УДК 619:616.98:579.852.11
DOI: 10.31073/vet_biotech43-13

МОЛОЖАНОВА А.В.*, e-mail: veterenery@ukr.net,
НИЧИК С.А., д-р вет. наук, проф., чл.-кор. НААН, e-mail: snychyk@gmail.com,
ГУДЗЬ Н.В., канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: gudznataly@gmail.com,
ТАРАСОВ О.А., канд. вет. наук, ст. наук. сп., e-mail: ast97@ukr.net
Інститут ветеринарної медицини НААН

ЗАСТОСУВАННЯ ІЗОТЕРМІЧНОЇ ПЕТЛЕВОЇ АМПЛІФІКАЦІЇ (LAMP) ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ВИЯВЛЕННЯ ВІРУСУ SARS-COV-2

У статті наведені результати застосування ізотермічної петлевої ампліфікації (LAMP, loop-mediated amplification) для швидкого і ефективного діагностування вірусу SARS-CoV-2 з урахуванням останніх даних літератури методом RT-LAMP в реальному часі та RT-LAMP з колориметричною оцінкою результату реакції за кінцевою точкою (зміна кольору реакційної суміші). Загальна специфічність RT-LAMP тесту для гену N склала 99,4%, а чутливість для зразків з КТ < 30 на RT-qPCR була 98,5%. Для гену S загальна специфічність склала 92,8%, чутливість для зразків з КТ < 30–96,8%. Загальна специфічність RT-LAMP з колориметричною оцінкою результатів тесту для гену N склала 85,7%, чутливість – 98,5%. Загальна специфічність RT-LAMP з колориметричною оцінкою результатів тесту для гену S склала 75% за чутливості – 98,5%.

Ключові слова: *COVID-19, SARS-CoV-2, ЗТ-ПЛР у реальному часі, LAMP, діагностика.*

Вступ. Коронавіруси – представники РНК-вмісних вірусів, що належать до підродини *Coronvirinae,* родини *Coronaviridae* з порядку *Nidovirales.* Більшість коронавірусів людини є бета-коронавірусами [1].

Вірус SARS-CoV-2 являє собою одноланцюговий оболонковий РНК-вірус, що відноситься до підроду *Sarbecovirus* роду *Betacoronavirus* [2, 3].

Під час епідемій, обумовлених SARS-CoV та MERS-CoV, був отриманий великий досвід з їх детектування, що є важливим для розробки засобів діагностики вірусу SARS-CoV-2 [4–6].

Пандемічний спалах коронавірусу був спричинений новим вірусом SARS-CoV-2, який вперше діагностували у людей в грудні 2019 р. у Китаї (провінція Ухань). Вже 30 січня 2020 року ВООЗ оголосила спалах захворювання, викликаного коронавірусом SARS-CoV-2, надзвичайною ситуацією в галузі громадського здоров’я [1, 4].

* Аспірант, науковий керівник д-р вет. наук, професор, чл.-кор НААН **Ничик С.А.**

В Україні COVID-19 (пневмонія нового типу) вперше був діагностований у березні 2020 року в Чернівцях, а вже 13 березня був зафіксований перший летальний випадок, спричинений вірусом SARS-CoV-2. На початок грудня 2021 року в Україні нараховувалось 3 497 477 підтверджених випадків, з них летальних – 88 280 [7].

Пандемічний характер розповсюдження коронавірусу викликає питання: чи не може еволюція вірусу бути обумовлена мутаціями в його геномі [7] або наявністю ознак рекомбінантного вірусу штучного чи природного походження [8].

Нові варіанти вірусу, такі як Delta та Epsilon, демонструють значно вищу заразність, пов’язану з мутаціями в домені зв’язування рецептора білка шипа оболонки [9]. Це вимагає тестування якомога більшої кількості людей для своєчасного виявлення нових типів збудника та виявлення безсимптомних носіїв, які можуть несвідомо інфікувати велику популяцію.

Сьогодні ВООЗ визначено перелік переважаючих варіантів вірусу, що базується на найпоширеніших мутаціях: B.1.1.7 (варіант альфа), B.1.351 (варіант бета), P.1 (варіант гамма), B.1.617.2 (варіант дельта), B.1.427/B.1.429 (варіант епсилон), P.2 (варіант зета), B.1.525 (варіант ета), P.3 (варіант тета), B.1.526 (варіант йота), B.1.617.1 (варіант каппа) [4]. Умовні номери даються згідно з класифікацією міжнародної бази даних послідовностей вірусу SARS-CoV-2 GISAID’s EpiCoV database (https://gisaid.org/WIV04). Перелік постійно оновлюється.

Активний моніторинг допоможе точно встановити циркуляцію вірусу в популяції та сприятиме здійсненню оцінки ризиків та впровадженню заходів на локальному та глобальному рівнях [10].

Важливим заходом у системі попередження поширення збудника є своєчасна діагностика. Детектування специфічних фрагментів вірусного геному, окрім класичної полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) та секвенування, проводиться також з використанням LAMP-технології, яка вбачається альтернативою ПЛР зі зворотною транскрипцією, і заснована на унікальній особливості ДНК-полімерази з бактерії *Bacillus stearothermophillus (Geobacillus)*, у якої, крім власне ДНК-полімеразної, є також висока ревертазна активність [11–14]. Ця обставина значно спрощує процедуру проведення «перепису» інформації з РНК на ДНК з її подальшою одноетапною ампліфікацією, що можлива за постійної температури в діапазоні від 55°C до 65°C. Для реакції ампліфікації, що опосередкована через петлю, потрібна ДНК-полімераза, яка має властивості заміщати ланцюг у процесі синтезу (Bst – полімераза), суміш дезоксинуклетид трифосфатів, внутрішні праймери та зовнішні праймери, що впізнають шість різних ділянок на мішені, а також відповідний буферний розчин [15].

Метод LAMP вже досить активно використовується для діагностики SARS-CoV-2 [16, 17].

Важливою проблемою застосування молекулярних засобів діагностики на фоні високої мутаційної мінливості вірусу, що відбувається в рамках постійних змін переважних варіантів є специфічність та чутливість наявних тест-наборів та рекомендованих праймерів.

Через обмеженість опублікованих даних, оскільки пандемія фактично почалась 2020 року, підтвердження ефективності наявних методів у відношенні до різних варіантів вірусу є важливим для успішного попередження поширення захворювання.

Мета роботи. Порівняти застосування ізотермічної петлевої ампліфікації (RT-LAMP) у варіантах в реальному часі та за кінцевою точкою із зворотньо транскриптазною ПЛР в реальному часі (RT-qPCR) для швидкого і ефективного виявлення вірусу SARS-CoV-2.

Матеріали і методи досліджень. Виділення РНК із зразків біологічного матеріалу проведено із використанням набору «IndiSpin Pathogen kit» (Indical Bioscience) згідно з інструкцією виробника.

Детектування специфічних фрагментів геному вірусу SARS-CoV-2 проведено з використанням RT-qPCR за допомогою комерційної тест-системи Allplex SARS-CoV-2 Assay (Seegene, Південна Корея), Ref RV10248X, LOT RV9120H23, згідно з рекомендаціями виробника, на ампліфікаторі планшетного типу BioRad 1000 з модулем SFX96 із застосуванням вбудованого програмного забезпечення.

Оцінку результатів RT-qPCR тесту проводили із застосуванням програми SARS-CoV-2 Viewer V1 (Seegene).

Детектування специфічних фрагментів вірусної РНК також було проведено за допомогою LAMP-технології (LAMP із зворотною транскрипцією, RT-LAMP), яка вбачається альтернативою до ПЛР зі зворотною транскрипцією.

Для проведення досліджень використовували набори праймерів для проведення RT-LAMP, розраховані на ділянки генів: нуклеокапсидний ген N-ген та оболонковий ген S-ген SARS-CoV-2. Послідовності представлено в таблиці 1. Також був застосований набір праймерів як ендогенний контроль RNase P POP7.

Оптимальні умови проведення ампліфікації були підібрані експериментально, що описано в результатах досліджень.

Перелік використаних праймерів представлено в таблиці 1.

Таблиця 1

Перелік праймерів для виявлення специфічних ділянок геному збудника методом LAMP (Huang et al., 2020) [17]

Мішень	Назва праймера	Послідовність нуклеотидів, 5'-3'
N-ген SARS-CoV-2 (нуклеокапсид)	F3	AGATCACATTGGCACCCG
	B3	CCATTGCCAGCCATTCTAGC
	FIP	TGCTCCCTTCTGCGTAGAAGCCAATGCTGCAATCGTGCTAC
	BIP	GGCGGCAGTCAAGCCTCTTCCCTACTGCTGCCTGGAGTT
	LF	GCAATGTTGTTCCTTGAGGAAGTT
	LB	GTTCCTCATCACGTAGTCGCAACAN
S-ген SARS-CoV-2 (оболонка)	F3	TCTTTCACACGTGGTGTT
	B3	GTACCAAAAATCCAGCCTC
	FIP	CATGGAACCAAGTAACATTG-GAAAACCTGACAAAGTTTTCAGATCC
	BIP	CTCTGGGACCAATGGTACTAAGAGGACTTCTCAGTGGAAGCA
	LF	GAAAGGTAAGAACAAGTCCTGAGT
	LB	CTGTCCTACCATTTAATGATGGTGT
RNase P POP7 (ендогенний внутрішній контроль)	RNaseP-POP7-F3	TTG ATG AGC TGG AGCCA
	RNaseP-POP7-B3	CACCCTCAATGCAGAGTC
	RNaseP-POP7-FIP	GTGTGACCCTGAAGACTCGGTTTTAGCCACTGACTC GGATC
	RNaseP-POP7-BIP	CCTCCGTGATATGGCTCTTCGTTTTTTTCTTACATGGCT CTGGTC
	RNaseP-POP7-LF	ATGTGGATGGCTGAGTTGTT
	RNaseP-POP7-LB	CATGCTGAGTACTGGACCTC

Для проведення тестів був використаний оптимізований авторами на основі літературних даних та власних досліджень склад реакційної суміші, наведений у таблиці 2.

Оптимальні умови проведення RT-LAMP ампліфікації з колориметричною оцінкою результатів за кінцевою точкою були підібрані експериментально із урахуванням того, що суміш повинна бути мінімально необхідною за складом для проведення реакції, оскільки необхідно було забезпечити, щоб зміна pH розчину, а власне і забарвлення після проходження реакції, змінювалась лише під впливом продуктів специфічної ампліфікації, які накопичуються в реакційній суміші.

Таблиця 2

Склад суміші для проведення реакції LAMP (на 25 мкл загального об'єму)

Реагент	Об'єм	Фінальна концентрація в суміші
10X буфер для ізотермальної ампліфікації	2,5 µL	
100 mM MgSO 4 (NEB)	1,13 µL	6.5 mM (4.5 mM та 2 mM в 1X буфері)
10 mM суміш dNTPs	3,5 µL	1.4 mM
10X суміш праймерів	2,5 µL	0.2 µM F3 0.2 µM B3 1.6 µM FIP 1.6 µM BIP 0.8 µM LF 0.8 µM LB
Bst LF ДНК полімераза	1,0 µL	8 одиниць / реакція
Термостабільна зворотня транскриптаза	0,5 µL	7.5 одиниць /реакція
Nuclease-free water	7,87 µL	-
Інтеркалюючий барвник SYTO16	1,0 µL	-
РНК зразка	5 µL	-
Загальний об'єм	25 µL	

Оптимальний склад реакційної суміші для проведення реакції RT-LAMP з колориметричною оцінкою результатів за кінцевою точкою представлено в таблиці 3.

Таблиця 3

Склад реакційної суміші для проведення реакції RT-LAMP з колориметричним детектуванням результату реакції (на 25 мкл загального об'єму)

Реагент	Об'єм	Фінальна концентрація в суміші
10X буфер для ізотермальної ампліфікації	2,5 µL	3M $(NH_4)_2SO_4$-10,0 µM, 100 µM $MgSO_4$-8,0 µM, 2M KCl-10,0 µM, Твін 20-0,1% від об'єму
25X розчин барвника (феноловий червоний) pH 8.6	1,0 µL	0,1 µM
10 mM суміш dNTPs	3,5 µL	1,4 µM
25X суміш праймерів	2,0 µL	0,2 µM F3 0,2 µM B3 1,6 µM FIP 1,6 µM BIP 0,8 µM LF 0,8 µM LB
Bst LF ДНК полімераза	1,0 µL	8 одиниць / реакція
Термостабільна зворотня транскриптаза	0,5 µL	7,5 одиниць /реакція
Nuclease-free water	9,5 µL	-
РНК зразка	5,0 µL	-
Загальний об'єм	25,0 µL	

Умови RT-LAMP для детектування специфічного фрагменту геному вірусу SARS-CoV-2 складалися із 60 циклів за температури 64ºС із тривалістю кожного циклу 30 с (всього 30 хвилин).

Результат ампліфікації РНК вірусу SARS-CoV-2 реєстрували на каналі флуоресценції FAM/SYBR. Облік результатів ПЛР аналізу проводиться за наявності або відсутності перетину кривої флуоресценції зі встановленою на відповідному рівні пороговою лінією, що відповідає наявності або відсутності значення порогового циклу Ct. Результати аналізу вважали достовірними, якщо значення Ct по каналах FAM/SYBR позитивних контрольних зразків менше або дорівнює 35 (Ct≤35).

RT-LAMP була проведена із використанням інтеркалюючого барвника SYTO 16 (Life technologies, США) як маркеру для моніторингу реакції в реальному часі. Реєстрацію продуктів реакції у кінцевій точці проводили візуально за зміною кольору після закінчення реакції (30–45 хв). За отримання позитивного результату колір реакційної суміші змінюється на помаранчево-жовтий. Негативні зразки так само, як і негативний контроль, не змінюють забарвлення після закінчення реакції і зберігають червоно-фіолетовий колір.

Для проведення досліджень було використано зразки виділеної РНК вірусу SARS-CoV-2, надані Центром громадського здоров’я МОЗ України (20 зразків від людей, відібраних за період з початку жовтня до середини листопаду 2021 року). Серед зразків були представники груп вірусу B.1.351 (варіант бета), P.1 (варіант гамма), B.1.617.2 (варіант дельта), підтверджених повногеномним секвенуванням.

Всі дані були проаналізовані за допомогою програмного пакету R (www.R-project.org), включаючи модулі *tidyverse* і *ggplot2*.

Розрахована специфічність аналізу RT-LAMP та його чутливість для цього інтервалу CT була відображена як частка всіх зразків із значенням RT-qPCR CT у тому інтервалі, який був позитивним у аналізі RT-LAMP.

Довірчий інтервал (95%) був розрахований шляхом інтерпретації отриманих значень як біноміальних показників за допомогою критерія Вільсона для біноміальних довірчих інтервалів, який реалізовано в пакеті R – модуль *binom*.

Результати досліджень та їх обговорення. У результаті досліджень встановлено, що набір Allplex SARS-CoV-2 Assay (Seegene, Південна Корея) дозволив ідентифікувати RT-qPCR тестом всі досліджені зразки з концентрацією цільового генома 10 копій в реакції та більше за двома генами (S та N). RT-LAMP та варіант із колориметричною оцінкою результатів за кінцевою точкою показали значно нижчу чутливість та специфічність. Для

успішного виявлення збудника за геном S для RT-LAMP необхідно мати не менше 300 копій геному в реакції, а для RT-LAMP із візуальною колориметричною оцінкою результатів за кінцевою точкою – не менше 2500 копій геному в реакції. Для виявлення збудника за геном N для RT-LAMP необхідно мати не менше 600 копій геному в реакції, а для RT-LAMP із візуальною колориметричною оцінкою результатів за кінцевою точкою – не менше 1250 копій геному в реакції. (табл. 4, 5, рис. 1).

Таблиця 4

Визначення чутливості та специфічності LAMP щодо детектування S гену SARS-CoV-2

Зразок	РТ-ПЛР		Кількість копій геному у пробі	Результат тесту RT-LAMP	Результат тесту RT LAMP з візуальною оцінкою результату реакції	Результат тесту RT-qPCR
	S-ген	C(t)в RT-qPCR				
ПК	+	27,23	2500	+	+	Позитивний контроль(+)
НК	–	N/A	–	–	–	Негативний контроль(-)
66288	+	36,28	5	–	–	+
66302	+	38,47	2	–	–	+
66264	–	N/A	–	–	–	–
66254	+	30,42	312	+	–	+
66272	+	26,36	5000	+	+	+
65175	+	33,23	40	–	–	+
65177	+	33,90	42	+	–	+
65276	+	26,34	5000	+	+	+
65273	+	30,92	156	+	–	+
65183	+	33,43	40	–	–	+
65060	+	37,53	5	–	–	+
65148	+	28,67	1250	+	–	+
65143	+	31,25	156	–	–	+
65173	+	29,08	625	+	–	+
65215	+	29,58	625	+	–	+
65271	+	26,89	5000	+	+	+
66271	+	34,16	20	–	–	+
66280	+	23,95	20000	+	+	+
66281	+	26,78	5000	+	+	+
66278	+	24,87	20000	+	+	+
654	–	–	–	–	–	–
656	–	–	–	–	–	–
657	–	–	–	–	+	–
658	–	–	–	–	+	–
659	–	–	–	–	–	–
700	–	–	–	–	–	–

Таблиця 5

Визначення чутливості та специфічності LAMP щодо детектування N гену SARS-CoV-2

Зразок	РТ-ПЛР		Кількість копій геному у пробі	Результат тесту РТ-LAMP	Результат тесту LAMP з візуальною оцінкою результату реакції	Результат тесту RT-qPCR
	N-gene	C(t) в РТ ПЛР				
ПК	+	24,01	5000	+	+	Позитивний контроль(+)
НК	–	N/A	–	–	–	Негативний контроль(-)
66288	+	26,36	1250	+	+	+
66302	+	23,48	5000	+	+	+
66264	+	29,25	156	–	–	+
66254	+	21,65	20000	+	+	+
66272	+	23,70	5000	+	+	+
65175	+	30,08	78	–	–	+
65177	+	29,15	156	–	–	+
65276	+	21,14	40000	+	+	+
65273	+	24м87	5000	+	+	+
65183	+	26,99	625	+	–	+
65060	+	30,09	78	–	–	+
65148	+	26,18	1250	+	–	+
65143	+	29,49	78	–	–	+
65173	+	27,99	312	–	–	+
65215	+	22,77	20000	+	+	+
65271	+	17,88	640000	+	+	+
66271	+	20,14	80000	+	+	+
66280	+	20,55	80000	+	+	+
66281	+	23,71	5000	+	+	+
66278	+	22,38	10000	+	+	+
654	–	–	–	–	–	–
656	–	–	–	–	+	–
657	–	–	–	–	–	–
658	–	–	–	–	–	–
659	–	–	–	–	–	–
700	–	–	–	–	–	–

За результатами досліджень нами встановлено, що кількість N гену в пробах дещо вища за кількість S гену, тому набір праймерів, розрахований на виявлення специфічних фрагментів N гену має вищу специфічність та чутливість у порівнянні із набором праймерів, спрямованих на детекцію специфічних ділянок S гену вірусу SARS-CoV-2. Але для надійного

діагностування необхідно застосовувати праймери хоча б на два гени для виключення хибнонегативних результатів через мутаційні зміні (рис. 2).

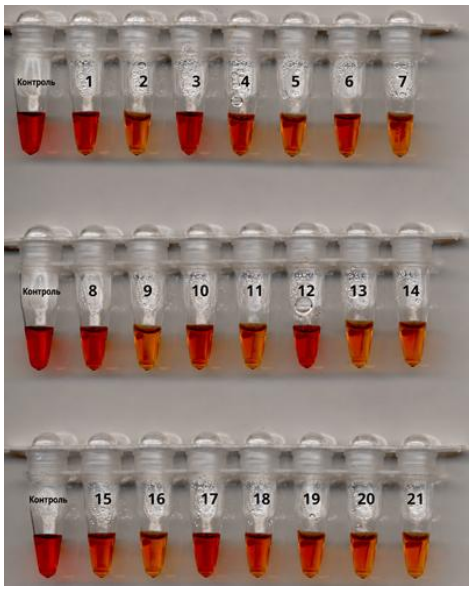


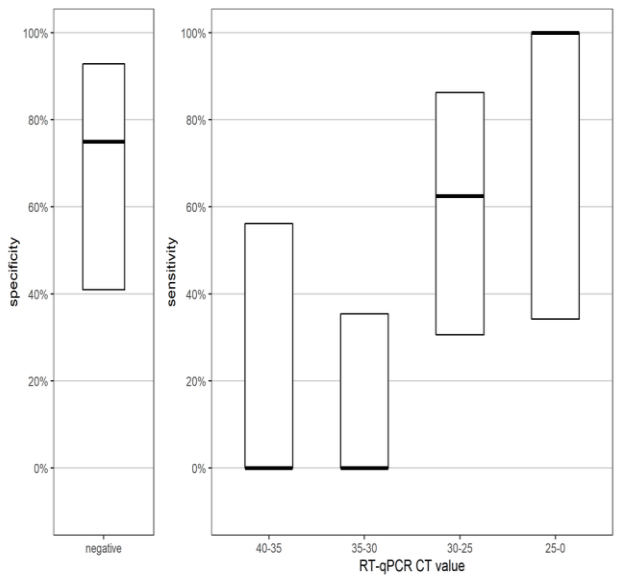
Рис. 1. Результати візуальної оцінки реакції RT-LAMP при детекції РНК SARS-CoV-2. У кожному ряду перша пробірка є контрольною (позитивний контроль, негативний контроль та негативний клінічний зразок №21 відповідно). Пробірки №1–21 відповідають клінічним зразкам, наведеним у таблиці. Позитивні реакції характеризуються збереженням рожево-червоного кольору індикатора, негативні – переходом забарвлення у жовто-оранжевий. Зразки з концентрацією вірусної РНК 625–640000 копій у пробі визначалися як позитивні при візуальній оцінці RT-LAMP, тоді як зразки з концентрацією 78–312 копій були негативними, незважаючи на позитивний результат RT-qPCR.

RT-LAMP може бути застосований для детекції вірусу у зразках із значною кількістю геномів збудника – від 600 та більше. При цьому метод відповідає чутливості та специфічності тесту RT-qPCR.

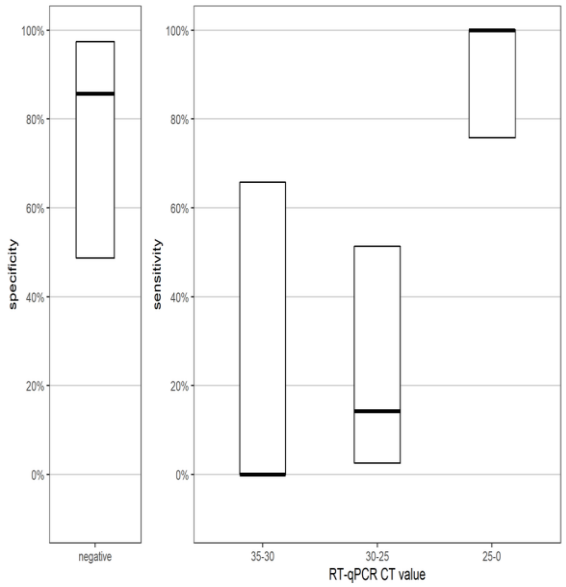
Пряме порівняння чутливості для набору праймерів гену S та гену N для всіх зразків виявило різницю приблизно до 300 копій геному. Це дозволило припустити, що праймери гена N були більш чутливими, ніж праймери гену S для виявлення РНК SARS-CoV-2 за допомогою цього тесту.

Візуалізація результатів аналізу RT-LAMP через 30 хв після початку інкубації за 64°C показали очікувані результати, що вказує на те, що RT-LAMP аналіз мав достатню відтворюваність. Узгодженість результатів під час аналізу підтвердила поріг $\Delta OD > +0{,}3$ як надійний показник для ідентифікації зразків, які містили РНК вірусу SARS-CoV-2.

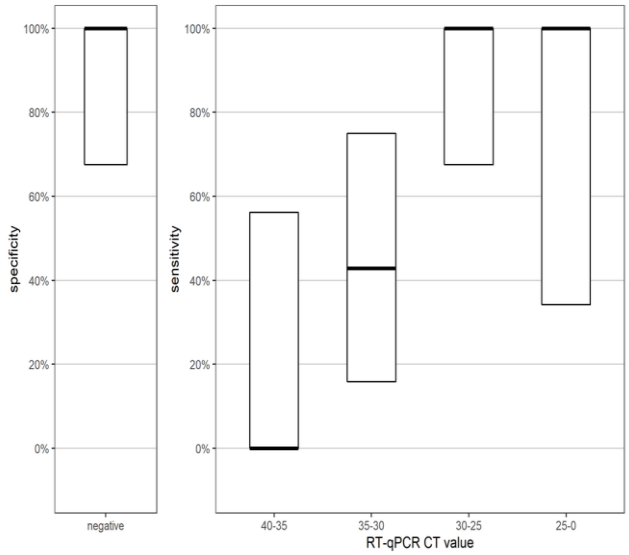
Також нами встановлено, що RT-qPCR – позитивні зразки зі значеннями Ct від 30 до 40 показали негативний результат в RT-LAMP (100 копій геному та менше).



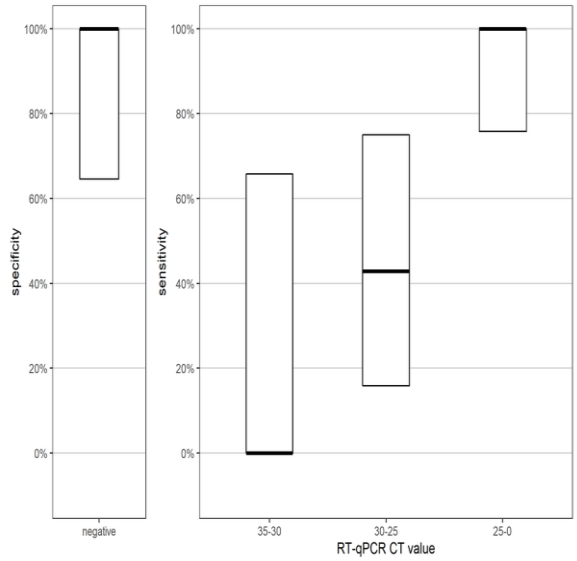
А) RT-LAMP візуальна оцінка S-ген



Б) RT-LAMP візуальна оцінка N-ген



В) RT-LAMP в реальному часі S-ген



Д) RT-LAMP в реальному часі N-ген

Рис. 2. Чутливість та специфічність методів RT-LAMP в реальному часі та RT-LAMP з візуальною оцінкою результату за кінцевою точкою (95% довірчий інтервал Вілсона для 25 зразків)

Загальна специфічність RT-LAMP тесту для гену N склала 99,4% (95% довірчий інтервал Вільсона: від 64,8 до 99,9%), а також чутливість для зразків з концентрацією більше 150 копій геному в реакції було 98,5% (95% довірчий інтервал Вільсона: від 78,8 до 99,7%). Для гену S загальна специфічність склала 92,8% (95% довірчий інтервал Вільсона: від 65,7 до 99,9%), а також чутливість для зразків більше 150 копій геному в реакції була 96,8% (95% довірчий інтервал Вільсона: від 38,9 до 99,9%).

Загальна специфічність RT-LAMP за колориметричною оцінкою результатів тесту для гену N склала 85,7% (95% довірчий інтервал Вілсона: від 48,7 до 97,9%), а також чутливість для зразків більше 150 копій геному в RT-qPCR складала 98,5% (95% довірчий інтервал Вільсона: від 75,6 до 99,9%). Загальна специфічність RT-LAMP з колориметричною оцінкою результатів тесту для гену S склала 75% (95% довірчий інтервал Вілсона: 40,9 до 92,8%), а також чутливість для зразків більше 150 копій геному була 98,5% (95% довірчий інтервал Вільсона: від 34,2 до 99,3%).

За кількості геномів в реакції 5000 та більше, метод відповідає чутливості та специфічності тесту RT-qPCR (довірчий інтервал Вільсона: 97,9–99,9%). Мінімальна концентрація геномів у пробі, що дозволяє надійно детектувати обидва таргетні гени, складає 600 копій геному.

Незважаючи на те, що ряд авторів підкреслює виключно високу специфічність та чутливість RT-LAMP, нам вдалося отримати результати, які збігаються із такими, що отримані методом RT-qPCR лише за умов значного вмісту копій вірусу в реакції (пробі) – не менше 5000. Для зразків, що містять 500 копій геному та менше, чутливість та специфічність RT-LAMP значно зменшується.

Для проб з низькою кількістю цільових геномів, що є характерним для Ct 35–45 (менше 10 копій геному), застосовувати RT-LAMP недоцільно через низьку специфічність та високий ризик отримання хибнопозитивних та хибнонегативних результатів.

Висновки та перспективи подальших досліджень:

1. Метод RT-LAMP може бути застосований для детекції вірусу SARS-CoV-2 у зразках із значною кількістю геномів збудника – від 600 та більше. За кількості геномів 5000 та більше, метод RT-LAMP з візуальною колориметричною оцінкою за кінцевою точкою відповідає чутливості та специфічності тесту RT-qPCR (довірчий інтервал Вільсона: 97,9–99,9%).

2. Візуалізація результатів аналізу RT-LAMP показали очікувані результати, що вказує на те, що RT-LAMP аналіз мав достатню відтворюваність. Узгодженість результатів під час аналізу підтвердила поріг $\Delta OD > +0,3$ як надійний показник для ідентифікації зразків, які містили РНК вірусу SARS-CoV-2.

3. Загальна специфічність RT-LAMP тесту для гену N склала 99,4%, а чутливість RT-qPCR була 98,5%. Для гену S загальна специфічність склала 92,8%, чутливість – 96,8%. Загальна специфічність RT-LAMP з колориметричною оцінкою результатів тесту для гену N склала 85,7%, чутливість – 98,5%. Загальна специфічність RT-LAMP з колориметричною оцінкою результатів тесту для гену S склала 75% за чутливості – 98,5%.

У подальших роботах планується дослідження чутливості та специфічності набору праймерів для детекції нових мутантних штамів вірусу SARS-CoV-2.

Дослідження виконані в рамках виконання проекту «Вивчення можливої ролі тварин як резервуару вірусу SARS-CoV-2» за фінансування Національним фондом досліджень України.

APPLICATION OF THE LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION (LAMP) FOR THE SARS-COV-2 VIRUS DIAGNOSTICS DETECTION / Molozhanova A., Nychyk S., Hudz N., Tarasov O.

Introduction. *The SARS-CoV-2 virus is a single-stranded enveloped RNA virus belonging to the Sarbeccovirus subgenus of the Betacoronavirus genus.*

Timely diagnosis is an important measure in the system of preventing the spread of the pathogen. In addition to the classical polymerase chain reaction (PCR) and sequencing, detection of specific fragments of the viral genome is also carried out using LAMP technology, which is considered an alternative to reverse transcription PCR and is based on the unique feature of DNA polymerase from the bacterium Bacillus stearothermophillus (Geobacillus), which, in addition to DNA polymerase, also has high reverse transcription activity. This circumstance greatly simplifies the procedure of "rewriting" information from RNA to DNA with its subsequent one-step amplification, which is possible at a constant temperature in the range from 55°C to 65°C.

Thus, the application of new approaches to the diagnosis of viral and bacterial diseases is important for the rapid detection of the pathogen and the timely application of preventive measures aimed at preventing its spread among the susceptible population.

The goal of the work. *To investigate the possibility of using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for the rapid and effective diagnosis of SARS-CoV-2 virus.*

Materials and methods. *RNA was isolated from biological samples using the IndiSpin Pathogen kit (Indical Bioscience) according to the manufacturer's instructions.*

Detection of specific fragments of the SARS-CoV-2 virus genome was performed by RT-qPCR using a commercial test system Allplex SARS-CoV-2 Assay (Seegene, South Korea), Ref RV10248X, LOT RV9120H23 according to the manufacturer's guidelines on a BioRad 1000 plate-type amplifier with SFX96 module using the built-in software.

The RT-qPCR test results were evaluated using the SARS-CoV-2 Viewer V1 program (Seegene).

The detection of specific viral RNA fragments was also performed using LAMP technology (RT-LAMP), which is considered an alternative to reverse transcription PCR.

For the study, primer sets for RT-LAMP were used for the following gene regions: nucleocapsid gene N-gene and envelope gene S-gene of SARS-CoV-2.

The optimal conditions for RT-LAMP amplification with colorimetric evaluation of the endpoint results were selected experimentally, taking into account that the mixture should be of the minimum composition necessary for the reaction, since it was necessary to ensure that the change in pH of the solution, and the color after the reaction, would change only under the influence of specific amplification products that accumulate in the reaction mixture.

Results of research and discussion. *Despite the fact that a number of authors claim an exceptionally high specificity and sensitivity of RT-LAMP, we were able to obtain results that coincide with those obtained by the classical RT-qPCR method only under conditions of a significant content of viral genomes in the reaction (sample). In this case, the Ct value should be within the range of no more than 25. For samples in the range of Ct 26-30, the sensitivity and specificity of RT-LAMP is significantly reduced. For samples with a low number of target genomes, which is typical for Ct 35-45, it is inappropriate to use RT-LAMP due to low specificity and a high risk of false-positive and false-negative results.*

When analyzing the test results of the RT-LAMP method for the primer set for the N gene fragment, we observed a sensitivity limitation of about Ct ≈ 30-32. A direct comparison of the Ct values for the S and N gene primer sets for all samples revealed a difference of approximately 1.2-2.3 Ct. This suggested that the N gene primers were more sensitive than the S gene primers for the detection of SARS-CoV-2 RNA using this test.

To determine the specificity and sensitivity of the RT-LAMP assay, we analyzed all available positive samples. In total, we analyzed 25 RNA samples, repeating the assay at least 3 times. Visualization of the RT-LAMP analysis results 30 min after the start of incubation at 64°C showed the expected results, indicating that the RT-LAMP analysis had sufficient reproducibility. The consistency of the results during the assay confirmed the threshold of ΔOD >+0.3 as a reliable indicator for identifying samples that were positive for SARS-CoV-2 RNA.

Conclusions and prospects for further research. *1. The RT-LAMP method can be used to detect SARS-CoV-2 virus in samples with a significant number of pathogen genomes – 600 or more. For the RT-qPCR Ct values < 25, the method corresponds to the sensitivity and specificity of the standard RT-qPCR test. For colorimetric evaluation of the endpoint reaction, it is not recommended to use a reaction time of more than 30 minutes, as nonspecific late amplification may cause false-positive results.*

2. The overall specificity of the RT-LAMP assay for the N gene was 99.4%, and the sensitivity for samples with a Ct score < 30 on RT-qPCR was 98.5%. For the S gene, the overall specificity was 92.8%, and the sensitivity for samples with a Ct < 30 was 96.8%. The overall specificity of RT-LAMP with colorimetric evaluation of the test results for the N gene was 85.7%, and the sensitivity was 98.5%. The overall specificity of RT-LAMP with colorimetric evaluation of the test results for the S gene was 75%, and the sensitivity was 98.5%.

Further studies are planned to investigate the sensitivity and specificity of the primer set for the detection of new mutant strains of SARS-CoV-2 virus.

Keywords: *COVID-19, SARS-CoV-2, RT-qPCR, LAMP, diagnostcs.*

REFERENCES

1. Rabi, F. A., Al Zoubi, M. S., Kasasbeh, G. A., Salameh, D. M., Al-Nasser, A.D. (2020). SARS-CoV-2 and Coronavirus Disease 2019: What We Know So Far. *Pathogens,* 9(3), 231. https://doi.org/10.3390/pathogens9030231.

2. Ying Yan, Le Chang, Lunan Wang. (2020). Laboratory testing of SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV-2 (2019-nCoV): Current status, challenges, and countermeasures. *Rev Med Virol,* 30(3), e2106. doi: 10.1002/rmv.2106.

3. V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S., Stalder, H., & Thiel, V. (2021). Coronavirus biology and replication: Implications for SARS-CoV-2. *Nature Reviews Microbiology,* 19(3), 155–170. doi: 10.1038/s41579-020-00468-6.

4. Singh, J., Pandit, P., McArthur, A. G., Banerjee, A., & Mossman, K. (2021). Evolutionary trajectory of SARS-CoV-2 and emerging variants. *Virology Journal*, 18, 166. https://doi.org/10.1186/s12985-021-01633-w.

5. Cagliani, R., Forni, D., Clerici, M., & Sironi, M. (2020). Computational Inference of Selection Underlying the Evolution of the Novel Coronavirus, Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2. *Journal of Virology,* 94(12), e00411-20. https://doi.org/10.1128/jvi.00411-20.

6. Yan, C., Cui, J., Huang, L., & Du, B., et al. (2020). Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Clinical Microbiology and Infection,* 26(6), 773-779. doi: 10.1016/j.cmi.2020.04.001.

7. Yakovleva, A., Kovalenko, G., Redlinger, M., Liulchuk, M.G., Bortz, E., Zadorozhna, V.I., Scherbinska, A.M., Wertheim, J.O., Goodfellow, I., Meredith, L., & Vasylyeva, T.I. (2022). Tracking SARS-COV-2 variants using Nanopore sequencing in Ukraine in 2021. *Scientific Reports,* 12, 15749. https://doi.org/10.1038/s41598-022-19414-y.

8. MacLean, O.A., Lytras, S., Weaver, S., Singer, J.B., Boni, M.F., Lemey, P., ... Robertson, D.L. (2021). Natural selection in the evolution of SARS-CoV-2 in bats created a generalist virus and highly capable human pathogen. *PLoS Biology,* 19(3), e3001115.

9. Elaswad, A., Fawzy, M., Basiouni, S., & Shehata, A. A. (2020). Mutational spectra of SARS-CoV-2 isolated from animals. *PeerJ,* 8, e10609. doi: 10.7717/peerj.10609.

10. Ji, T., Liu, Z., Wang, G., Guo, X., Khan, S.A., Lai, C., ... Chen, Y. (2020). Detection of COVID-19: A review of the current literature and future perspectives. *Biosensors and Bioelectronics,* 166, 112455. doi: 10.1016/j.bios.2020.112455.

11. Huang, W.E., Lim, B., Hsu, C.C., Xiong, D., & Wu, W., et al. (2020). RT- LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS- CoV- 2. *Microbial Biotechnology,* 13(4), 950-961. doi: 10.1111/1751-7915.13586.

12. Lamb, L.E., Bartolone, S.N., Ward, E., & Chancellor, M.B. (2020). Rapid Detection of Novel Coronavirus (COVID-19) by Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification. Preprint. doi: 10.1101/2020.02.19.20025155.

13. Curtis, K.A., Morrison, D., Rudolph, D.L., et al. (2018). A multiplexed RT-LAMP assay for detection of group M HIV-1 in plasma or whole blood. *Journal of Virological Methods,* 255, 91-97. doi: 10.1016/j.jviromet.2018.02.012.

14. Xuejiao, Hu, Qianyun, Deng, Junmin, Li et al (2020). Development and Clinical Application of a Rapid and Sensitive Loop-Mediated Isothermal Amplification Test for SARS-CoV-2 Infection. *Clinical Science and Epidemiology,* 5(4), e00808-20. https://doi.org/10.1128/msphere.00808-20.

15. Dao Thi, V.L., Herbst, K., Boerner, K., et al. (2020). A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. *Science Translational Medicine,* 12(556), eabc7075. doi: 10.1126/scitranslmed.abc7075.

16. Li, C., & Ren, L. (2020). Recent progress on the diagnosis of 2019 Novel Coronavirus. Transboundary and Emerging Diseases, 67(4), 1485-1491. https://doi.org/10.1111/tbed.13620.

17. Huang, W.E., Lim, B., Hsu, C.C., Xiong, D., & Wu, W., et al. (2020). RT- LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. *Microbial Biotechnology,* 13(4), 950-961. https://doi.org/10.1111/1751-7915.13586.