

Современное состояние диагностики возбудителей вирусных геморрагических лихорадок методом изотермической амплификации

Е.И. Кривошеина¹, К.Р. Беличенко^{1,2}, М.Ю. Карташов¹, Е.В. Чуб¹

¹ Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора
630559, Новосибирская область, р/н Кольцово

² Новосибирский государственный университет
630090, г. Новосибирск, ул. Пирогова, 2

Резюме

Работа представляет собой обзор метода петлевой изотермической амплификации (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) и его применения для диагностики геморрагических лихорадок. Ее цель состояла в краткой характеристике изотермической амплификации и систематизации имеющихся данных о диагностике данным методом геморрагических лихорадок, вызываемых возбудителями, которые относятся к первой группе патогенности. В обзоре описывается принцип работы LAMP, основанный на применении цепь-вытесняющей активности ДНК-полимеразы. Подробно рассматриваются преимущества метода, такие как высокая чувствительность и специфичность, простота проведения и экономическая эффективность. Также обсуждаются различные способы детекции результатов LAMP, включая турбидиметрический метод, использование флуоресцентных красителей и иммунохроматографический анализ. Отмечается, что LAMP имеет некоторые ограничения, такие как сложность подбора праймеров и возможность ложноотрицательных результатов при наличии мутаций в геноме. Однако в целом метод представляется перспективным для быстрого обнаружения вирусов в полевых условиях. Приводится информация о разработанных диагностических тест-системах на основе LAMP для выявления РНК особо опасных вирусов, относящихся к семействам *Filoviridae* и *Arenaviridae*. Отмечается, что, несмотря на перспективность метода, на данный момент ни одна из описанных тест-систем не зарегистрирована и не производится на коммерческой основе. Заключение подчеркивает необходимость разработки и внедрения новых методов диагностики опасных вирусных инфекций для контроля эпидемиологической ситуации и разработки стратегии противоэпидемических мероприятий. LAMP рассматривается как перспективный метод для создания быстрых и экономически эффективных тестов.

Ключевые слова: геморрагическая лихорадка, изотермическая амплификация, LAMP, способы детекции, диагностика.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Обзор выполнен в рамках государственного задания ФБУН ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора НОКР 1.1.12 «Разработка петлевой изотермической амплификации (LAMP) для диагностики особо опасных вирусных инфекций I–II групп патогенности».

Автор для переписки. Кривошеина Е.И., e-mail: katr962@mail.ru

Для цитирования. Кривошеина Е.И., Беличенко К.Р., Карташов М.Ю., Чуб Е.В. Современное состояние диагностики возбудителей вирусных геморрагических лихорадок методом изотермической амплификации. *Сиб. науч. мед. ж.* 2025;45(4):29–38. doi: 10.18699/SSMJ20250403

Current state of diagnostics of pathogens of viral hemorrhagic fevers using isothermal amplification method

E.I. Krivosheina¹, K.R. Belichenko^{1,2}, M.Yu. Kartashov¹, E.V. Chub¹

¹State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector”
630559, Novosibirsk Region, Koltsovo

²Novosibirsk State University
630090, Novosibirsk, Pirogova st., 2

Abstract

The work is an overview of the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method and its application to diagnostics of hemorrhagic fevers. Its objective was to briefly characterize isothermal amplification and systematize the available data on diagnostics by this method of hemorrhagic fevers caused by pathogens belonging to the first pathogenicity group. The review describes the principle of LAMP operation, which is based on the use of chain-displacing activity of DNA polymerase. The advantages of the method, such as high sensitivity and specificity, simplicity of implementation and cost-effectiveness, are considered in detail. Various methods for detecting LAMP results are also discussed, including the turbidimetric method, the use of fluorescent dyes and immunochromatographic analysis. It is noted that LAMP has some limitations, such as the complexity of primer selection and the possibility of false negative results in the presence of mutations in the genome. However, in general, the method seems promising for rapid detection of viruses in the field. The review provides information on the developed diagnostic test systems based on LAMP for detecting RNA of especially dangerous viruses belonging to the Filoviridae and Arenaviridae families. It is noted that despite the promise of the method, at present none of the described test systems are registered or produced on a commercial basis. The conclusion emphasizes the need to develop and implement new methods for diagnosing dangerous viral infections to control the epidemiological situation and develop a strategy for anti-epidemic measures. LAMP is considered a promising method for creating rapid and cost-effective tests.

Key words: hemorrhagic fever, isothermal amplification, LAMP, detection methods, diagnostics.

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

Financing. This study was supported by the State Scientific Center of Virology and Biotechnology “Vector” as part of the state R&D task 1.1.12 “Development of loop-based isothermal amplification (LAMP) for the diagnosis of particularly dangerous viral infections of pathogenicity groups I–II”.

Correspondence author. Krivosheina E.I., e-mail: katr962@mail.ru

Citation. Krivosheina E.I., Belichenko K.R., Kartashov M. Yu., Chub E.V. Current state of diagnostics of pathogens of viral hemorrhagic fevers using isothermal amplification method. *Sibirskij nauchnyj medicinskij zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2025;45(4):29–38. doi: 10.18699/SSMJ20250403

Введение

Согласно Российской классификации патогенных для человека микроорганизмов, вирусы, относящиеся к первой группе патогенности и вызывающие геморрагические лихорадки, являются представителями родов *Orthoebolavirus* и *Orthomareburgvirus* (сем. Filoviridae) и рода *Mammarenavirus* (сем. Arenaviridae) (табл. 1). Поскольку геморрагические лихорадки трудно распознать клинически, особенно на ранних стадиях, необходима своевременная лабораторная диагностика для начала специфического лечения. Лабораторные методы выявления возбудителей геморрагических лихорадок основаны на обнаружении вируса или компонентов его вириона (РНК и специфических антигенов), а также исследовании динамики титра специфических антител и проводятся с использованием вирусологических, серологических и молекулярно-генетических тестов [1].

В настоящее время доступны лабораторные и коммерческие анализы, но тестирование в основном проводится в референс-лабораториях, что задерживает начало лечения и может приводить к летальным исходам заболевания. Наиболее широко используемым вариантом амплификации нуклеиновых кислот в лабораторной диагно-

стике вирусных инфекций на сегодняшний день является ПЦР в реальном времени, в том числе с использованием обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) в случае РНК-вирусов. Тесты, основанные на ПЦР, обладают высокой чувствительностью и специфичностью, а также экономической эффективностью. Однако в последние годы изотермические методы амплификации нуклеиновых кислот постепенно становятся не менее важным диагностическим инструментом. За счет отсутствия необходимости обеспечения сложных температурных режимов при проведении реакции становится возможным использовать более простое и доступное оборудование, что делает изотермические методы привлекательными для создания быстрых диагностических тестов.

Цель обзора – краткая характеристика петлевой изотермической амплификации (loop-mediated isothermal amplification, LAMP) и систематизация имеющихся данных о диагностике данным методом геморрагических лихорадок, вызываемых возбудителями, которые относятся к первой группе патогенности.

Характеристика метода

LAMP основана на применении ДНК-полимеразы с цепь-вытесняющей активностью.

Таблица 1. Перечень видов вирусов, относящихся к I группе патогенности

Table 1. List of types of viruses belonging to pathogenicity group I

Род	Вид	Сокращенное название, используемое в данной статье
<i>Orthoebolavirus</i>	<i>Orthoebolavirus bombaliense</i>	EBOV
	<i>Orthoebolavirus bundibugyoense</i>	
	<i>Orthoebolavirus restonense</i>	
	<i>Orthoebolavirus sudanense</i>	
	<i>Orthoebolavirus taiense</i>	
	<i>Orthoebolavirus zairense</i>	
<i>Orthomareburgvirus</i>	<i>Orthomareburgvirus marburgense</i>	MARV
<i>Mammarenavirus</i>	<i>Mammarenavirus guianense</i>	GTOV
	<i>Mammarenavirus lasiaense</i>	LASV
	<i>Mammarenavirus juninense</i>	JUNV
	<i>Mammarenavirus machupoense</i>	MACH

Примечание. Данные о таксономии взяты из <https://ictv.global/taxonomy>.

Впервые данный метод описан в 2000 г. T. Notomi et al. [2]. Для постановки реакции требуется минимум четыре праймера: два внешних (“forward outer primer” и “backward outer primer”, F3 и B3 соответственно) и два внутренних (“forward inner primer” и “backward inner primer”, FIP и BIP соответственно). Все стадии реакции протекают при оптимальной температуре 60–65 °C. В реакции применяется Bst-полимераза, представляющая собой ДНК-полимеразу I, выделенную из термофильной бактерии *Geobacillus stearothermophilus*. Она устойчива к ингибиторам, обладает сильной цепь-вытесняющей активностью и способна синтезировать длинные участки цепи. Применяются и другие термостабильные полимеразы с улучшенными характеристиками: Bst 2.0 (NEB, Великобритания), Bst 3.0 (NEB, Великобритания), OmniAmp (Lucigen, США) [3].

Праймер FIP гибридизуется с целевой кДНК и иницирует синтез комплементарной цепи (рисунок, а). Внешний праймер F3 приводит к замещению цепи FIP новой цепью ДНК-полимеразы (рисунок, б). Освободившаяся одноцепочечная ДНК служит матрицей для обратных праймеров: синтеза цепи BIP и замещающей цепи B3 (рисунок, в). Одноцепочечные ДНК в результате формируют шпильчатые структуры из-за комплементарности 5'- и 3'-концов участков F1 и B1 к последовательностям F1c и B1c соответственно, следующим после праймеров (рисунок, г). Такие “стволовые шпильки” служат основой для нециклической амплификации целевого фрагмента, образующей конкатемеры. Таким образом, LAMP обладает высокой чувствительностью и меньше чем за час приводит к накоплению около 10⁹ ко-

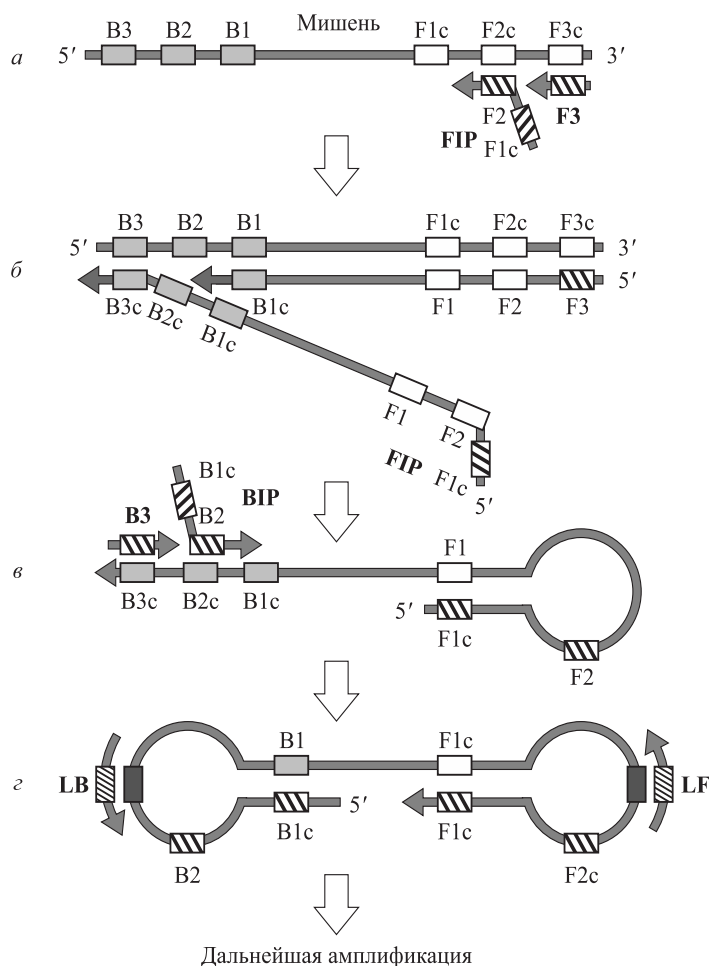
пий ДНК [2]. Использование четырех праймеров, комплементарных шести различным последовательностям ДНК, обуславливает высокую специфичность метода.

В настоящее время применяют модификацию метода с использованием шести праймеров, комплементарных восьми участкам ДНК [5, 6]. В реакцию добавляются два дополнительных «петлевых» праймера, прямой (LF) комплементарен участку между последовательностями F1c и F2c, обратный (LB) – участку между последовательностями B1c и B2c. Данная модификация позволяет детектировать результаты меньше чем за 30 минут после начала реакции.

Способы детекции результатов

Основным преимуществом LAMP является возможность применения простых методов для обнаружения продуктов реакции. Классический анализ ампликонов «по конечной точке» основан на проведении электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле. Конкатемеры различной длины образуют полосы, формируя характерную «лестницу» на электрофореграмме. При постановке электрофореза тратится много времени на приготовление геля, а также увеличивается риск контаминации продуктами амплификации, что приводит к необходимости поиска более удобных методов. Для LAMP применяется колориметрическая детекция с использованием флуоресцентных красителей, флуоресценция в реальном времени, турбидиметрический метод, иммунохроматографический анализ [7].

Анализ в режиме реального времени требует дорогостоящих флуоресцентных зондов для



Общая схема метода LAMP [4]

General principle of loop-mediated isothermal amplification [4]

цировать, его свечение усиливается ионами магния. Изменение цвета реакционной смеси от оранжевого к желтому можно заметить невооруженным глазом, что значительно упрощает анализ. К другим широко используемым индикаторам относятся гидроксинафтоловый синий [12–15] и эриохром черный Т [16, 17]. Первый приводит к изменению окраски раствора от темно-синего к голубому, второй – от фиолетового к синему. Также существуют pH-чувствительные индикаторы, способные реагировать на изменение концентраций катионов водорода в ходе амплификации. К таким красителям относятся феноловый красный, крезоловый красный и нейтральный красный [10].

Различные интеркалирующие красители используются для обнаружения продукта LAMP как в режиме реального времени, так и по конечной точке [18]. Они способны внедряться в двухцепочечные участки нуклеиновых кислот, вызывая сильный флуоресцентный сигнал. Интеркалирующий краситель SYBR Green I является специфическим красителем для двухцепочечной ДНК, но его можно использовать и для визуализации одноцепочечной ДНК, а также РНК, но со значительно меньшей эффективностью. Он способен изменять окраску от оранжевой к желто-зеленой в случае положительной пробы, также возможна детекция свечения в ультрафиолете. Данный краситель активно применяется в исследованиях [19–21], однако он является сильным ингибитором ДНК-полимеразы. В реакции LAMP используют и другие интеркалирующие красители: EvaGreen, PicoGreen, SYTO-9 [15], SYTO-81, йодид пропидия [22], берберин [23].

специфичности реакции, поэтому разрабатываются и другие, более простые и экономически выгодные количественные методы. Для LAMP был специально разработан турбидиметрический метод [8]: в ходе амплификации из нуклеозидтрифосфатов высвобождается пирофосфат, который способен связываться с ионами магния из буфера и осажаться ($Mg_2P_2O_7$) [9], количество осадка пропорционально количеству синтезированной ДНК. При помощи турбидиметра возможно измерение оптической плотности реакционной смеси в режиме реального времени без риска контаминации.

Использование флуоресцентных красителей повышает чувствительность детекции и ускоряет процесс анализа результатов [10]. В 2008 г. предложен метод визуализации продуктов реакции при помощи металлоиндикатора кальцеина [11]. Ионы марганца способны гасить флуоресцентный сигнал кальцеина, формируя с ним комплексы, при добавлении их в реакционную смесь, та приобретает оранжевый цвет. В ходе амплификации ионы марганца комплекса и магния из буфера конкурируют за образующийся пирофосфат. Свободный от марганца кальцеин начинает флуорес-

В диагностических тестах применяют иммунохроматографический анализ [22]. Меченные биотином и изотиоцианатом флуоресцеина праймеры после амплификации дают модифицированные продукты с метками. Полученные ампликоны наносят на тест-полоску, они связываются с антителами к флуоресцеину, которые расположены на поверхности наночастиц коллоидного золота. По принципу тонкослойной хроматографии комплекс ампликона, антител и наночастиц золота движется вдоль тест-полоски, достигая участка, содержащего авидин (биотин-связыва-

ющий белок), и образуется цветная линия. При отрицательном результате наночастицы проходят до участка, содержащего вторичные антитела, где происходит их связывание с образованием контрольной линии. Данный метод легок в использовании, удобен и экономически доступен [10], а также допускает применение различных антител и меток для мультиплексного анализа.

Однако большинство методов детекции не позволяет отличить специфическую амплификацию от неспецифической. В работе L. Schneider et al. [24] для решения данной проблемы разработана математическая модель для прогнозирования полосовых схем LAMP-продуктов в гель-электрофорезе в зависимости от заданных условий реакции. Для построения модели использовали данные об оценке структур ампликонов с помощью электрофореза на микрочипах.

Ограничения метода

Высокая специфичность, скорость наработки ампликонов и быстрые методы детекции отличают LAMP от ПЦР. Несмотря на множество преимуществ, данный метод имеет свои недостатки. Главная сложность состоит в подборе праймеров, они должны узнавать от 6 до 8 (в случае использования петлевых праймеров) участков целевой ДНК. Необходимо учитывать не только температуру плавления, концентрацию, размер, но и расстояния между сайтами их связывания. Кроме того, большое количество применяемых в реакции праймеров увеличивает вероятность их взаимодействия друг с другом [7]. Программы и онлайн-ресурсы для конструирования LAMP-праймеров, такие как PrimerExplorer, NEB LAMP Primer Design Tool, LAVA, GLAPD, LAMPPrimer iQ, MorphoCatcher, FastPCR и STITCHER, описаны в обзоре К.Г. Птицына и соавт. [25]. Тем не менее существующие программы для набора LAMP-праймеров не всегда способны предусмотреть все факторы, что требует дополнительной эмпирической оптимизации [26]. В результате этого процесс дизайна праймеров получается долгим и трудоемким. Высокая специфичность также может приводить к ложноотрицательным результатам в случае мутаций в геноме. В работе [27] проводилось исследование влияний одной и нескольких нуклеотидных мутаций на протекание реакции изотермической амплификации. В результате некоторые мутации препятствовали связыванию праймеров и снижали скорость амплификации. Особенно оказались критичны мутации в области 3'-конца праймера F3.

Чувствительность метода LAMP, как правило, ниже, чем метода ПЦР, а предел обнаружения (копий/мл) сильно варьирует от выбора способа

детекции. В недавних разработках метода LAMP для быстрого и визуального обнаружения вируса оспы обезьян он показал предел обнаружения 2×10^4 копий/мл, что превысило чувствительность ПЦР-детекции электрофорезом на два порядка [28]. Несмотря на это, многие тест-системы на основе LAMP уступают современным методам ПЦР в чувствительности (например, в 2 раза – ПЦР в реальном времени с использованием зондов [29] и с проведением обратной транскрипции [30], в 10 раз – цифровой капельной ПЦР [31]).

Сравнение чувствительности некоторых методов визуализации LAMP, включая барберин, представлено в статье J. Fischbach et al. [32]. Авторы утверждают, что чувствительность детекции по конечной точке при использовании гидроксинафтолового синего сравнима с таковой при использовании кальцеина, а при детекции в реальном времени с интеркалирующими красителями SYBR Green I и EvaGreen – с чувствительностью барберина. Однако при использовании барберина при детекции «невооруженным взглядом», без флуориметра, достаточно сложно интерпретировать результаты.

Метод мониторинга в реальном времени на основе флуоресценции (интеркалирующие красители, зонды) отличается более высокой чувствительностью и скоростью реакции, чем турбидиметрия [7]. При обнаружении вируса оспы обезьян (MPXV) методом LAMP [28] турбидиметрический анализ показал сравнимую чувствительность детекции в реальном времени с визуализацией результата реакции амплификации кальцеином. Для быстрого обнаружения вируса ZEBOV (*Orthoebolavirus zairense*) проводилось сравнение LAMP с разными способами детекции [33]: в реальном времени с интеркалирующим красителем SYBR Safe, в реальном времени с зондом и по конечной точке с изменением цвета, с использованием набора реагентов WarmStart LAMP (NEB, Великобритания). Детекция в реальном времени показала одинаковый предел обнаружения – 4×10^4 копий/мл, в то время как колориметрическая детекция позволила обнаружить минимум 10^4 копий/мл. Таким образом, колориметрическая детекция не уступает в чувствительности детекции в реальном времени, что открывает возможности для быстрого и доступного анализа результатов петлевой изотермической амплификации.

В силу высокой специфичности и простоты проведения метода LAMP рекомендуется использовать его для быстрого обнаружения вируса в полевых условиях. В таком случае вирусная нагрузка больного максимальна, и с детекцией по конечной точке красителем легко визуализиро-

вать результат. Добиться более высокой чувствительности позволяют другие дорогостоящие лабораторные методы и разные способы детекции, но LAMP превосходит их в экономическом плане, предоставляя возможность бесприборного анализа образцов. В статье М.К. Nwe et al. [34] еще отмечается повышенная устойчивость LAMP к ингибиторам в сравнении с ПЦР. Более того, уже успешно разработаны LAMP-наборы с лиофилизированными реакционными смесями [35–37], что облегчает их транспортировку и хранение.

На 2025 г. в литературе имеется информация о 12 диагностических тест-системах, основанных на методе LAMP, которые позволяют обнаруживать РНК особо опасных вирусов, относящихся к семействам *Filoviridae* и *Arenaviridae* (табл. 2). Большинство из них разработаны для выявления генетического материала вируса EBOV (9 публикаций), для MARV и LASV представлены данные об одном и двух лабораторных вариантов наборов соответственно. Для вирусов GTOV, MACHV и JUVN литературные данные о наборах реагентов для выявления РНК методом петлевой изотермической амплификации отсутствуют.

Диагностика EBOV

В работах, посвященных разработке наборов реагентов для выявления РНК EBOV методом LAMP, в качестве основных способов детекции выступают турбидиметрический метод и использование интеркалирующего красителя как в режиме реального времени, так и при детекции по конечной точке. В основном используют интеркалирующие красители SYBR Safe и SYBR Green I. Чувствительность реакции при измерении турбидиметром может достигать $3,2 \times 10^3$ копий/мл, а при использовании интеркалирующего красителя – $2,6 \times 10^3$ копий/мл [40, 44].

Способ колориметрической детекции РНК EBOV описан у L.C. Vonney et al. [33] и основан на добавлении в реакционную смесь, помимо стандартных компонентов LAMP, рН-чувствительного красителя. Накопление продуктов амплификации сопровождается высвобождением протонов, что приводит к изменению рН реакционной смеси, и краситель меняет окраску (например, с розового на желтый). Чувствительность такого способа детекции EBOV составляет порядка 10^4 копий/мл, что позволяет использовать его в первые дни появления симптомов заболевания, когда уровень вирусной нагрузки уже высок. Одним из колориметрических способов детекции накопления ампликонов, полученных на матрице кДНК EBOV, является использование комплекса кальцеин/ Mn^{2+} . В такой реакции происходит изменение цвета с оранжевого на зеленый, что можно уви-

деть невооруженным глазом или в ультрафиолете [39].

Наибольший интерес представляет публикация С. Xu et al [42], где после амплификации в изотермических условиях детекция продуктов проводится на специальных картриджах по принципу иммунохроматографического анализа. Чувствительность такой реакции составляет порядка 10^4 копий/мл. Такой способ детекции позволяет в короткие сроки поставить диагноз пациенту без использования дорогостоящего оборудования в регионах, эпидемичных по лихорадке Эбола.

Диагностика MARV

В единственной научной публикации, посвященной разработке набора реагентов для выявления РНК MARV [45], авторы предлагают использовать в качестве генной мишени ген нуклеопротеина, а в качестве способа детекции – измерение флуоресценции тест-пробирки в ультрафиолете после амплификации. Разработчики сконструировали два набора праймеров, специфичных для генетических линий Musoke и Ravn MARV. Множественный анализ методом LAMP позволил выявить штаммы обеих линий MARV, при этом отсутствовала перекрестная реактивность с другими вирусами, вызывающими лихорадку Эбола и Ласса. Чувствительность разработанного набора составила 10^5 копий/мл, а время постановки реакции не превышает 40 минут, что позволяет использовать данный вариант анализа в полевых условиях в эндемичных по лихорадке Марбург регионах.

Диагностика LASV

На данный момент существует семь генетических линий LASV, обнаруженных на различных территориях стран Западной Африки [48]. Из-за генетического разнообразия достаточно проблематично подобрать универсальные праймеры, специфичные для всех линий LASV. В литературе имеется информация о двух наборах реагентов, основанных на LAMP фрагментов генома LASV [46, 47]. Один из наборов способен специфически выявлять 1–4-ю линии вируса с турбидиметрической детекцией и чувствительностью 2×10^4 копий/мл [46], с помощью другого можно обнаружить несколько различных штаммов второй линии LASV с чувствительностью 10^6 – 10^3 копий/мл при использовании интеркалирующего красителя для детекции результата LAMP [47]. Оба анализа занимают около 30 минут, что является преимуществом перед ПЦР-анализом. При доработке данных тестов для выявления всех генетических линий они могут стать качественным инструментом экспресс-диагностики LASV и использовать-

Таблица 2. Наборы реагентов для выявления РНК вирусов, относящихся к семействам *Filoviridae* и *Arenaviridae*, методом LAMPTable 2. Reagent kits for detecting RNA viruses belonging to the families *Filoviridae* and *Arenaviridae* using loop-mediated isothermal amplification

Выявляемый вирус	Генная мишень	Чувствительность, копий/мл*	Время реакции, мин	Способ детекции результатов	Ссылка
ZEBOV	3'-нетранскрибируемая концевая область	2×10^4	60	Турбидиметрический	[38]
ZEBOV	Ген нуклеопротеина	$4,56 \times 10^3$	60	Турбидиметрический (комплекс кальцеин/ Mg^{2+} , хромогенный метод)	[39]
ZEBOV	3'-нетранскрибируемая концевая область	$3,4 \times 10^5$	60	Турбидиметрический	[40]
		$3,4 \times 10^4$		Интеркалирующий краситель	
		$3,2 \times 10^3$		Турбидиметрический	
EBOV	Ген нуклеопротеина	$3,2 \times 10^4$	30	Интеркалирующий краситель	[41]
		10^4		Интеркалирующий краситель	
		10^4		Визуальный	
ZEBOV	Ген нуклеопротеина	$2,56 \times 10^5$	30	Интеркалирующий краситель	[43]
		$6,4 \times 10^4$			
ZEBOV	Ген РНК-зависимой РНК-полимеразы	10^4	30	Интеркалирующий краситель SYBR Safe	[36]
EBOV	Ген нуклеопротеина	4×10^4	25	Интеркалирующий краситель SYBR Safe	[33]
		10^4	35	Колориметрический	
ZEBOV	Ген нуклеопротеина	$2,6 \times 10^3$	30	Интеркалирующий краситель SYBR Green I	[44]
MARV	Ген нуклеопротеина	10^5	40	Флуоресцентный краситель	[45]
LASV, линия I-IV	Ген нуклеопротеина	2×10^4	30	Турбидиметрический	[46]
LASV, линия II (штаммы ISTH0012-NIG-2011, ISTH2065-NIG-2012, 803213)	Ген гликопротеинового комплекса	10^6	30	Интеркалирующий краситель	[47]
LASV, линия II (штаммы Nig08-04, Nig08-037)		10^5			
LASV, линия II (штамм Nig16-02)		10^3			

* Все значения приведены к единым единицам измерения – копий/мл.

ся в медицинских учреждениях, в которых отсутствуют клинико-диагностические лаборатории с возможностью проведения ПЦР-анализа.

К сожалению, в настоящее время в мире официально не зарегистрирована и не производится ни одна из описанных выше тест-систем.

Заключение

Необходимость разработки и внедрения новых методов диагностики опасных вирусных инфекций I групп патогенности обусловлена многократно возросшей мобильностью населения. Своевременная и масштабная диагностика обеспечивает контроль эпидемиологической ситуации и помогает разрабатывать стратегию противоэпидемических мероприятий. Представляется перспективным создание диагностических тестов на основе метода LAMP, поскольку он позволяет проводить молекулярную диагностику существенно дешевле и быстрее, чем метод ПЦР. LAMP способен детектировать целевой генетический материал бесприборным способом и существенно упрощает анализ биологического материала в полевых условиях или «непосредственно у постели больного» («point-of-care testing»).

Список литературы/ References

1. Drosten C., Kümmerer B.M., Schmitz H., Günther S. Molecular diagnostics of viral hemorrhagic fevers. *Antiviral Res.* 2003;57(1-2):61–87. doi: 10.1016/S0166-3542(02)00201-2
2. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000;28(12):E63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63
3. Chander Y., Koelbl J., Puckett J., Moser M.J., Klingele A.J., Liles M.R., Carrias A., Mead D.A., Schoenfeld T.W. A novel thermostable polymerase for RNA and DNA loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Front. Microbiol.* 2014;5:395. doi: 10.3389/fmicb.2014.00395
4. Becherer L., Borst N., Bakheit M., Frischmann S., Zengerle R., von Stetten F. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) – review and classification of methods for sequence-specific detection. *Anal. Methods.* 2020;12(6):717–746. doi: 10.1039/C9AY02246E
5. Mori Y., Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases. *J. Infect. Chemother.* 2009;15(2):62–69. doi: 10.1007/s10156-009-0669-9
6. Макарова Ю.А., Зотиков А.А., Белякова Г.А., Алексеев Б.Я., Шкурников М.Ю. Изотермическая петлевая амплификация: эффективный метод экспресс-диагностики в онкологии. *Онкоурология.* 2018;14(2):88–99. doi: 10.17650/1726-9776-2018-14-2-88-99
7. Makarova Yu.A., Zotikov A.A., Belyakova G.A., Alekseev B.Ya., Shkurnikov M.Yu. Loop-mediated isothermal amplification: An effective method for express-diagnostics of cancer. *Onkourologiya = Cancer Urology.* 2018;14:88–99. [In Russian]. doi: 10.17650/1726-9776-2018-14-2-88-99
8. Soroka M., Wasowicz B., Rymaszewska A. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): the better sibling of PCR? *Cells.* 2021;10(8):1931. doi: 10.3390/cells10081931
9. Mori Y., Kitao M., Tomita N., Notomi T. Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 2004;59(2):145–157. doi: 10.1016/j.jbbm.2003.12.005
10. Shirato K. Detecting amplicons of loop-mediated isothermal amplification. *Microbiol. Immunol.* 2019;63(10):407–412. doi: 10.1111/1348-0421.12734
11. Park J.W. Principles and applications of loop-mediated isothermal amplification to point-of-care tests. *Biosensors (Basel).* 2022;12(10):857. doi: 10.3390/bios12100857
12. Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat. Protoc.* 2008;3(5):877–882. doi: 10.1038/nprot.2008.57
13. Anupama K.P., Nayak A., Karunasagar I., Maiti B. Rapid visual detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood samples by loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 2020;36(5):76. doi: 10.1007/s11274-020-02851-0
14. Zhou S., Huang Q., Yu M., Li Y., Zheng X., Xiu Y. Rapid visual detection of *Aeromonas salmonicida* by loop-mediated isothermal amplification with hydroxynaphthol blue dye. *J. Fish Dis.* 2021;44(12):1993–2001. doi: 10.1111/jfd.13513
15. Kim J.K., Kim H.R., Kim D.Y., Kim J.M., Kwon N.Y., Park J.H., Park J.Y., Kim S.H., Lee K.K., Lee C., ... Park C.K. A simple colorimetric detection of porcine epidemic diarrhea virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay using hydroxynaphthol blue metal indicator. *J. Virol. Methods.* 2021;298:114289. doi: 10.1016/j.jviromet.2021.114289
16. Zhang X., Zhao Y., Ma C., Wu W., Dong M., You J., Liu J., Yun S. An optimized visual loop mediated isothermal amplification assay for efficient detection of minute virus of mice with hydroxynaphthol blue dye. *J. Virol. Methods.* 2022;308:114575. doi: 10.1016/j.jviromet.2022.114575
17. Neshani A., Zare H., Sadeghian H., Safdari H., Riahi-Zanjani B., Aryan E. A comparative study on visual detection of mycobacterium tuberculosis by closed tube loop-mediated isothermal amplification: shedding

- light on the use of Eriochrome Black T. *Diagnostics*. 2023;13(1):155. doi: 10.3390/diagnostics13010155
17. Nguyen D.V., Nguyen V.H., Seo T.S. Quantification of colorimetric loop-mediated isothermal amplification process. *Biochip J.* 2019;13(2):158–164. doi: 10.1007/s13206-019-3206-7
18. Петруша О.А., Файзулов Е.Б. Методы детекции результатов реакции петлевой изотермической амплификации ДНК. *Клин. лаб. диагност.* 2020;65(1):67–72. doi: 10.18821/0869-2084-2020-65-1-67-72
- Petrusha O., Faizuloev E. Detection methods for results of a loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2020;65:67–72. [In Russian]. doi: 10.18821/0869-2084-2020-65-1-67-72.
19. Lai M.Y., Ooi C.H., Lau Y.L. Validation of SYBR green I based closed-tube loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for diagnosis of knowlesi malaria. *Malar. J.* 2021;20(1):166. doi: 10.1186/s12936-021-03707-0
20. Rahman A.M.A., Ransangan J., Subbiah V.K. Improvements to the rapid detection of the marine pathogenic bacterium, *Vibrio harveyi*, using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) in combination with SYBR Green. *Microorganisms*. 2022;10(12):2346. doi: 10.3390/microorganisms10122346
21. Kamra E., Singh N., Khan A., Singh J., Chauhan M., Kamal H., Mehta P.K. Diagnosis of genitourinary tuberculosis by loop-mediated isothermal amplification based on SYBR green i dye reaction. *Biotechniques*. 2022;73(1):47–57. doi: 10.2144/btn-2022-0027
22. Das D., Lin C.W., Chuang H.S. LAMP-based point-of-care biosensors for rapid pathogen detection. *Biosensors (Basel)*. 2022;12(12):1068. doi: 10.3390/bios12121068
23. Wong Y.P., Othman S., Lau Y.L., Radu S., Chee H.Y. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *J. Appl. Microbiol.* 2018;124(3):626–643. doi: 10.1111/jam.13647
24. Schneider L., Blakely H., Tripathi A. Mathematical model to reduce loop mediated isothermal amplification (LAMP) false-positive diagnosis. *Electrophoresis*. 2019;40(20):2706–2717. doi: 10.1002/elps.201900167
25. Ptitsyn K.G., Khmeleva S.A., Kurbatov L.K., Timoshenko O.S., Suprun E.V., Radko S.P., Lisitsa A.V. Lamp primer designing software: the overview. *Biomedical Chemistry: Research and Methods*. 2024;7(4):e00226. doi: 10.18097/BMCRM00226
26. Moehling T.J., Choi G., Dugan L.C., Salit M., Meagher R.J. LAMP diagnostics at the point-of-care: emerging trends and perspectives for the developer community. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2021;21(1):43–61. doi: 10.1080/14737159.2021.1873769
27. Moehling T.J., Browne E.R., Meagher R.J. Effects of single and multiple nucleotide mutations on loop-mediated isothermal amplification. *Analyst*. 2024;149(6):1701–1708. doi: 10.1039/D3AN01927F
28. Junxia F., Guanhua X., Xiaohu C., Bing D., Yanling F., Jinghua C., Hanqing Z., Lin G., Zheng F., Tongtong F., ... Jing Y. Development of a loop-mediated isothermal amplification method for rapid and visual detection of Monkeypox virus. *Microbiol. Spectr.* 2022;10(5):e0271422. doi: 10.1128/spectrum.02714-22
29. Reddy V., Ravi V., Desai A., Parida M., Powers A.M., Johnson B.W. Utility of IgM ELISA, TaqMan real-time PCR, reverse transcription PCR, and RT-LAMP assay for the diagnosis of Chikungunya fever. *J. Med. Virol.* 2012;84(11):1771–1778. doi: 10.1002/jmv.23406
30. Akter J., Smith W.J.M., Gebrewold M., Kim I., Simpson S.L., Bivins A., Ahmed W. Evaluation of colorimetric RT-LAMP for screening of SARS-CoV-2 in untreated wastewater. *Sci. Total Environ.* 2024;907:167964. doi: 10.1016/j.scitotenv.2023.167964
31. Ristaino J.B., Saville A.C., Paul R., Cooper D.C., Wei Q. Detection of *Phytophthora infestans* by loop-mediated isothermal amplification, real-time LAMP, and droplet digital PCR. *Plant Dis.* 2019;104(3):708–716. doi: 10.1094/PDIS-06-19-1186-RE
32. Fischbach J., Xander N.C., Frohme M., Glöckler J.F. Shining a light on LAMP assays – a comparison of LAMP visualization methods including the novel use of Berberine. *Biotechniques*. 2015;58(4):189–194. doi: 10.2144/000114275
33. Bonney L.C., Watson R.J., Slack G.S., Bosworth A., Wand N.I.V., Hewson R. A flexible format LAMP assay for rapid detection of Ebola virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020;14(7):e0008496. doi: 10.1371/journal.pntd.0008496
34. Nwe M.K., Jangpromma N., Taemaitree L. Evaluation of molecular inhibitors of loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Sci. Rep.* 2024;14(1):5916. doi: 10.1038/s41598-024-55241-z
35. Kumar S., Sharma S., Bhardwaj N., Pande V., Savargaonkar D., Anvikar A.R. Advanced lyophilised loop mediated isothermal amplification (L-LAMP) based point of care technique for the detection of dengue virus. *J. Virol. Methods*. 2021;293:114–168. doi: 10.1016/j.jviromet.2021.114168
36. Carter C., Akrami K., Hall D., Smith D., Aronoff-Spencer E. Lyophilized visually readable loop-mediated isothermal reverse transcriptase nucleic acid amplification test for detection Ebola Zaire RNA. *J. Virol. Methods*. 2017;244:32–38. doi: 10.1016/j.jviromet.2017.02.013
37. Jothinarayanan N., Karlsen F., Roseng L.E. Characterization and validation of a lyophilized loop-mediated isothermal amplification method for the detection of *Esox lucius*. *Appl. Biochem. Biotechnol.*

2024;196(8):5249–5264. doi: 10.1007/s12010-023-04799-x

38. Kurosaki Y., Takada A., Ebihara H., Grolla A., Kamo N., Feldmann H., Kawaoka Y., Yasuda J. Rapid and simple detection of Ebola virus by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *J. Virol. Methods.* 2007;141(1):78–83. doi: 10.1016/j.jviromet.2006.11.031

39. Li H., Wang X., Liu W., Wei X., Lin W., Li E., Li P., Dong D., Cui L., Hu X., ... Yuan J. Survey and visual detection of Zaire ebolavirus in clinical samples targeting the nucleoprotein gene in Sierra Leone. *Front. Microbiol.* 2015;6:1332. doi: 10.3389/fmicb.2015.01332

40. Kurosaki Y., Magassouba N., Oloniniyi O.K., Cherif M.S., Sakabe S., Takada A., Hirayama K., Yasuda J. Development and evaluation of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay coupled with a portable device for rapid diagnosis of Ebola virus disease in Guinea. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016;10(2):e0004472. doi: 10.1371/journal.pntd.0004472

41. Benzine J., Brown K., Agans K., Godiska R., Mire C., Gowda K., Converse B., Geisbert T., Mead D., Chander Y. Molecular diagnostic field test for point-of-care detection of Ebola virus directly from blood. *J. Infect. Dis.* 2016;214(suppl 3):S234–S242. doi: 10.1093/infdis/jiw330

42. Xu C., Wang H., Jin H., Feng N., Zheng X., Cao Z., Li L., Wang J., Yan F., Wang L., ... Xia X. Visual detection of Ebola virus using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with nucleic acid strip detection. *Arch. Virol.* 2016;161(5):1125–1133. doi: 10.1007/s00705-016-2763-5

43. Oloniniyi O., Kurosaki Y., Miyamoto H., Takada A., Yasuda J. Rapid detection of all known ebolavirus species by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *J. Virol. Methods.* 2017;246:8–14. doi: 10.1016/j.jviromet.2017.03.011

44. Kumar J.S., Dash P.K., Srivastava A., Sharma S., Tandel K., Parida M. One-step single-tube accelerated quantitative nucleoprotein gene-specific reverse transcription loop-mediated isothermal gene amplification (RT-LAMP) assay for rapid, real-time & reliable clinical detection of Ebola virus. *Indian J. Med. Res.* 2021;154(4):598–606. doi: 10.4103/ijmr.IJMR_864_19

45. Kurosaki Y., Grolla A., Fukuma A., Feldmann H., Yasuda J. Development and evaluation of a simple assay for marburg virus detection using a reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification method. *J. Clin. Microbiol.* 2010;48(7):2330–2336. doi: 10.1128/JCM.01224-09

46. Fukuma A., Kurosaki Y., Morikawa Y., Grolla A., Feldmann H., Yasuda J. Rapid detection of Lassa virus by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *Microbiol. Immunol.* 2011;55(1):44–50. doi: 10.1111/j.1348-0421.2010.00286.x

47. Pemba C.M., Kurosaki Y., Yoshikawa R., Oloniniyi O.K., Urata S., Sueyoshi M., Zadeh V.R., Nwafor I., Iroezindu M.O., Ajayi N.A., ... Yasuda J. Development of an RT-LAMP assay for the detection of Lassa viruses in southeast and south-central Nigeria. *J. Virol. Methods.* 2019;269:30–37. doi: 10.1016/j.jviromet.2019.04.010

48. Garry R.F. Lassa fever — the road ahead. *Nat. Rev. Microbiol.* 2023;21(2):87–96. doi: 10.1038/s41579-022-00789-8

Сведения об авторах:

Кривошеина Екатерина Ильинична, ORCID: 0000-0001-5181-0415, e-mail: katr962@mail.ru
Беличенко Ксения Руслановна, ORCID: 0009-0003-2330-025X, e-mail: ksenbelichen@gmail.com
Карташов Михаил Юрьевич, к.б.н., ORCID: 0000-0002-7857-6822, e-mail: mikkartash@yandex.ru
Чуб Елена Владимировна, к.б.н., ORCID: 0000-0003-1521-897X, e-mail: chub_ev@vector.nsc.ru

Information about authors:

Ekaterina I. Krivosheina, ORCID: 0000-0001-5181-0415, e-mail: katr962@mail.ru
Ksenia R. Belichenko, ORCID: 0009-0003-2330-025X, e-mail: ksenbelichen@gmail.com
Mikhail Yu. Kartashov, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0002-7857-6822, e-mail: mikkartash@yandex.ru
Elena V. Chub, candidate of biological sciences, ORCID: 0000-0003-1521-897X, e-mail: chub_ev@vector.nsc.

Поступила в редакцию 09.03.2025

После доработки 28.04.2025

Принята к публикации 15.07.2025

Received 09.03.2025

Revision received 28.04.2025

Accepted 15.07.2025