализа и отсутствие необходимости проводить экстракцию РНК из образцов. При этом считается, что увеличенное количество праймеров в LAMP повышает достоверность результатов, хотя плохо подобранные праймеры, напротив, могут снизить точность анализа. В этом случае важное значение приобретают программы дизайна праймеров, которых пока значительно меньше, чем для ПЦР, но их число постепенно увеличивается.

Имеется несколько обзоров, подготовленных, в том числе отечественными авторами, в которых рассматривается применение RT-LAMP для диагностики SARS-CoV-2 [Хафизов и др. (Khafizov et al.), 2021; Чемисова и др. (Chemisova et al.), 2022; Choi et al., 2023], но часть из них опубликована уже относительно давно, а сведения в этой области накапливаются чрезвычайно быстро. К тому же авторы тех обзорных статей ставили перед собой несколько иные задачи.

* * *

Решение написать данную статью основано на имеющемся у нас довольно большом опыте работы с разнообразными реакциями амплификации нуклеиновых кислот, как управляемыми сменами температур, так и изотермическими. Сейчас еще обратили внимание на программное обеспечение для дизайна праймеров для таких реакций.

Что касается коронавируса, то интерес к нему у нас довольно давний. Еще в 2003 г. (когда только появился SARS-CoV) в Башкирском государственном университете одним из авторов (Ч.Д.А.) данной статьи была выполнена дипломная работа «Создание генно-инженерных конструкций, содержащих под контролем промотора T7 уникальный фрагмент коронавируса, вызывающего атипичную пневмонию». В ходе той работы был выбран фрагмент нуклеотидной последовательности нуклеокапсидного белка, специфичный для SARS-CoV, и для создания нужной конструкции были синтезированы протяженные олигонуклеотиды. В итоге был сформирован

фрагмент ДНК, кодирующий участок вирусной РНК, с целью использования последней в качестве положительного контроля в соответствующей тест-системе для диагностики SARS-CoV. И это было актуально, поскольку коронавирус имеет РНК-геном и необходим контролируемый этап обратной транскрипции в виде превращения молекул РНК в их ДНК-копии. Но тот коронавирус SARS-CoV из человеческой популяции очень быстро исчез (фактически через месяц после защиты упомянутого диплома), поэтому та наша работа продолжения не получила.

После появления нового коронавируса SARS-CoV-2 мы неоднократно обращали на него внимание как на объект для разработки подходов для его детекции с помощью различных вариантов ПЦР и иных реакций амплификации нуклеиновых кислот [Сахабутдинова и др. (Sakhabutdinova et al.), 2023; Sakhabutdinova et al., 2021; Garafutdinov et al., 2022; Sakhabutdinova et al., 2022; Akhmetzianova et al., 2024], внимательно следя за литературой в этой области, что также способствовало написанию данного труда.

Сочетание RT-LAMP с другими реакциями амплификации и детекции лампликонов (RPA, RCA, HCR, CRISPR и пр.) осталось здесь без внимания, поскольку им будет посвящена отдельная статья этого цикла.

Литература

1. Акимкин В.Г., Петров В.В., Красовитов К.В., Борисова Н.И., Котов И.А., Родионова Е.Н., Черкашина А.С., Кондрашева Л.Ю., Тиванова Е.В., Хафизов К.Ф. Молекулярные методы диагностики новой коронавирусной инфекции: сравнение петлевой изотермической амплификации и полимеразной цепной реакции // Вопросы вирусологии. 2021. Т.66(6). С.417-424. DOI: 10.36233/0507-4088-86
2. Гарафутдинов Р.Р., Мавзютов А.Р., Алексеев Я.И., Воробьев А.А., Никоноров Ю.М., Чубукова О.В., Матниязов Р.Т., Баймиев Ан.Х., Максимов И.В., Кулуев Б.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Бетакоронавирусы человека и их высокочувствительная детекция с помощью ПЦР и прочих методов амплификации // Biomics. 2020. Т.12(1). С. 121-179. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-7
3. Гарафутдинов Р.Р., Мавзютов А.Р., Никоноров Ю.М., Чубукова О.В., Матниязов Р.Т., Баймиев Ан.Х., Максимов И.В., Мифтахов И.Ю., Халикова Е.Ю., Кулуев Б.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Бетакоронавирус SARS-CoV-2, его геном, разнообразие генотипов и молекулярно-биологические меры борьбы с ним // Biomics. 2020. Т.12(2). С. 242-271. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-15
4. Гарафутдинов Р.Р., Чемерис Д.А., Мавзютов А.Р., Ахметзянова Л.У., Давлеткулов Т.М., Губайдуллин И.М., Чемерис А.В. Петлевая LAMP амплификация нуклеиновых кислот. I. Два десятилетия развития и совершенствования // Biomics.

2021. Т.13(2). С. 176-226. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-14
5. Мавзютов А.Р., Гарафутдинов Р.Р., Халикова Е.Ю., Газизов Р.Р., Баймиев Ан.Х., Никоноров Ю.М., Максимов И.В., Кулуев Б.Р., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Загадки нового коронавируса SARS-CoV-2 // *Biomics*. 2021. Т.13(1). С. 75-99. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-7
6. Мавзютов А.Р., Гарафутдинов Р.Р., Халикова Е.Ю., Юлдашев Р.А., Хусаинова Р.И., Чубукова О.В., Гималов Ф.Р., Матниязов Р.Т., Алексеев Я.И., Воробьев А.А., Вершинина З.Р., Мифтахов И.Ю., Никоноров Ю.М., Максимов И.В., Кулуев Б.Р., Баймиев Ан.Х., Баймиев Ал.Х., Чемерис А.В. Проблемные аспекты диагностики коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 с помощью обратнотранскрипционной ПЦР // *Biomics*. 2020. Т.12(4). С. 564-590. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-50
7. Сахабудинова А.Р., Чемерис А.В., Гарафутдинов Р.Р. Обнаружение специфических РНК-мишеней с помощью мультимеризации // *Биохимия*. 2023. Т.88(5). С.832-840. DOI: 10.31857/S032097252305010X
8. Хафизов К.Ф., Петров В.В., Красовитов К.В., Золкина М.В., Акимкин В.Г. Экспресс-диагностика новой коронавирусной инфекции с помощью реакции петлевой изотермической амплификации // *Вопросы вирусол.* 2021. Т. 66(1). С. 17-28. doi: 10.36233/0507-4088-42
9. Чемерис А.В., Магданов Э.Г., Гарафутдинов Р.Р., Вахитов В.А. Как исключить появление ложнопозитивных результатов при проведении полимеразной цепной реакции? // *Вестн. биотехнол. физ.-хим. биол.* 2012. Т. 8(3). С. 34-45.
10. Чемерис Д.А., Кирьянова О.Ю., Губайдуллин И.М., Чемерис А.В. Дизайн праймеров для полимеразной цепной реакции (краткий обзор компьютерных программ и баз данных) // *Biomics*. 2016. Т. 8(3). С. 215-238.
11. 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. Т.99(1). С.126-138. DOI: 10.36233/0372-9311-176
12. Agarwal S, Hamidzadeh M, Bier FF. Detection of Reverse Transcriptase LAMP-Amplified Nucleic Acid from Oropharyngeal Viral Swab Samples Using Biotinylated DNA Probes through a Lateral Flow Assay // *Biosensors (Basel)*. 2023. V.13(11). 988. doi: 10.3390/bios13110988
13. Ahsan A., Usman M., Ullah I., Zahur A.B., Malik A.R. Molecular diagnostic assays for the detection of peste des petits ruminants virus: a concise review // *Vet. Sci.: Res. Rev.* 2017. V. 3(3):53-57. doi: 10.17582/journal.vsr/2017.3.3.53.57
14. Akhmetzianova LU, Davletkulov TM, Sakhabutdinova AR, Chemeris AV, Gubaydullin IM, Garafutdinov RR. LAMPprimers iQ: New primer design software for loop-mediated isothermal amplification (LAMP) // *Anal Biochem*. 2024. V.684. 115376. doi: 10.1016/j.ab.2023.115376
15. Akter J, Smith WJM, Gebrewold M, Kim I, Simpson SL, Bivins A, Ahmed W. Evaluation of colorimetric RT-LAMP for screening of SARS-CoV-2 in untreated wastewater // *Sci Total Environ*. 2024. V.907. 167964. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.167964
16. Alhamid G, Tombuloglu H, Al-Suhaimi E. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays using five primers reduces the false-positive rate in COVID-19 diagnosis. *Sci Rep*. 2023. V.13(1). 5066. doi: 10.1038/s41598-023-31760-z
17. Amoah ID, Mthethwa NP, Pillay L, Deepnarain N, Pillay K, Awolusi OO, Kumari S, Bux F. RT-LAMP: A Cheaper, Simpler and Faster Alternative for the Detection of SARS-CoV-2 in Wastewater // *Food Environ Virol*. 2021. V.13(4). P.447-456. doi: 10.1007/s12560-021-09489-7
18. Artik Y, Coşgun AB, Cesur NP, Hizel N, Uyar Y, Sur H, Ayan A. Comparison of COVID-19 laboratory diagnosis by commercial kits: Effectivity of RT-PCR to the RT-LAMP // *J Med Virol*. 2022. V.94(5). P.1998-2007. doi: 10.1002/jmv.27559
19. Baek YH, Um J, Antigua KJC, Park JH, Kim Y, Oh S, Kim YI, Choi WS, Kim SG, Jeong JH, Chin BS, Nicolas HDG, Ahn JY, Shin KS, Choi YK, Park JS, Song MS. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification as a rapid early-detection method for novel SARS-CoV-2 // *Emerg Microbes Infect*. 2020. V.9(1). P.998-1007. doi: 10.1080/22221751.2020.1756698
20. Becherer L., Borst N., Bakheit M., Frischmann S., Zengerle R., von Stetten F. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – review and classification of methods for sequence-specific detection // *Anal. Methods*. 2020. V. 12(6). P.717-746. doi: 10.1039/C9AY02246E
21. Bektaş A, Chapela I. Loop-mediated isothermal amplification of single pollen grains // *J. Integr. Plant Biol*. 2014. V. 56(8). P.741-748. doi: 10.1111/jipb.12191
22. Bhadra S, Jiang YS, Kumar MR, Johnson RF, Hensley LE, Ellington AD. Real-time sequence-validated loop-mediated isothermal amplification assays for detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) // *PLoS One*. 2015. V.10(4). e0123126. doi: 10.1371/journal.pone.0123126
23. Borah Slater K, Ahmad M, Poirier A, Stott A, Siedler BS, Brownsword M, Mehat J, Urbaniec J, Locker N, Zhao Y, La Ragione R, Silva SRP, McFadden J. Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based electrochemical test for rapid detection of

- SARS-CoV-2 // *iScience*. 2023. V.26(9). 107570. doi: 10.1016/j.isci.2023.107570
24. Choi G, Moehling TJ, Meagher RJ. Advances in RT-LAMP for COVID-19 testing and diagnosis // *Expert Rev Mol Diagn*. 2023. V.23(1). P.9-28. doi: 10.1080/14737159.2023.2169071
25. Chow FW, Chan TT, Tam AR, Zhao S, Yao W, Fung J, Cheng FK, Lo GC, Chu S, Aw-Yong KL, Tang JY, Tsang CC, Luk HK, Wong AC, Li KS, Zhu L, He Z, Tam EWT, Chung TW, Wong SCY, Que TL, Fung KS, Lung DC, Wu AK, Hung IF, Woo PC, Lau SK. A Rapid, Simple, Inexpensive, and Mobile Colorimetric Assay COVID-19-LAMP for Mass On-Site Screening of COVID-19 // *Int J Mol Sci*. 2020. V.21(15). 5380. doi: 10.3390/ijms21155380
26. Colbert AJ, Lee DH, Clayton KN, Wereley ST, Linnes JC, Kinzer-Ursem TL. PD-LAMP smartphone detection of SARS-CoV-2 on chip // *Anal Chim Acta*. 2022. V.1203. 339702. doi: 10.1016/j.aca.2022.339702
27. Das D, Lin CW, Chuang HS. On-chip screening of SARS-CoV-2 cDNA by LAMP-integrated rotational diffusometry // *Talanta*. 2024. V.267. 125253. doi: 10.1016/j.talanta.2023.125253
28. de Oliveira KG, Estrela PFN, Mendes GM, Dos Santos CA, Silveira-Lacerda EP, Duarte GRM. Rapid molecular diagnostics of COVID-19 by RT-LAMP in a centrifugal polystyrene-toner based microdevice with endpoint visual detection // *Analyst*. 2021. V.146(4). P.1178-1187. doi: 10.1039/d0an02066d
29. Dong Y, Zhao Y, Li S, Wan Z, Lu R, Yang X, Yu G, Reboud J, Cooper JM, Tian Z, Zhang C. Multiplex, Real-Time, Point-of-care RT-LAMP for SARS-CoV-2 Detection Using the HFman Probe // *ACS Sens*. 2022. V.7(3). P.730-739. doi: 10.1021/acssensors.1c02079
30. Enosawa M, Kageyama S, Sawai K, Watanabe K, Notomi T, Onoe S, Mori Y, Yokomizo Y. Use of loop-mediated isothermal amplification of the IS900 sequence for rapid detection of cultured *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* // *J Clin Microbiol*. 2003. V.41(9). P.4359-4365. doi: 10.1128/JCM.41.9.4359-4365.2003
31. Fu Q, Pang X, Su Z, Yang Y, Liu Y, Zhang Z, Fu Y, Wang J, Zhou J. Rapid On-Site Detection of SARS-CoV-2 Using RT-LAMP Assay with a Portable Low-Cost Device // *Biosensors (Basel)*. 2023. V.13(7). 724. doi: 10.3390/bios13070724
32. Garafutdinov RR, Chemeris DA, Sakhabutdinova AR, Moiseev KV, Urmancheev SF, Mikhaylenko CI, Privalov LY, Chemeris AV. Convective polymerase chain reaction in standard microtubes // *Anal Biochem*. 2022. V.641. 114565. doi: 10.1016/j.ab.2022.114565
33. García-Bernalt Diego J, Fernández-Soto P, Domínguez-Gil M, Belhassen-García M, Bellido JLM, Muro A. A Simple, Affordable, Rapid, Stabilized, Colorimetric, Versatile RT-LAMP Assay to Detect SARS-CoV-2 // *Diagnostics (Basel)*. 2021. V.11(3). 438. doi: 10.3390/diagnostics11030438
34. García-Bernalt Diego J, Fernández-Soto P, Márquez-Sánchez S, Santos Santos D, Febrer-Sendra B, Crego-Vicente B, Muñoz-Bellido JL, Belhassen-García M, Corchado Rodríguez JM, Muro A. SMART-LAMP: A Smartphone-Operated Handheld Device for Real-Time Colorimetric Point-of-Care Diagnosis of Infectious Diseases via Loop-Mediated Isothermal Amplification // *Biosensors (Basel)*. 2022. V.12(6). 424. doi: 10.3390/bios12060424
35. Grammatikos S, Sviliantopoulos I, Gizeli E. Naked-Eye Detection of LAMP-Produced Nucleic Acids in Saliva Using Chitosan-Capped AuNPs in a Single-Tube Assay // *Anal Chem*. 2023. V.95(50). P.18514-18521. doi: 10.1021/acs.analchem.3c03878
36. He X, Su F, Chen Y, Li Z. Novel reverse transcription-multiple inner primer loop-mediated isothermal amplification (RT-MIPLAMP) for visual and sensitive detection of SARS-CoV-2 // *Anal Methods*. 2022. V.14(47). P.5012-5018. doi: 10.1039/d2ay01330d
37. Hong TC, Mai QL, Cuong DV, Parida M, Minekawa H, Notomi T, Hasebe F, Morita K. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus // *J Clin Microbiol*. 2004. V.42(5). P.1956-1961. DOI: 10.1128/jcm.42.5.1956-1961.2004
38. Huang P, Wang H, Cao Z, Jin H, Chi H, Zhao J, Yu B, Yan F, Hu X, Wu F, Jiao C, Hou P, Xu S, Zhao Y, Feng N, Wang J, Sun W, Wang T, Gao Y, Yang S, Xia X. A Rapid and Specific Assay for the Detection of MERS-CoV // *Front Microbiol*. 2018. V.9. 1101. doi: 10.3389/fmicb.2018.01101
39. Jaroenram W, Chatnuntawech I, Kampeera J, Pengpanich S, Leungwutiwong P, Tondee B, Sirithammajak S, Suvannakad R, Khumwan P, Dangtip S, Arunrut N, Bantuchai S, Nguitragool W, Wongwaroran S, Khanchaitit P, Sattabongkot J, Teerapittayanon S, Kiatpathomchai W. One-step colorimetric isothermal detection of COVID-19 with AI-assisted automated result analysis: A platform model for future emerging point-of-care RNA/DNA disease diagnosis // *Talanta*. 2022. V.249. 123375. doi: 10.1016/j.talanta.2022.123375
40. Jhou YR, Wang CH, Tsai HP, Shan YS, Lee GB. An integrated microfluidic platform featuring real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for detection of COVID-19 // *Sens Actuators B Chem*. 2022. V.358. 131447. doi: 10.1016/j.snb.2022.131447
41. Jia B, Li X, Liu W, Lu C, Lu X, Ma L, Li YY, Wei C. GLAPD: Whole Genome Based LAMP Primer Design for a Set of Target Genomes // *Front Microbiol*. 2019. V.10. 2860. doi: 10.3389/fmicb.2019.02860

42. Jones L, Bakre A, Naikare H, Kolhe R, Sanchez S, Mosley YC, Tripp RA. Isothermal amplification and fluorescent detection of SARS-CoV-2 and SARS-CoV-2 variant virus in nasopharyngeal swabs // *PLoS One*. 2021. V.16(9). e0257563. doi: 10.1371/journal.pone.0257563
43. Iijima T, Sakai J, Kanamori D, Ando S, Nomura T, Tisi L, Kilgore PE, Percy N, Kohase H, Hayakawa S, Maesaki S, Hoshino T, Seki M. A New Method to Detect Variants of SARS-CoV-2 Using Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Combined with a Bioluminescent Assay in Real Time (RT-LAMP-BART) // *Int J Mol Sci*. 2023. V.24(13). 10698. doi: 10.3390/ijms241310698
44. Kalendar R, Tselykh TV, Khassenov B, Ramanculov EM. Introduction on Using the FastPCR Software and the Related Java Web Tools for PCR and Oligonucleotide Assembly and Analysis // *Methods Mol Biol*. 2017. V.1620. P.33-64. doi: 10.1007/978-1-4939-7060-5_2
45. Kim HE, Schuck A, Park H, Huh HJ, Kang M, Kim YS. Gold nanostructures modified carbon-based electrode enhanced with methylene blue for point-of-care COVID-19 tests using isothermal amplification // *Talanta*. 2023. V.265. 124841. doi: 10.1016/j.talanta.2023.124841
46. Kim JH, Kang M, Park E, Chung DR, Kim J, Hwang ES. A Simple and Multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Rapid Detection of SARS-CoV // *Biochip J*. 2019. V.13(4). P.341-351. doi: 10.1007/s13206-019-3404-3
47. Kim SH, Lee SY, Kim U, Oh SW. Diverse methods of reducing and confirming false-positive results of loop-mediated isothermal amplification assays: A review // *Anal Chim Acta*. 2023a. V.1280. 341693. doi: 10.1016/j.aca.2023.341693
48. Kline EC, Panpradist N, Hull IT, Wang Q, Oreskovic AK, Han PD, Starita LM, Lutz BR. Multiplex Target-Redundant RT-LAMP for Robust Detection of SARS-CoV-2 Using Fluorescent Universal Displacement Probes // *Microbiol Spectr*. 2022. V.10(4). e0158321. doi: 10.1128/spectrum.01583-21
49. Lai MY, Bukhari FDM, Zulkefli NZ, Ismail I, Mustapa NI, Soh TST, Hassan AH, Peariasamy KM, Lee YL, Suppiah J, Thayan R, Lau YL. Colorimetric detection of SARS-CoV-2 by uracil-DNA glycosylase (UDG) reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) // *Int J Infect Dis*. 2022. V.120. P.132-134. doi: 10.1016/j.ijid.2022.04.036
50. Lee SH, Baek YH, Kim YH, Choi YK, Song MS, Ahn JY. One-Pot Reverse Transcriptional Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for Detecting MERS-CoV // *Front Microbiol*. 2017. V.7. 2166. doi: 10.3389/fmicb.2016.02166
51. Ludwig KU, Schmithausen RM, Li D, Jacobs ML, Hollstein R, Blumenstock K, Liebing J, Słabicki M, Ben-Shmuel A, Israeli O, Weiss S, Ebert TS, Paran N, Rüdiger W, Wilbring G, Feldman D, Lippke B, Ishorst N, Hochfeld LM, Beins EC, Kaltheuner IH, Schmitz M, Wöhler A, Döhla M, Sib E, Jentsch M, Moench EC, Borrajo JD, Strecker J, Reinhardt J, Cleary B, Geyer M, Hölzel M, Macrae R, Nöthen MM, Hoffmann P, Exner M, Regev A, Zhang F, Schmid-Burgk JL. LAMP-Seq enables sensitive, multiplexed COVID-19 diagnostics using molecular barcoding // *Nat Biotechnol*. 2021. V.39(12). P.1556-1562. doi: 10.1038/s41587-021-00966-9
52. Minami K, Masutani R, Suzuki Y, Kubota M, Osaka N, Nakanishi T, Nakano T, Ukimura A. Evaluation of SARS-CoV-2 RNA quantification by RT-LAMP compared to RT-qPCR // *J Infect Chemother*. 2021. V.27(7). P.1068-1071. doi: 10.1016/j.jiac.2021.05.004
53. 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. V.289(1). P.150-154. doi: 10.1006/bbrc.2001.5921
54. Mytzka N, Arbaciauskaite S, Sandetskaya N, Mattern K, Kuhlmeier D. A fully integrated duplex RT-LAMP device for the detection of viral infections // *Biomed Microdevices*. 2023. V.25(4). 36. doi: 10.1007/s10544-023-00676-w
55. Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers // *Mol Cell Probes*. 2002. V.16(3). P.223-229. doi: 10.1006/mcpr.2002.0415
56. Natoli ME, Kundrod KA, Chang MM, Smith CA, Paul S, Coole JB, Butlin NG, Tanner NA, Baker E, Schmeler KM, Richards-Kortum R. Improving Performance of a SARS-CoV-2 RT-LAMP Assay for Use With a Portable Isothermal Fluorimeter: Towards a Point-of-Care Molecular Testing Strategy // *J Biomol Tech*. 2021. V.32(3). P.180-185. doi: 10.7171/jbt.21-3203-013
57. Nguyen HA, Choi H, Lee NY. A Rotatable Paper Device Integrating Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification and a Food Dye for Colorimetric Detection of Infectious Pathogens // *Biosensors (Basel)*. 2022. V.12(7). 488. doi: 10.3390/bios12070488
58. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA // *Nucleic Acids Res*. 2000. V.28(12). E63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63
59. O'Halloran DM. STITCHER: A web resource for high-throughput design of primers for overlapping PCR applications // *Biotechniques*. 2015. V.58(6). P.325-328. doi: 10.2144/000114301
60. O'Halloran DM, Uriagereka-Herburger I, Bode K. STITCHER 2.0: primer design for overlapping PCR applications // *Sci Rep*. 2017. V.7. 45349. doi: 10.1038/srep45349

61. Papadakis G, Pantazis AK, Fikas N, Chatziioannidou S, Tsiakalou V, Michaelidou K, Pogka V, Megariti M, Vardaki M, Giarentis K, Heaney J, Nastouli E, Karamitros T, Mentis A, Zafiroopoulos A, Sourvinos G, Agelaki S, Gizeli E. Portable real-time colorimetric LAMP-device for rapid quantitative detection of nucleic acids in crude samples // *Sci Rep*. 2022. V.12(1). 3775. doi: 10.1038/s41598-022-06632-7
62. Papamatthaiou S, Boxall-Clasby J, Douglas EJA, Jajnesniak P, Peyret H, Mercer-Chalmers J, Kumar VKS, Lomonosoff GP, Reboud J, Laabei M, Cooper JM, Kasprzyk-Hordern B, Moschou D. LoCKamp: lab-on-PCB technology for <3 minute virus genetic detection // *Lab Chip*. 2023. V.23(20). P.4400-4412. doi: 10.1039/d3lc00441d
63. Park GS, Ku K, Baek SH, Kim SJ, Kim SI, Kim BT, Maeng JS. Development of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays Targeting Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) // *J Mol Diagn*. 2020. V.22(6). P.729-735. doi: 10.1016/j.jmoldx.2020.03.006
64. Poon LL, Leung CS, Tashiro M, Chan KH, Wong BW, Yuen KY, Guan Y, Peiris JS. Rapid detection of the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a loop-mediated isothermal amplification assay // *Clin Chem*. 2004. 50(6). P.1050-1052. doi: 10.1373/clinchem.2004.032011
65. Poon L.L., Wong B.W., Chan K.H., Ng S.S., Yuen K.Y., Guan Y., Peiris J.S. Evaluation of real-time reverse transcriptase PCR and real-time loop-mediated amplification assays for severe acute respiratory syndrome coronavirus detection // *Journal of Clinical Microbiology*. 2005. V. 43 (7). P. 3457-9. doi: 10.1128/JCM.43.7.3457-3459.2005
66. Pourakbari R, Gholami M, Shakerimoghaddam A, Khiavi FM, Mohammadimehr M, Khomartash MS. Comparison of RT-LAMP and RT-qPCR assays for detecting SARS-CoV-2 in the extracted RNA and direct swab samples // *J Virol Methods*. 2024. V.324. 114871. doi: 10.1016/j.jviromet.2023.114871
67. Rioboó-Legaspi P, González-López A, Beltrán-Sánchez JF, Cima-Cabal MD, García-Suárez MM, Sánchez AJG, Fernández-Otero T, Haro JG, Costa-Rama E, Fernández-Abedul MT. Phenol red as electrochemical indicator for highly sensitive quantification of SARS-CoV-2 by loop-mediated isothermal amplification detection // *Talanta*. 2024. V.266(1). 124963. doi: 10.1016/j.talanta.2023.124963
68. Rivas-Macho A, Sorarrain A, Marimón JM, Goñi-de-Cerio F, Olabarria G. Extraction-Free Colorimetric RT-LAMP Detection of SARS-CoV-2 in Saliva // *Diagnostics (Basel)*. 2023. V.13(14). 2344. doi: 10.3390/diagnostics13142344
69. Rodríguez-Penedo A, Rioboó-Legaspi P, González-López A, Lores-Padín A, Pereiro R, García-Suárez MDM, Cima-Cabal MD, Costa-Rama E, Fernández B, Fernández-Abedul MT. Electrocatalytic Palladium Nanoclusters as Versatile Indicators of Bioassays: Rapid Electroanalytical Detection of SARS-CoV-2 by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification // *Adv Healthc Mater*. 2023. V.12(12). e2202972. doi: 10.1002/adhm.202202972
70. Sakhabutdinova AR, Gazizov RR, Chemeris AV, Garafutdinov RR. Reverse transcriptase-free detection of viral RNA using Hemo Klentaq DNA polymerase // *Anal Biochem*. 2022. V.659. 114960. doi: 10.1016/j.ab.2022.114960
71. Sakhabutdinova AR, Kamalov MI, Salakhieva DV, Mavzyutov AR, Garafutdinov RR. Inhibition of nonspecific polymerase activity using Poly(Aspartic) acid as a model anionic polyelectrolyte // *Anal Biochem*. 2021. V.628. 114267. doi: 10.1016/j.ab.2021.114267
72. Salinas NR, Little DP. Electric LAMP: Virtual Loop-Mediated Isothermal AMPLification // *ISRN Bioinform*. 2012. 696758. doi: 10.5402/2012/696758
73. Sherrill-Mix S, Hwang Y, Roche AM, Glascock A, Weiss SR, Li Y, Haddad L, Deraska P, Monahan C, Kromer A, Graham-Wooten J, Taylor LJ, Abella BS, Ganguly A, Collman RG, Van Duyn GD, Bushman FD. Detection of SARS-CoV-2 RNA using RT-LAMP and molecular beacons // *Genome Biol*. 2021. V.22(1). 169. doi: 10.1186/s13059-021-02387-y
74. Shirato K, Yano T, Senba S, Akachi S, Kobayashi T, Nishinaka T, Notomi T, Matsuyama S. Detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) // *Virol J*. 2014. V.11. 139. doi: 10.1186/1743-422X-11-139
75. Shirshikov FV, Pekov YA, Miroshnikov KA. MorphoCatcher: a multiple-alignment based web tool for target selection and designing taxon-specific primers in the loop-mediated isothermal amplification method // *Peer J*. 2019. V.7. e6801. doi: 10.7717/peerj.6801
76. Stranieri A, Lauzi S, Giordano A, Paltrinieri S. Reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification for the detection of feline coronavirus // *J Virol Methods*. 2017. V.243. P.105-108. doi: 10.1016/j.jviromet.2017.01.009
77. Su F, He X, Zhang P, Wang H, Li Z. Water-soluble polythiophene-based colorimetry for the quick and accurate detection of SARS-CoV-2 RNA // *Talanta*. 2023. V.256. 124320. doi: 10.1016/j.talanta.2023.124320
78. Talap J, Shen M, Yu L, Zeng S, Cai S. RT-LAMP assay combining multi-fluorescent probes for SARS-CoV-2 RNA detection and variant differentiation // *Talanta*. 2022. V.248. 123644. doi: 10.1016/j.talanta.2022.123644
79. Tamanaha E, Zhang Y, Tanner NA. Profiling RT-LAMP tolerance of sequence variation for SARS-CoV-2 RNA detection // *PLoS One*. 2022. V.17(3). e0259610. doi: 10.1371/journal.pone.0259610

80. Tang Z, Nouri R, Dong M, Yang J, Greene W, Zhu Y, Yon M, Nair MS, Kuchipudi SV, Guan W. Rapid detection of novel coronavirus SARS-CoV-2 by RT-LAMP coupled solid-state nanopores // *Biosens Bioelectron.* 2022. V.197. 113759. doi: 10.1016/j.bios.2021.113759
81. Tarim EA, Oksuz C, Karakuzu B, Appak O, Sayiner AA, Tekin HC. Electromechanical RT-LAMP device for portable SARS-CoV-2 detection // *Talanta.* 2023. V.254. 124190. doi: 10.1016/j.talanta.2022.124190
82. Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products // *Nature Protocols.* 2008. V.3(5). P.877-882. doi: 10.1038/nprot.2008.57
83. Torezin Mendonça G, Cassaboni Stracke M, de Oliveira Coelho B, Bruna Soligo Sanchuki H, Klassen de Oliveira V, Klerynton Marchini F, Luciola Zanette D, Nóbrega Aoki M, Ribeiro Viana E, Blanes L. A new RT-LAMP-on-a-Chip Instrument for SARS-CoV-2 diagnostics // *Microchem J.* 2022. V.180. 107600. doi: 10.1016/j.microc.2022.107600
84. Torres C, Vitalis EA, Baker BR, Gardner SN, Torres MW, Dzenitis JM. LAVA: an open-source approach to designing LAMP (loop-mediated isothermal amplification) DNA signatures // *BMC Bioinformatics.* 2011. V.12. 240. doi: 10.1186/1471-2105-12-240
85. Varlamov DA, Blagodatskikh KA, Smirnova EV, Kramarov VM, Ignatov KB. Combinations of PCR and Isothermal Amplification Techniques Are Suitable for Fast and Sensitive Detection of SARS-CoV-2 Viral RNA // *Front Bioeng Biotechnol.* 2020. V.8. 604793. doi: 10.3389/fbioe.2020.604793
86. Wang H, Cong F, Zeng F, Lian Y, Liu X, Luo M, Guo P, Ma J. Development of a real time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method (RT-LAMP) for detection of a novel swine acute diarrhea syndrome coronavirus (SADS-CoV) // *J Virol Methods.* 2018. V.260. P.45-48. doi: 10.1016/j.jviromet.2018.06.010
87. Weisgerber DW, Langer K, Servellita V, Xu P, Chiu CY, Abate AR. Viral load quantitation at the point-of-care with shaken digital droplet RT-LAMP // *Lab Chip.* 2023. V.23(15). P.3479-3486. doi: 10.1039/d3lc00096f
88. Werbahj S, Larocca L, Carrillo C, Stolowicz F, Ogas L, Pallotto S, Cassará S, Mammana L, Zapiola I, Bouzas MB, Vojnov AA. Colorimetric RT-LAMP Detection of Multiple SARS-CoV-2 Variants and Lineages of Concern Direct from Nasopharyngeal Swab Samples without RNA Isolation // *Viruses.* 2023. V.15(9). 1910. doi: 10.3390/v15091910
89. Yan C, Cui J, Huang L, Du B, Chen L, Xue G, Li S, Zhang W, Zhao L, Sun Y, Yao H, Li N, Zhao H, Feng Y, Liu S, Zhang Q, Liu D, Yuan J. Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay // *Clin Microbiol Infect.* 2020. V.26(6). P.773-779. doi: 10.1016/j.cmi.2020.04.001
90. Yang A.K., Lu H., Wu S.Y., Kwok H.C., Ho H.P., Yu S., Cheung A.K., Kong S.K. Detection of Pantone-Valentine Leukocidin DNA from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by resistive pulse sensing and loop-mediated isothermal amplification with gold nanoparticles // *Anal. Chim. Acta.* 2013. V. 782:46-53. doi: 10.1016/j.aca.2013.04.004.
91. Yang K.L.A., Wu S.Y., Kwok H.C., Ho H.P., Kong S.K. Using Loop-mediated Isothermal DNA Amplification (LAMP) and Spectral Surface Plasmon Resonance (SPR) to Detect Methicillin-resistance *S. aureus* (MRSA) // *Proc. Int. Conf. Biomed. Engin. Biotechnol. iCBEB.* 2012. 647-650. doi: 10.1109/iCBEB.2012.462
92. Yang T, Li D, Yan Y, Ettoumi FE, Wu RA, Luo Z, Yu H, Lin X. Ultrafast and absolute quantification of SARS-CoV-2 on food using hydrogel RT-LAMP without pre-lysis // *J Hazard Mater.* 2023. V.442. 130050. doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.130050
93. Ye H, Nowak C, Liu Y, Li Y, Zhang T, Bleris L, Qin Z. Plasmonic LAMP: Improving the Detection Specificity and Sensitivity for SARS-CoV-2 by Plasmonic Sensing of Isothermally Amplified Nucleic Acids // *Small.* 2022. V.18(12). e2107832. doi: 10.1002/smll.202107832
94. Yu L, Wu S, Hao X, Dong X, Mao L, Pelechano V, Chen W-H, Yin X. Rapid Detection of COVID-19 Coronavirus Using a Reverse Transcriptional Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Diagnostic Platform // *Clinical Chemistry.* 2020. V.66(7). P.975-977. doi: 10.1093/clinchem/hvaa102
95. Zhang Y, Ren G, Buss J, Barry AJ, Patton GC, Tanner NA. Enhancing colorimetric loop-mediated isothermal amplification speed and sensitivity with guanidine chloride // *Biotechniques.* 2020. V.69(3). P.178-185. doi: 10.2144/btn-2020-0078

References

1. Agarwal S, Hamidizadeh M, Bier FF. Detection of Reverse Transcriptase LAMP-Amplified Nucleic Acid from Oropharyngeal Viral Swab Samples Using Biotinylated DNA Probes through a Lateral Flow Assay. *Biosensors (Basel).* 2023. V.13(11). 988. doi: 10.3390/bios13110988
2. Ahsan A., Usman M., Ullah I., Zahur A.B., Malik A.R. Molecular diagnostic assays for the detection of peste des petits ruminants virus: a concise review. *Vet. Sci.: Res. Rev.* 2017. V. 3(3):53-57. doi: 10.17582/journal.vsrr/2017.3.3.53.57
3. Akhmetzianova LU, Davletkulov TM, Sakhabutdinova AR, Chemeris AV, Gubaydullin IM, Garafutdinov RR. LAMPprimers iQ: New primer design software for loop-mediated isothermal amplification

- (LAMP). *Anal Biochem.* 2024. V.684. 115376. doi: 10.1016/j.ab.2023.115376
4. Akimkin V.G., Petrov V.V., Krasovtsov K.V., Borisova N.I., Kotov I.A., Rodionova E.N., Cherkashina A.S., Kondrasheva L.Yu., Tivanova E.V., Khafizov K.F. Molecular methods for diagnosing novel coronavirus infection: comparison of loop-mediated isothermal amplification and polymerase chain reaction. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021. V.66(6). P. 417-424. DOI: 10.36233/0507-4088-86 (In Russian)
 5. Akter J, Smith WJM, Gebrewold M, Kim I, Simpson SL, Bivins A, Ahmed W. Evaluation of colorimetric RT-LAMP for screening of SARS-CoV-2 in untreated wastewater. *Sci Total Environ.* 2024. V.907. 167964. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.167964
 6. Alhamid G, Tombuloglu H, Al-Suhaimi E. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assays using five primers reduces the false-positive rate in COVID-19 diagnosis. *Sci Rep.* 2023. V.13(1). 5066. doi: 10.1038/s41598-023-31760-z
 7. Amoah ID, Mthethwa NP, Pillay L, Deepnarain N, Pillay K, Awolusi OO, Kumari S, Bux F. RT-LAMP: A Cheaper, Simpler and Faster Alternative for the Detection of SARS-CoV-2 in Wastewater. *Food Environ Virol.* 2021. V.13(4). P.447-456. doi: 10.1007/s12560-021-09489-7
 8. Artik Y, Coşgun AB, Cesur NP, Hizel N, Uyar Y, Sur H, Ayan A. Comparison of COVID-19 laboratory diagnosis by commercial kits: Effectivity of RT-PCR to the RT-LAMP. *J Med Virol.* 2022. V.94(5). P.1998-2007. doi: 10.1002/jmv.27559
 9. Baek YH, Um J, Antigua KJC, Park JH, Kim Y, Oh S, Kim YI, Choi WS, Kim SG, Jeong JH, Chin BS, Nicolas HDG, Ahn JY, Shin KS, Choi YK, Park JS, Song MS. Development of a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification as a rapid early-detection method for novel SARS-CoV-2. *Emerg Microbes Infect.* 2020. V.9(1). P.998-1007. doi: 10.1080/22221751.2020.1756698
 10. Becherer L., Borst N., Bakheit M., Frischmann S., Zengerle R., von Stetten F. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – review and classification of methods for sequence-specific detection. *Anal. Methods.* 2020. V. 12(6). P.717-746. doi: 10.1039/C9AY02246E
 11. Bektaş A, Chapela I. Loop-mediated isothermal amplification of single pollen grains. *J. Integr. Plant Biol.* 2014. V. 56(8):741-8. doi: 10.1111/jipb.12191
 12. Bhadra S, Jiang YS, Kumar MR, Johnson RF, Hensley LE, Ellington AD. Real-time sequence-validated loop-mediated isothermal amplification assays for detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV). *PLoS One.* 2015. V.10(4). e0123126. doi: 10.1371/journal.pone.0123126
 13. Borah Slater K, Ahmad M, Poirier A, Stott A, Siedler BS, Brownsword M, Mehat J, Urbaniec J, Locker N, Zhao Y, La Ragione R, Silva SRP, McFadden J. Development of a loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based electrochemical test for rapid detection of SARS-CoV-2. *iScience.* 2023. V.26(9). 107570. doi: 10.1016/j.isci.2023.107570
 14. Chemeris A.V., Magdanov E.G., Garafutdinov R.R., Vakhitov V.A. How to exclude the appearance of false-positive results during the polymerase chain reaction? *Vestn. biotechnol. fiz.-chem. biol.* 2012. V. 8(3). P. 34-45. (In Russian)
 15. Chemeris D.A., Kiryanova O.Yu., Gubaydullin I.M., Chemeris A.V. Design of primers for polymerase chain reaction (Brief review of software and databases). *Biomics.* 2016. V. 8(3). P.215-238. (In Russian)
 16. 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, èpidemiologii i immunobiologii.* 2022. V.99(1). P.126–138. DOI: 10.36233/0372-9311-176 (In Russian)
 17. Choi G, Moehling TJ, Meagher RJ. Advances in RT-LAMP for COVID-19 testing and diagnosis. *Expert Rev Mol Diagn.* 2023. V.23(1). P.9-28. doi: 10.1080/14737159.2023.2169071
 18. Chow FW, Chan TT, Tam AR, Zhao S, Yao W, Fung J, Cheng FK, Lo GC, Chu S, Aw-Yong KL, Tang JY, Tsang CC, Luk HK, Wong AC, Li KS, Zhu L, He Z, Tam EWT, Chung TW, Wong SCY, Que TL, Fung KS, Lung DC, Wu AK, Hung IF, Woo PC, Lau SK. A Rapid, Simple, Inexpensive, and Mobile Colorimetric Assay COVID-19-LAMP for Mass On-Site Screening of COVID-19. *Int J Mol Sci.* 2020. V.21(15). 5380. doi: 10.3390/ijms21155380
 19. Colbert AJ, Lee DH, Clayton KN, Wereley ST, Linnes JC, Kinzer-Ursem TL. PD-LAMP smartphone detection of SARS-CoV-2 on chip. *Anal Chim Acta.* 2022. V.1203. 339702. doi: 10.1016/j.aca.2022.339702
 20. Das D, Lin CW, Chuang HS. On-chip screening of SARS-CoV-2 cDNA by LAMP-integrated rotational diffusometry. *Talanta.* 2024. V.267. 125253. doi: 10.1016/j.talanta.2023.125253
 21. de Oliveira KG, Estrela PFN, Mendes GM, Dos Santos CA, Silveira-Lacerda EP, Duarte GRM. Rapid molecular diagnostics of COVID-19 by RT-LAMP in a centrifugal polystyrene-toner based microdevice with endpoint visual detection. *Analyst.* 2021. V.146(4). P.1178-1187. doi: 10.1039/d0an02066d
 22. Dong Y, Zhao Y, Li S, Wan Z, Lu R, Yang X, Yu G, Reboud J, Cooper JM, Tian Z, Zhang C. Multiplex, Real-Time, Point-of-care RT-LAMP for SARS-CoV-2 Detection Using the HFman Probe. *ACS Sens.* 2022. V.7(3). P.730-739. doi: 10.1021/acssensors.1c02079
 23. Enosawa M, Kageyama S, Sawai K, Watanabe K, Notomi T, Onoe S, Mori Y, Yokomizo Y. Use of loop-mediated isothermal amplification of the IS900 sequence

- for rapid detection of cultured *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *J Clin Microbiol*. 2003. V.41(9):4359-65. doi: 10.1128/JCM.41.9.4359-4365.2003
24. Fu Q, Pang X, Su Z, Yang Y, Liu Y, Zhang Z, Fu Y, Wang J, Zhou J. Rapid On-Site Detection of SARS-CoV-2 Using RT-LAMP Assay with a Portable Low-Cost Device. *Biosensors (Basel)*. 2023. V.13(7). 724. doi: 10.3390/bios13070724
25. Garafutdinov R.R., Chemeris D.A., Mavzyutov A.R., Akhmetzyanova L.U., Davletkulov T.M., Gubaydullin I.M., Chemeris A.V. LAMP amplification of nucleic acids. I. Two decades of development and improvement. *Biomics*. 2021. V.13(2). P. 176-226. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-14 (In Russian)
26. Garafutdinov RR, Chemeris DA, Sakhabutdinova AR, Moiseev KV, Urmancheev SF, Mikhaylenko CI, Privalov LY, Chemeris AV. Convective polymerase chain reaction in standard microtubes. *Anal Biochem*. 2022. V.641. 114565. doi: 10.1016/j.ab.2022.114565
27. Garafutdinov R.R., Mavzyutov A.R., Alekseev Ya.I., Vorobev A.A., Nikonorov Yu.M., Chubukova O.V., Matniyazov R.T., Baymiev An.Kh., Maksimov I.V., Kuluev B.R., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. Human betacoronaviruses and their highly sensitive detection by PCR and other amplification methods. *Biomics*. 2020. V.12(1). P. 121-179. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-7 (In Russian)
28. Garafutdinov R.R., Mavzyutov A.R., Nikonorov Yu.M., Chubukova O.V., Matniyazov R.T., Baymiev An.Kh., Maksimov I.V., Miftakhov I.Yu., Khalikova E.Yu., Kuluev B.R., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. Betacoronavirus SARS-CoV-2, its genome, variety of genotypes and molecular-biological approaches to combat it. *Biomics*. 2020. V.12(2). P. 242-271. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-15 (In Russian)
29. García-Bernalt Diego J, Fernández-Soto P, Domínguez-Gil M, Belhassen-García M, Bellido JLM, Muro A. A Simple, Affordable, Rapid, Stabilized, Colorimetric, Versatile RT-LAMP Assay to Detect SARS-CoV-2. *Diagnostics (Basel)*. 2021. V.11(3). 438. doi: 10.3390/diagnostics11030438
30. García-Bernalt Diego J, Fernández-Soto P, Márquez-Sánchez S, Santos Santos D, Febrer-Sendra B, Crego-Vicente B, Muñoz-Bellido JL, Belhassen-García M, Corchado Rodríguez JM, Muro A. SMART-LAMP: A Smartphone-Operated Handheld Device for Real-Time Colorimetric Point-of-Care Diagnosis of Infectious Diseases via Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Biosensors (Basel)*. 2022. V.12(6). 424. doi: 10.3390/bios12060424
31. Grammatikos S, Svoliatopoulos I, Gizeli E. Naked-Eye Detection of LAMP-Produced Nucleic Acids in Saliva Using Chitosan-Capped AuNPs in a Single-Tube Assay. *Anal Chem*. 2023. V.95(50). P.18514-18521. doi: 10.1021/acs.analchem.3c03878
32. He X, Su F, Chen Y, Li Z. Novel reverse transcription-multiple inner primer loop-mediated isothermal amplification (RT-MIPLAMP) for visual and sensitive detection of SARS-CoV-2. *Anal Methods*. 2022. V.14(47). P.5012-5018. doi: 10.1039/d2ay01330d
33. Hong TC, Mai QL, Cuong DV, Parida M, Minekawa H, Notomi T, Hasebe F, Morita K. Development and evaluation of a novel loop-mediated isothermal amplification method for rapid detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Clin Microbiol*. 2004. V.42(5). P.1956-1961. DOI: 10.1128/jcm.42.5.1956-1961.2004
34. Huang P, Wang H, Cao Z, Jin H, Chi H, Zhao J, Yu B, Yan F, Hu X, Wu F, Jiao C, Hou P, Xu S, Zhao Y, Feng N, Wang J, Sun W, Wang T, Gao Y, Yang S, Xia X. A Rapid and Specific Assay for the Detection of MERS-CoV. *Front Microbiol*. 2018. V.9. 1101. doi: 10.3389/fmicb.2018.01101
35. Jaroenram W, Chatnuntaweck I, Kampeera J, Pengpanich S, Leungwutiwong P, Tondee B, Sirithammajak S, Suvannakad R, Khumwan P, Dangtip S, Arunrut N, Bantuchai S, Nguitragool W, Wongwaroran S, Khanchaitit P, Sattabongkot J, Teerapittayanon S, Kiatpathomchai W. One-step colorimetric isothermal detection of COVID-19 with AI-assisted automated result analysis: A platform model for future emerging point-of-care RNA/DNA disease diagnosis. *Talanta*. 2022. V.249. 123375. doi: 10.1016/j.talanta.2022.123375
36. Jhou YR, Wang CH, Tsai HP, Shan YS, Lee GB. An integrated microfluidic platform featuring real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for detection of COVID-19. *Sens Actuators B Chem*. 2022. V.358. 131447. doi: 10.1016/j.snb.2022.131447
37. Jia B, Li X, Liu W, Lu C, Lu X, Ma L, Li YY, Wei C. GLAPD: Whole Genome Based LAMP Primer Design for a Set of Target Genomes. *Front Microbiol*. 2019. V.10. 2860. doi: 10.3389/fmicb.2019.02860
38. Jones L, Bakre A, Naikare H, Kolhe R, Sanchez S, Mosley YC, Tripp RA. Isothermal amplification and fluorescent detection of SARS-CoV-2 and SARS-CoV-2 variant virus in nasopharyngeal swabs. *PLoS One*. 2021. V.16(9). e0257563. doi: 10.1371/journal.pone.0257563
39. Iijima T, Sakai J, Kanamori D, Ando S, Nomura T, Tisi L, Kilgore PE, Percy N, Kohase H, Hayakawa S, Maesaki S, Hoshino T, Seki M. A New Method to Detect Variants of SARS-CoV-2 Using Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Combined with a Bioluminescent Assay in Real Time (RT-LAMP-BART). *Int J Mol Sci*. 2023. V.24(13). 10698. doi: 10.3390/ijms241310698
40. Kalendar R, Tselykh TV, Khassenov B, Ramanculov EM. Introduction on Using the FastPCR Software and the Related Java Web Tools for PCR and Oligonucleotide Assembly and Analysis. *Methods Mol*

- Biol.* 2017. V.1620. P.33-64. doi: 10.1007/978-1-4939-7060-5_2
41. Khafizov K.F., Petrov V.V., Krasovtsov K.V., Zolkina M.V., Akimkin V.G. Rapid diagnosis of a new coronavirus infection using the isothermal loop amplification reaction. *Voprosy virol.* 2021. V. 66(1). P.17-28. doi: 10.36233/0507-4088-42
42. Kim HE, Schuck A, Park H, Huh HJ, Kang M, Kim YS. Gold nanostructures modified carbon-based electrode enhanced with methylene blue for point-of-care COVID-19 tests using isothermal amplification. *Talanta.* 2023. V.265. 124841. doi: 10.1016/j.talanta.2023.124841
43. Kim JH, Kang M, Park E, Chung DR, Kim J, Hwang ES. A Simple and Multiplex Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Assay for Rapid Detection of SARS-CoV. *Biochip J.* 2019. V.13(4). P.341-351. doi: 10.1007/s13206-019-3404-3
44. Kim SH, Lee SY, Kim U, Oh SW. Diverse methods of reducing and confirming false-positive results of loop-mediated isothermal amplification assays: A review. *Anal Chim Acta.* 2023a. V.1280. 341693. doi: 10.1016/j.aca.2023.341693
45. Kline EC, Panpradist N, Hull IT, Wang Q, Oreskovic AK, Han PD, Starita LM, Lutz BR. Multiplex Target-Redundant RT-LAMP for Robust Detection of SARS-CoV-2 Using Fluorescent Universal Displacement Probes. *Microbiol Spectr.* 2022. V.10(4). e0158321. doi: 10.1128/spectrum.01583-21
46. Lai MY, Bukhari FDM, Zulkefli NZ, Ismail I, Mustapa NI, Soh TST, Hassan AH, Peariasamy KM, Lee YL, Suppiah J, Thayan R, Lau YL. Colorimetric detection of SARS-CoV-2 by uracil-DNA glycosylase (UDG) reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Int J Infect Dis.* 2022. V.120. P.132-134. doi: 10.1016/j.ijid.2022.04.036
47. Lee SH, Baek YH, Kim YH, Choi YK, Song MS, Ahn JY. One-Pot Reverse Transcriptional Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for Detecting MERS-CoV. *Front Microbiol.* 2017. V.7. 2166. doi: 10.3389/fmicb.2016.02166
48. Ludwig KU, Schmithausen RM, Li D, Jacobs ML, Hollstein R, Blumenstock K, Liebing J, Ślabicki M, Ben-Shmuel A, Israeli O, Weiss S, Ebert TS, Paran N, Rüdiger W, Wilbring G, Feldman D, Lippke B, Ishorst N, Hochfeld LM, Beins EC, Kaltheuner IH, Schmitz M, Wöhler A, Döhla M, Sib E, Jentzsch M, Moench EC, Borrajo JD, Strecker J, Reinhardt J, Cleary B, Geyer M, Hölzel M, Macrae R, Nöthen MM, Hoffmann P, Exner M, Regev A, Zhang F, Schmid-Burgk JL. LAMP-Seq enables sensitive, multiplexed COVID-19 diagnostics using molecular barcoding. *Nat Biotechnol.* 2021. V.39(12). P.1556-1562. doi: 10.1038/s41587-021-00966-9
49. Mavzyutov A.R., Garafutdinov R.R., Khalikova E.Yu., Gazizov R.R., Baymiev An.Kh., Nikonorov Yu.M., Maksimov I.V., Kuluev B.R., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. The enigmas of the new coronavirus SARS-CoV-2. *Biomics.* 2021. V.13(1). P. 75-99. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2021-7 (In Russian)
50. Mavzyutov A.R., Garafutdinov R.R., Khalikova E.Yu., Yuldashev R.A., Khusainova R.I., Chubukova O.V., Gimalov F.R., Matniyazov R.T., Alekseev Ya.I., Vorobev A.A., Vershinina Z.R., Miftakhov I.Yu., Nikonorov Yu.M., Maksimov I.V., Kuluev B.R., Baymiev An.Kh., Baymiev Al.Kh., Chemeris A.V. Problematic aspects of diagnostics of SARS-CoV-2 coronavirus infection using reverse-transcriptional PCR. *Biomics.* 2020. V.12(4). P. 564-590. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2020-50 (In Russian)
51. Minami K, Masutani R, Suzuki Y, Kubota M, Osaka N, Nakanishi T, Nakano T, Ukimura A. Evaluation of SARS-CoV-2 RNA quantification by RT-LAMP compared to RT-qPCR. *J Infect Chemother.* 2021. V.27(7). P.1068-1071. doi: 10.1016/j.jiac.2021.05.004
52. 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. V.289(1). P.150-154. doi: 10.1006/bbrc.2001.5921
53. Mytzka N, Arbaciauskaite S, Sandetskaya N, Mattern K, Kuhlmeier D. A fully integrated duplex RT-LAMP device for the detection of viral infections. *Biomed Microdevices.* 2023. V.25(4). 36. doi: 10.1007/s10544-023-00676-w
54. Nagamine K, Hase T, Notomi T. Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers. *Mol Cell Probes.* 2002. V.16(3). P.223-229. doi: 10.1006/mcpr.2002.0415
55. Natoli ME, Kundrod KA, Chang MM, Smith CA, Paul S, Coole JB, Butlin NG, Tanner NA, Baker E, Schmeler KM, Richards-Kortum R. Improving Performance of a SARS-CoV-2 RT-LAMP Assay for Use With a Portable Isothermal Fluorimeter: Towards a Point-of-Care Molecular Testing Strategy. *J Biomol Tech.* 2021. V.32(3). P.180-185. doi: 10.7171/jbt.21-3203-013
56. Nguyen HA, Choi H, Lee NY. A Rotatable Paper Device Integrating Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification and a Food Dye for Colorimetric Detection of Infectious Pathogens. *Biosensors (Basel).* 2022. V.12(7). 488. doi: 10.3390/bios12070488
57. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000. V.28(12). E63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63
58. O'Halloran DM. STITCHER: A web resource for high-throughput design of primers for overlapping PCR applications. *Biotechniques.* 2015. V.58(6). P.325-328. doi: 10.2144/000114301
59. O'Halloran DM, Uriagereka-Herburger I, Bode K. STITCHER 2.0: primer design for overlapping PCR

- applications. *Sci Rep.* 2017. V.7. 45349. doi: 10.1038/srep45349
60. Papadakis G, Pantazis AK, Fikas N, Chatziioannidou S, Tsiakalou V, Michaelidou K, Pogka V, Megariti M, Vardaki M, Giarentis K, Heaney J, Nastouli E, Karamitros T, Mentis A, Zafiropoulos A, Sourvinos G, Agelaki S, Gizeli E. Portable real-time colorimetric LAMP-device for rapid quantitative detection of nucleic acids in crude samples. *Sci Rep.* 2022. V.12(1). 3775. doi: 10.1038/s41598-022-06632-7
61. Papamatthaiou S, Boxall-Clasby J, Douglas EJA, Jajnesniak P, Peyret H, Mercer-Chalmers J, Kumar VKS, Lomonosoff GP, Reboud J, Laabei M, Cooper JM, Kasprzyk-Hordern B, Moschou D. LoCKamp: lab-on-PCB technology for <3 minute virus genetic detection. *Lab Chip.* 2023. V.23(20). P.4400-4412. doi: 10.1039/d3lc00441d
62. Park GS, Ku K, Baek SH, Kim SJ, Kim SI, Kim BT, Maeng JS. Development of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays Targeting Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). *J Mol Diagn.* 2020. V.22(6). P.729-735. doi: 10.1016/j.jmoldx.2020.03.006
63. Poon LL, Leung CS, Tashiro M, Chan KH, Wong BW, Yuen KY, Guan Y, Peiris JS. Rapid detection of the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus by a loop-mediated isothermal amplification assay. *Clin Chem.* 2004. 50(6). P.1050-1052. doi: 10.1373/clinchem.2004.032011
64. Poon L.L., Wong B.W., Chan K.H., Ng S.S., Yuen K.Y., Guan Y., Peiris J.S. Evaluation of real-time reverse transcriptase PCR and real-time loop-mediated amplification assays for severe acute respiratory syndrome coronavirus detection. *Journal of Clinical Microbiology.* 2005. V. 43 (7). P. 3457-9. doi: 10.1128/JCM.43.7.3457-3459.2005
65. Pourakbari R, Gholami M, Shakerimoghaddam A, Khiavi FM, Mohammadimehr M, Khomartash MS. Comparison of RT-LAMP and RT-qPCR assays for detecting SARS-CoV-2 in the extracted RNA and direct swab samples. *J Virol Methods.* 2024. V.324. 114871. doi: 10.1016/j.jviromet.2023.114871
66. Rioboó-Legaspi P, González-López A, Beltrán-Sánchez JF, Cima-Cabal MD, García-Suárez MM, Sánchez AJG, Fernández-Otero T, Haro JG, Costa-Rama E, Fernández-Abedul MT. Phenol red as electrochemical indicator for highly sensitive quantification of SARS-CoV-2 by loop-mediated isothermal amplification detection. *Talanta.* 2024. V.266(1). 124963. doi: 10.1016/j.talanta.2023.124963
67. Rivas-Macho A, Sorraín A, Marimón JM, Goñi-de-Cerio F, Olabarria G. Extraction-Free Colorimetric RT-LAMP Detection of SARS-CoV-2 in Saliva. *Diagnostics (Basel).* 2023. V.13(14). 2344. doi: 10.3390/diagnostics13142344
68. Rodríguez-Penedo A, Rioboó-Legaspi P, González-López A, Lores-Padín A, Pereiro R, García-Suárez MDM, Cima-Cabal MD, Costa-Rama E, Fernández B, Fernández-Abedul MT. Electrocatalytic Palladium Nanoclusters as Versatile Indicators of Bioassays: Rapid Electroanalytical Detection of SARS-CoV-2 by Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Adv Healthc Mater.* 2023. V.12(12). e2202972. doi: 10.1002/adhm.202202972
69. Sakhabutdinova AR, Chemeris AV, Garafutdinov RR. Detection of Specific RNA Targets by Multimerization. *Biochemistry (Mosc).* 2023. V.88(5). P.679-686. doi: 10.1134/S0006297923050103
70. Sakhabutdinova AR, Gazizov RR, Chemeris AV, Garafutdinov RR. Reverse transcriptase-free detection of viral RNA using Hemo KlenTaq DNA polymerase. *Anal Biochem.* 2022. V.659. 114960. doi: 10.1016/j.ab.2022.114960
71. Sakhabutdinova AR, Kamalov MI, Salakhieva DV, Mavzyutov AR, Garafutdinov RR. Inhibition of nonspecific polymerase activity using Poly(Aspartic) acid as a model anionic polyelectrolyte. *Anal Biochem.* 2021. V.628. 114267. doi: 10.1016/j.ab.2021.114267
72. Salinas NR, Little DP. Electric LAMP: Virtual Loop-Mediated Isothermal AMPLification. *ISRN Bioinform.* 2012. 2012. 696758. doi: 10.5402/2012/696758
73. Sherrill-Mix S, Hwang Y, Roche AM, Glascock A, Weiss SR, Li Y, Haddad L, Deraska P, Monahan C, Kromer A, Graham-Wooten J, Taylor LJ, Abella BS, Ganguly A, Collman RG, Van Duyne GD, Bushman FD. Detection of SARS-CoV-2 RNA using RT-LAMP and molecular beacons. *Genome Biol.* 2021. V.22(1). 169. doi: 10.1186/s13059-021-02387-y
74. Shirato K, Yano T, Senba S, Akachi S, Kobayashi T, Nishinaka T, Notomi T, Matsuyama S. Detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Virol J.* 2014. V.11. 139. doi: 10.1186/1743-422X-11-139
75. Shirshikov FV, Pekov YA, Miroshnikov KA. MorphoCatcher: a multiple-alignment based web tool for target selection and designing taxon-specific primers in the loop-mediated isothermal amplification method. *Peer J.* 2019. V.7. e6801. doi: 10.7717/peerj.6801
76. Stranieri A, Lauzi S, Giordano A, Paltrinieri S. Reverse transcriptase loop-mediated isothermal amplification for the detection of feline coronavirus. *J Virol Methods.* 2017. V.243. P.105-108. doi: 10.1016/j.jviromet.2017.01.009
77. Su F, He X, Zhang P, Wang H, Li Z. Water-soluble polythiophene-based colorimetry for the quick and accurate detection of SARS-CoV-2 RNA. *Talanta.* 2023. V.256. 124320. doi: 10.1016/j.talanta.2023.124320
78. Talap J, Shen M, Yu L, Zeng S, Cai S. RT-LAMP assay combining multi-fluorescent probes for SARS-CoV-

- 2 RNA detection and variant differentiation. *Talanta*. 2022. V.248. 123644. doi: 10.1016/j.talanta.2022.123644
79. Tamanaha E, Zhang Y, Tanner NA. Profiling RT-LAMP tolerance of sequence variation for SARS-CoV-2 RNA detection. *PLoS One*. 2022. V.17(3). e0259610. doi: 10.1371/journal.pone.0259610
80. Tang Z, Nouri R, Dong M, Yang J, Greene W, Zhu Y, Yon M, Nair MS, Kuchipudi SV, Guan W. Rapid detection of novel coronavirus SARS-CoV-2 by RT-LAMP coupled solid-state nanopores. *Biosens Bioelectron*. 2022. V.197. 113759. doi: 10.1016/j.bios.2021.113759
81. Tarim EA, Oksuz C, Karakuzu B, Appak O, Sayiner AA, Tekin HC. Electromechanical RT-LAMP device for portable SARS-CoV-2 detection. *Talanta*. 2023. V.254. 124190. doi: 10.1016/j.talanta.2022.124190
82. Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols*. 2008. V.3(5). P.877-882. doi: 10.1038/nprot.2008.57
83. Torezin Mendonça G, Cassaboni Stracke M, de Oliveira Coelho B, Bruna Soligo Sanchuki H, Klassen de Oliveira V, Klerynton Marchini F, Lucíola Zanette D, Nóbrega Aoki M, Ribeiro Viana E, Blanes L. A new RT-LAMP-on-a-Chip Instrument for SARS-CoV-2 diagnostics. *Microchem J*. 2022. V.180. 107600. doi: 10.1016/j.microc.2022.107600
84. Torres C, Vitalis EA, Baker BR, Gardner SN, Torres MW, Dzenitis JM. LAVA: an open-source approach to designing LAMP (loop-mediated isothermal amplification) DNA signatures. *BMC Bioinformatics*. 2011. V.12. 240. doi: 10.1186/1471-2105-12-240
85. Varlamov DA, Blagodatskikh KA, Smirnova EV, Kramarov VM, Ignatov KB. Combinations of PCR and Isothermal Amplification Techniques Are Suitable for Fast and Sensitive Detection of SARS-CoV-2 Viral RNA. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020. V.8. 604793. doi: 10.3389/fbioe.2020.604793
86. Wang H, Cong F, Zeng F, Lian Y, Liu X, Luo M, Guo P, Ma J. Development of a real time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification method (RT-LAMP) for detection of a novel swine acute diarrhea syndrome coronavirus (SADS-CoV). *J Virol Methods*. 2018. V.260. P.45-48. doi: 10.1016/j.jviromet.2018.06.010
87. Weisgerber DW, Langer K, Servellita V, Xu P, Chiu CY, Abate AR. Viral load quantitation at the point-of-care with shaken digital droplet RT-LAMP. *Lab Chip*. 2023. V.23(15). P.3479-3486. doi: 10.1039/d3lc00096f
88. Werbach S, Larocca L, Carrillo C, Stolorowicz F, Ogas L, Pallotto S, Cassará S, Mammana L, Zapiola I, Bouzas MB, Vojnov AA. Colorimetric RT-LAMP Detection of Multiple SARS-CoV-2 Variants and Lineages of Concern Direct from Nasopharyngeal Swab Samples without RNA Isolation. *Viruses*. 2023. V.15(9). 1910. doi: 10.3390/v15091910
89. Yan C, Cui J, Huang L, Du B, Chen L, Xue G, Li S, Zhang W, Zhao L, Sun Y, Yao H, Li N, Zhao H, Feng Y, Liu S, Zhang Q, Liu D, Yuan J. Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Clin Microbiol Infect*. 2020. V.26(6). P.773-779. doi: 10.1016/j.cmi.2020.04.001
90. Yang A.K., Lu H., Wu S.Y., Kwok H.C., Ho H.P., Yu S., Cheung A.K., Kong S.K. Detection of Pantone-Valentine Leukocidin DNA from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by resistive pulse sensing and loop-mediated isothermal amplification with gold nanoparticles. *Anal. Chim. Acta*. 2013. V. 782:46-53. doi: 10.1016/j.aca.2013.04.004.
91. Yang K.L.A., Wu S.Y., Kwok H.C., Ho H.P., Kong S.K. Using Loop-mediated Isothermal DNA Amplification (LAMP) and Spectral Surface Plasmon Resonance (SPR) to Detect Methicillin-resistance *S. aureus* (MRSA). *Proc. Int. Conf. Biomed. Engin. Biotechnol. iCBEB*. 2012. 647-650. doi: 10.1109/iCBEB.2012.462
92. Yang T, Li D, Yan Y, Ettoumi FE, Wu RA, Luo Z, Yu H, Lin X. Ultrafast and absolute quantification of SARS-CoV-2 on food using hydrogel RT-LAMP without pre-lysis. *J Hazard Mater*. 2023. V.442. 130050. doi: 10.1016/j.jhazmat.2022.130050
93. Ye H, Nowak C, Liu Y, Li Y, Zhang T, Bleris L, Qin Z. Plasmonic LAMP: Improving the Detection Specificity and Sensitivity for SARS-CoV-2 by Plasmonic Sensing of Isothermally Amplified Nucleic Acids. *Small*. 2022. V.18(12). e2107832. doi: 10.1002/sml.202107832
94. Yu L, Wu S, Hao X, Dong X, Mao L, Pelechano V, Chen W-H, Yin X. Rapid Detection of COVID-19 Coronavirus Using a Reverse Transcriptional Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Diagnostic Platform. *Clinical Chemistry*. 2020. V.66(7). P.975-977. doi: 10.1093/clinchem/hvaa102
95. Zhang Y, Ren G, Buss J, Barry AJ, Patton GC, Tanner NA. Enhancing colorimetric loop-mediated isothermal amplification speed and sensitivity with guanidine chloride. *Biotechniques*. 2020. V.69(3). P.178-185. doi: 10.2144/btn-2020-0078