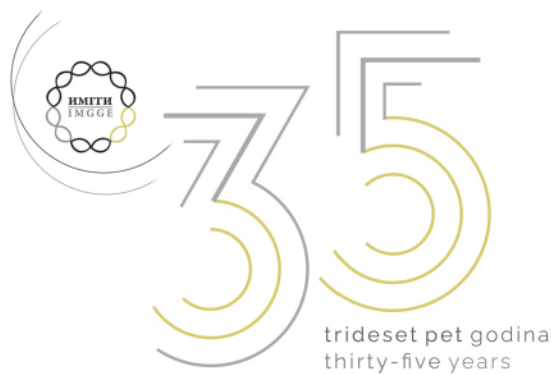


Broj 1 • septembar 2021. N° 1 • September 2021.



Trendovi u **molekularnoj biologiji**  
Trends in **Molecular Biology**



Beograd • Belgrade • 2021.  
IMGGI • IMGGE

# Sadržaj • Content

Personalizovana medicina i COVID-19: značaj genomskog profilisanja pacijenata i bioinformatike <b>Branka Zukić, Biljana Stanković, Nikola Kotur</b>	6	Personalized medicine and COVID-19: the importance of genomic host profiling and bioinformatics
Izotermalna amplifikacija posredovana petljom (LAMP) kao metoda za terensku detekciju SARS-CoV-2 virusa <b>Mila Djisalov, Teodora Knežić, Ljiljana Janjušević, Željko D. Popović, Petar Kosijer, Ivana Gadjanski</b>	21	Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as a point-of-care SARS-CoV-2 detection method
CRISPR-Cas9 tehnologija: od osnovnih istraživanja do kliničke prakse <b>Marko Panić</b>	33	CRISPR-Cas9 technology: from basic research to clinical application
Primena CRISPR/Cas9 tehnologije u otkrivanju novih molekularnih terapeutika <b>Anita Skakić, Maja Stojilković</b>	42	Application of CRISPR/Cas9 technology in the discovery of new molecular therapeutics
Nova paradigma u dijagnostici retkih bolesti <b>Milica Keckarević Marković, Miljana Kecmanović, Dušan Keckarević</b>	54	Diagnostics of rare diseases: New paradigm
Genetička i epigenetička karakterizacija varijantnih <i>DMPK</i> ekspanzija kao modifikatora fenotipa miotonične distrofije tipa 1 <b>Jovan Pešović, Stojan Perić, Lana Radenković, Vidosava Rakočević-Stojanović, Dušanka Savić-Pavićević</b>	60	Genetic and epigenetic characterization of variant <i>DMPK</i> expansions as a modifier of phenotype in myotonic dystrophy type 1
Molekularna osnova primarne cilijarne diskinezije <b>Marina Anđelković</b>	71	Molecular basis of primary ciliary dyskinesia
Molekularna osnova monogenetskog dijabetesa <b>Jovana Komazec, Milena Ugrin</b>	84	The Molecular Basis of Monogenic Diabetes
Diferencijalna dijagnoza eozinofilnog infiltrata u sluznici jednjaka primenom molekularno-bioloških metoda <b>Nina Ristić, Tijana Išić Denčić, Radmila Janković</b>	96	Differential diagnosis of eosinophilic infiltrate in esophageal mucosa by applying molecular biology methods
Molekularni markeri u sistemskoj sklerozi: geni kandidati i terapijski modaliteti <b>Vesna Spasovski, Miša Vreća</b>	107	Molecular markers in systemic sclerosis: candidate genes and therapeutic modalities
Duga nekodirajuća RNK GAS5 kao novi biomarker u onkologiji <b>Vladimir Gašić, Nataša Tošić</b>	113	Long noncoding RNA GAS5 as a new biomarker in oncology
Prediktivna i prognostička uloga gena p16INK4a, p14ARF i KRAS u karcinomu rektuma čoveka <b>Bojana Kožik, Milena Krajnović, Nikola Kokanov</b>	123	Predictive and prognostic role of p16INK4a, p14ARF and KRAS genes in human rectal carcinoma
Savremena molekularno-biološka ispitivanja prognostičkih faktora papilarnog tiroidnog karcinoma i mogućnost njihove primene u kliničkoj praksi <b>Ilona Đorić, Jelena Janković Miljuš, Sonja Šelemetjev</b>	133	Contemporary molecular-biological investigations of papillary thyroid carcinoma prognostic factors and their potential for application in clinical practice
Nekodirajuće RNK kao perspektiva u dijagnostici i lečenju kardiovaskularnih bolesti <b>Ljiljana Rakićević</b>	146	Non-coding RNAs as a prospect in diagnostics and treatment of cardiovascular diseases
Biološko delovanje polifenola nara na komponente metaboličkog sindroma: implikacije na oksidativni stres <b>Milica Kojadinović i Aleksandra Arsić</b>	152	Biological effect of pomegranate polyphenols on the components of metabolic syndrome: implications on oxidative stress
Biogeni utišavači virulencije vrste <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <b>Milka Malešević, Branko Jovčić</b>	166	Biogenic silencers of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> virulence
Silicijum kao antistres element za biljke izložene toksičnim koncentracijama bakra <b>Dragana Bosnić, Dragana Nikolić, Jelena Samardžić</b>	180	Silicon as an anti-stress element for plants exposed to toxic copper

## **PREDGOVOR**

Molekularna biologija doživljava svoj procvat u XXI veku. Od naučne discipline koja je početkom 1930-ih bila u povojima, i koja je nastojala da objedini genetiku, biohemiju i biofiziku kako bi rasvetlila tajne života, izrasla je u nauku čija su postignuća doprinela velikom napretku u medicini, veterini, poljoprivredi i farmaciji. Uz informaciono komunikacione tehnologije, molekularna biologija je najperspektivnija oblast istraživanja, od koje se očekuje da značajno doprinese boljitku života ljudi u budućnosti.

U Srbiji je molekularna biologija prepoznata relativno rano, pre nego na mnogim drugim meridijanima. Već u školskoj 1972/73. se na Biološkom fakultetu u Beogradu (tada Prirodno-matematički fakultet) osniva smer- molekularna biologija i fiziologija. U našoj zemlji se tako edukuju generacije molekularnih biologa već pola veka. I veliki naučni instituti u Srbiji osnivaju laboratorije u kojima istraživanja prate, a ponekad i predvode, svetske trendove u molekularnoj biologiji. Jedna od tih naučnih institucija je Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo (IMGGI), osnovan 1986. godine u Beogradu. Već 35 godina naučnici iz IMGGI stavljaju najmodernije teme iz molekularne biologije u fokus svojih istraživanja.

Ovaj Tematski zbornik ima za cilj da prikaže aktuelne teme i postignuća iz oblasti molekularne biologije u prethodnoj, 2020. godini i da svedoči o tome kako su naučnici u Srbiji učestvovali u tim svetskim trendovima. Poglavlja su rezultat doktorskih teza mladih molekularnih biologa ali i prikaz aktuelnih istraživanja u kojima je istaknut doprinos naših naučnika. Od godine 2020. se očekivao veliki napredak u mnogim disciplinama zahvaljujući novim saznanjima iz molekularne biologije. Početak godine je doneo pandemiju KOVID-19 bolesti, koja je imala sve karakteristike epidemija iz ranijih vekova. Bili smo na pragu velikog razočaranja. A onda je molekularna biologija upotrebila sve svoje kapacitete, tako što je omogućila karakterizaciju virusa, uzročnika bolesti, za izuzetno kratko vreme. Iz tog razloga metode za detekciju virusa su bile razvijene u rekordnom roku, te je brza i efikasna dijagnostika postala dostupna lekarima. A potom su se pojavile vakcine, rezultat modernih metoda genetičkog inženjerstva. I tako je 2020. godina ipak bila jedinstvena u istoriji, jer je odgovor na epidemiju bio brz i efikasan, zahvaljujući, u velikoj meri, molekularnoj biologiji. Iste godine, Nobelova nagrada za hemiju je dodeljena metodi koja efikasno i tačno edituje humani genom. Vrata medicine budućnosti su se širom otvorila.

Ova sveska bi trebalo da bude prva u nizu godišnjih tematskih zbornika posvećenih aktuelnim temama iz molekularne biologije. Svesni smo kako će ovi rezultati izgledati za deceniju ili dve. Ali, ovo su „znakovi pored puta“ koje je naše vreme ostavilo, osvetljavajući put kojim se ide napred. Mi smo zadivljeni napretkom naše nauke, kad pogledamo u prošlost, ali smo i svesni koji su njeni dometi u odnosu na ono čemu nauka stremi. Radujemo se budućim sveskama i verujemo da će one otvarati nove perspektive i trasirati put napretka.

Nadamo se da će ovaj Tematski zbornik naći put do mladih ljudi, da će ih inspirisati da se opredele za naučni rad, posebno za molekularnu biologiju. Verujemo da će buduće generacije uvideti da naučni rad i u ovoj zemlji može dati doprinos svetskoj nauci a pri tome i dovesti do poboljšanja života ljudi u našoj zemlji. Od svih koji su učestvovali u stvaranju ovog svedočenja o našem vremenu, poruka za vas koji dolazite je:

„Hoćemo li na molekularnu?!“

**Sonja Pavlović**

## IZ RECENZIJA TEMATSKOG ZBORNIKA

### Trendovi u molekularnoj biologiji

Tematski zbornik *Trendovi u molekularnoj biologiji* oslikava trenutno stanje i fokus istraživanja u molekularnoj biologiji u Srbiji. Izabrane tematske oblasti i reprezentativni radovi jasno govore o mogućnostima i dometima ove naučne oblasti i spremnosti istraživača u Srbiji da prate trendove i savremene naučne pristupe.

Osim trenutno aktuelnog COVID-19, molekularna biologija je unapredila i obogatila istraživanja u medicini kroz oblast biomedicine. Težište ovog Tematskog zbornika je na rezultatima istraživanja molekularne osnove kompleksnih i retkih bolesti. Proučavanje prokariota dovelo je do mnogih fundamentalnih i revolucionarnih otkrića u molekularnoj biologiji, koja su otvorila put ka biotehnološkoj primeni. Jedno od takvih otkrića je i CRISPR/Cas9 tehnologija za editovanje genoma. Veoma važna oblast istraživanja je i potraga za inovativnim načinima kontrole infekcija izazvanih bakterijama koje su rezistentne na konvencionalne antibiotike. O ovim temama se takođe govori u Tematskom zborniku. Istraživanja u molekularnoj biologiji biljaka ne samo da su proširila znanja o ovim organizmima, već su otvorila put ka primeni savremenih metoda za poboljšanje osobina biljaka i povećanje prinosa. U tom smislu je veoma zanimljiv i ilustrativan rad koji je prikazan u ovom Zborniku.

Tematski zbornik *Trendovi u molekularnoj biologiji* jasno je ukazao na naučni i širi društveni značaj istraživanja u molekularnoj biologiji. Ovim prvim brojem nagoveštava se da će Zbornik ne samo pratiti i dokumentovati najznačajnija dostignuća u molekularnoj biologiji, već da će biti podstrek i inspiracija istraživačima u Srbiji.

#### **Prof. Svetlana Radović, redovni profesor Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu**

Tematski zbornik „Trendovi u molekularnoj biologiji“ je sačinjen od 17 poglavlja u kojima su predstavljeni naučni rezultati iz oblasti molekularne biologije koje su ostvarili naučnici iz Srbije. Veliki broj poglavlja iz Zbornika je posvećen istraživanjima iz oblasti biomedicine. Doprinos koji je molekularna biologija dala modernoj medicini je izuzetno veliki. Danas su u kliničkoj praksi mnogobrojni dijagnostički, prognostički i terapijskih molekularni markeri. Posebno je značajno što je medicina u Srbiji pratila svetske trendove, i to zahvaljujući i velikim naporima molekularnih biologa u našoj zemlji.

Najbolji primer postignuća molekularne biomedicine je odgovor ove nauke na pandemiju KOVID-19. Dijagnostika je omogućena uzuzetno brzo jer je molekularna biologija bila spremna za ovaj zadatak. Ipak je razvoj vakcina u fascinantnom roku najveće postignuće ove nauke. Molekularna biologija je pokazala svoju snagu u pravom trenutku i postala najznačajnija nauka u kriznim momentima za čovečanstvo, kako u svetu, tako i u našoj zemlji.

Sigurno je da će ovako koncipiran Tematski zbornik imati budućnost, jer je napredak medicine nemoguće zamisliti bez novih dostignuća molekularne biologije.

#### **Prof. dr Vesna Škodrić-Trifunović, redovni profesor Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu**

Ovaj Tematski zbornik kroz četiri celine daje pregled najznačajnijih ostvarenja u molekularnoj biologiji u svetu, a kojima se bave i istraživači u Srbiji. U okviru 17 preglednih radova prikazani su različiti rezultati - od onih koji su obeležili prethodnu godinu (posvećeni COVID-19 i CRISPR/Cas9 tehnologiji), preko novih dostignuća u biomedicini (retkih i kompleksnih bolesti), do molekularno bioloških istraživanja prokariota i biljaka.

Značaj ovog Zbornika je višestruk, ogleda se ne samo u činjenici da su najrelevantnija saznanja iz navedenih oblasti objedinjena i postala dostupna široj javnosti na maternjem jeziku, već i zbog toga što su radove napisali istraživači iz različitih naučnih instituta (6), fakulteta (3) i klinika (2) iz Srbije, u kojima se ta istraživanja aktivno sprovode. Naime, saznanja o SARS-CoV-2 koronavirusu, uzročniku nove bolesti COVID-19, se kontinuirano uvećavaju i veoma je važno što i naučnici iz naše zemlje daju doprinos u razumevanju ove pandemije. Isto se odnosi i na najnovije tehnologije za manipulaciju molekula DNK, koje su dovele do revolucionarnih pomaka u biomedicinskim naukama. Stoga, prikazana istraživanja molekularne osnove različitih bolesti najsavremenijim metodološkim pristupima, primena dobijenih rezultata u dijagnozi, preciznom predviđanju progresije bolesti i lečenju, kao i razvoju novih molekularnih terapeutika, daju realnu osnovu očekivanjima da će personalizovana medicina uskoro postati široko dostupna.

#### **Dr Gordana Nikčević, naučni savetnik Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, Univerzitet u Beogradu**

## Izotermalna amplifikacija posredovana petljom (LAMP) kao metoda za terensku detekciju SARS-CoV-2 virusa

Mila Djisalov<sup>1</sup>, Teodora Knežić<sup>1</sup>, Ljiljana Janjušević<sup>1</sup>, Željko D. Popović<sup>2</sup>, Petar Kosijer<sup>1</sup>, Ivana Gadjanski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Univerzitet u Novom Sadu, Institut Biosens, Novi Sad, Srbija

<sup>2</sup>Univerzitet u Novom Sadu, Departman za biologiju i ekologiju, Prirodno-matematički fakultet, Novi Sad, Srbija

Kontakt: igadjanski@biosense.rs

### Apstrakt

Pravovremeno testiranje većeg broja ljudi na SARS-CoV-2 virus je povezano sa nižim mortalitetom od COVID-19 oboljenja. Međutim, većina zemalja nema mogućnosti za takvo masivno testiranje putem metode "PCR u realnom vremenu", zbog visoke cene neophodne opreme i potrebe za stručnim osobljem. Zbog toga se razvijaju brze i ekonomičnije metode, koje se najčešće zasnivaju na izotermalnim metodama amplifikacije DNK. Za ove metode nije potreban ciklični termostat, zbog čega su primenljivije za terensku upotrebu. Fokus je na **izotermalnoj amplifikaciji posredovanoj petljom (LAMP)**, zbog njene visoke specifičnosti, mogućnosti za upotrebu neprečišćenih uzoraka i jednostavnosti merenja signala. Autori predstavljaju pregled najvažnijih radova o LAMP metodi za detekciju SARS-CoV-2 virusa objavljenih tokom 2020. godine, kao i opise nekoliko komercijalnih kompleta na bazi LAMP metode za COVID-19 testiranje.

**Ključne reči:** izotermalna amplifikacija, LAMP, terenska detekcija, SARS-CoV-2, COVID-19

## Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) as a point-of-care SARS-CoV-2 detection method

Mila Djisalov<sup>1</sup>, Teodora Knežić<sup>1</sup>, Ljiljana Janjusevic<sup>1</sup>, Željko D. Popović<sup>2</sup>, Petar Kosijer<sup>1</sup>, Ivana Gadjanski<sup>1</sup>

<sup>1</sup>University of Novi Sad, BioSense Institute, Novi Sad, Serbia

<sup>2</sup>University of Novi Sad, Department of Biology and Ecology, Faculty of Sciences, Novi Sad, Serbia

Correspondence: igadjanski@biosense.rs

### Abstract

Massive testing for SARS-CoV-2 virus is related to lower mortality rates of COVID-19. Most countries face challenges to perform massive testing with the currently available methods (real-time PCR), due to expensive equipment and requirement of highly skilled personnel. To overcome these challenges, faster and cost-effective alternative detection methods are being developed, primarily based on isothermal methods of nucleic acid amplification (isoNAAs). PCR depends on precision instruments, high cleanliness of operating conditions and cannot be easily used on-site, while isoNAAs, which do not require thermal cyclers, are more applicable for point-of-care (PoC) use. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) is one of the isoNAA most in focus for COVID-19 tests due to its high specificity and possibility to use unpurified specimens in combination with simplified detection setup. The article gives a review of the most significant publications on use of LAMP for SARS-CoV-2 detection and of the several commercial LAMP-based COVID-19 testing kits.

**Keywords:** isothermal amplification, LAMP, point-of-care detection, SARS-CoV-2, COVID-19

## KRATAK OSVRT NA KLASIČNI PCR

Lančana reakcija polimeraze, poznatija kao PCR (od *engl.* polymerase chain reaction) je metoda koju je opisao dr Keri B. Malis (Kary B. Mullis) 1985. godine. Zbog njenog ogromnog uticaja na razvoj molekularne biologije, ali i sveukupne nauke, dr Malis je 1993. dobio Nobelovu nagradu za hemiju, upravo za otkriće PCR metode.

Klasični PCR i danas sadrži vrlo slične komponente reakcije, čiji kvalitativni sastav se nije mnogo menjao u proteklih 36 godina, od kada je prvi put opisan i u njih ubrajamo: pufer,  $MgCl_2$ , dezoksinukleozid-trifosfate (*engl.* deoxyribose nucleotide triphosphate, dNTP), levu i desnu početnicu (prajmer, od *engl.* primer), *Taq* polimerazu i matricu koja se umnožava. Biohemijska reakcija umnožavanja matrice se odvija u ponavljajućim ciklusima koji se sastoje od po tri osnovna koraka sa različitim temperaturnima uslovima koji pogoduju: *denaturaciji DNK* (94–95 °C), *vezivanju početnica* (45–65 °C) i *sintezi novog lanca* (oko 72 °C). S obzirom na to da se uspešnost PCR reakcije proverava tek po njenom završetku, elektroforetskim razdvajanjem i bojenjem gela radi vizualizacije produkata PCR reakcije na gelu, klasični PCR i sve iz njega izvedene PCR metode grupišu se u tzv. *endpoint PCR metode*. Umnožavanje nukleinskih kiselina (NK) klasičnom PCR metodom je vrlo brzo našlo upotrebu u medicinskoj i veterinarskoj dijagnostici, stvarajući izdvojenu granu molekularne biologije – molekularnu dijagnostiku. Međutim, postoji nekoliko mana korišćenja klasičnog PCR, kao endpoint metode, u molekularnoj dijagnostici. Prva je da se njegova osetljivost zasniva na detekciji umnožaka na gelu, druga je da se zbog otvaranja reakcione smeše posle PCR reakcije, kako bi se deo smeše naneo na gel, stvara veliki rizik, kako za zagađenje uzoraka, tako i radne okoline, treća je neophodnost fotografisanja gelova, njihova analiza i čuvanje radi stvaranja foto-arhive. Pored toga što je PCR vrlo prihvaćena i danas široko korišćena metoda, u klasičnom PCR-u je dolazilo i do izmena zbog različitih vrsta uzoraka koji se umnožavaju, vrsta bioloških materijala, svrhe korišćenja dobijenog PCR proizvoda, kao i do unapređenja zbog razvoja novih (bio)tehnologija, te zato danas imamo veliki broj sličnih metoda koje se zasnivaju na izmenjenoj klasičnoj PCR reakciji npr. reverzno-transkripcioni PCR (RT-PCR), RACE PCR (*engl.* rapid amplification of cDNA ends), NESTED PCR, metilaciono specifični PCR, droplet digital PCR (ddPCR), PCR u realnom vremenu/kvantitativni PCR (*engl.* Real Time PCR, qPCR, quantitative real time – QRT-PCR) i dr.

## PCR U REALNOM VREMENU (KVANTITATIVNI PCR, KVANTITATIVNI REVERZNO-TRANSKRIPCIONI PCR)

Jedna od možda najznačajnijih prekretnica u primeni klasičnog PCR-a bilo je uvođenje praćenja umnožavanja DNK u realnom vremenu putem beleženja promene intenziteta fluorescencije, koja je poticala od fluorescentne boje koja se vezivala za umnoške DNK u reakcionoj smeši [1,2]. Ovaj novi metod koji je nazvan PCR u realnom vremenu (*Real Time PCR*), poznat je i kao kvantitativni PCR (qPCR) i vrlo često je pogrešno označavan u stručnoj literaturi kao RT-PCR, skraćenica koja se odnosi na PCR zasnovan na povratnoj/reverznoj transkripciji. PCR u realnom vremenu je vrlo brzo postao dominantan u molekularnoj dijagnostici, naročito za otkrivanje, kvantifikaciju i tipizaciju različitih mikrobioloških patogena, kako u oblastima kliničke i veterinarske dijagnostike, tako i bezbednosti hrane [3]. Princip PCR metode u realnom vremenu zasniva se na činjenici da se proces umnožavanja NK prati tokom svakog PCR ciklusa, a kako bi se to postiglo koriste se različiti pristupi detekcije umnoška: *neprecifni* – upotrebom fluorescentnih boja npr. SYBR Green, Eva Green i sl, koje se vezuju za dvostruku DNK ili *specifični* – korišćenjem kombinacijama početnica i/ili proba koje su obeležene fluoroforom koja će biti ekscitirana svetlošću posle njenog hibridizovanja po principu komplementarnosti sa ciljnim regionom NK, što ujedno i čini ovaj pristup detekcije signala specifičnim. Zbog toga što je neophodno beleženje svetlosnog signala tokom PCR reakcije, za sprovođenje PCR-a u realnom vremenu su neophodni aparati koji imaju dodatne osobine u odnosu na klasični PCR aparat. Naime, neophodno je postojanje optičkog modula pomoću koga je omogućeno ozračivanje reakcije radi pobuđivanja fluorescencije koja se posle beleži i predstavlja kao grafik zavisnosti promene fluorescencije od broja ciklusa tj. grafik umnožavanja proizvoda u PCR reakciji.

Uzimajući u obzir da svi fluorogeni supstrati odaju svetlost u određenoj meri, čak i kada nisu pobuđeni, tokom PCR-a u realnom vremenu uvek postoji određena količina *pozadinske fluorescencije* (*engl.* background fluorescence). Pozadinskom fluorescencijom se podrazumeva sva ona fluorescencija koja se beleži u prvih 10-15 ciklusa PCR-a, te se zbog nje određuje nivo *granične fluorescencije* (*engl.* threshold fluorescence) koji se mora dostići tokom PCR reakcije da bi se smatralo da fluorescencija potiče od umnožaka nastalih tokom PCR reakcije i to u uzlaznom delu njene eksponencijalne faze. Stoga, upravo onaj ciklus u kome se probije vrednost granične fluorescencije naziva se Ct ili Cq vrednost (od *engl.* cycle threshold, cycle of quantification) i ona predstavlja kvantitativnu vrednost PCR reakcije, ali je ujedno i kvalitativni pokazatelj uspešnosti PCR reakcije u realnom vremenu. Dodatno, kako je Ct/Cq vrednost obrnuto srazmerna početnoj količini genetičkog materijala u PCR reakciji, ona se može koristiti kako za kvantitativnu procenu ili pak određivanje apsolutne količine NK u ispitivanom materijalu. Stoga se PCR u realnom vremenu, zbog svojih prednosti, koristi u naučnim studijama kako za validaciju npr. polukvantitativnih metoda kao što je mikrorej [4,5], tako i u analizi relativne ili apsolutne ekspresije gena različitih model organizama ili model sistema [6–8].



Kvantitativni aspekt PCR-a u realnom vremenu je upravo ono što mu je dalo veliki značaj i u mikrobiološkoj dijagnostici [3], naročito u ranom otkrivanju virusnih patogena (npr. HIV, HCV i dr.) ili drugih obligatornih intracelularnih organizama (npr. *Chlamydia trachomatis* i dr.) u različitim tečnim biološkim materijalima (krv, urin, sperma, pljuvačka, likvor, želudačni sok i dr.) ili brisevima (npr. tipizacija visokorizičnih onkogenih tipova HPV-a, tipizacija HSV i sl). Osim u mikrobiološkoj dijagnostici, ova metoda ima i široku upotrebu i u molekularnoj genetici i citogenetici, za analizu prisustva tačkastih mutacija, aneuploidija i dr., kao i u biotehnološkim i farmaceutskim studijama koje zahtevaju kvantifikaciju količine genetičkog materijala.

Apsolutna kvantifikacija NK u uzorku je omogućena pomoću kalibracione krive koja se predstavlja kao grafik zavisnosti Ct/Cq vrednosti od serijskih razblaženja standardnih uzoraka (obično decimalnih razblaženja) sa poznatim koncentracijama ili brojevima kopija NK [9].

Iako je upotreba Real Time PCR metode u dijagnostici rutinska i mnogima deluje jednostavno, u praksi postoje specifični problemi koje korisnici ove tehnologije moraju imati na umu. Tu pre svih spadaju razumevanje principa PCR-a, upotreba ispravne terminologije i tačnih definicija, poteškoće sa upotrebom složene opreme, tumačenjem i predstavljanjem podataka, različita ograničenja qPCR u oblasti mikrobiološke dijagnostike, kao i dobro poznavanje parametara koji su važni za kvalitativni i kvantitativni opis performansi Real Time PCR-a.

## UPOTREBA PCR-a U REALNOM VREMENU U DIJAGNOSTICI SARS-CoV-2 (COVID-19)

Koronavirusi pripadaju grupi RNK virusa sa pozitivnim lancima. Virus SARS-CoV-2 (*engl.* severe acute respiratory syndrome coronavirus 2) pripada familiji *Coronaviridae*, potfamiliji *Coronavirinae* i rodu *Betacoronavirus*. Genom SARS-CoV-2 je veličine oko 29,9 kb i sastoji se od nekoliko gena koji kodiraju nestrukturane, strukturne i pomoćne proteine. Najveći gen je ORF1ab i on sadrži preklapajuće otvorene okvire čitanja koji kodiraju poliproteine PP1ab i PP1a. Poliproteini se isecaju dajući 16 nestrukturanih proteina koji, zasnovani na sličnosti sa drugim koronavirusima, uključuju (između ostalih nestrukturanih proteina) i RNK-zavisnu RNK polimerazu (RdRp) i 2'-O-riboza-metiltransferazu [10].

Molekularna dijagnostika COVID-19 zasniva se na specifičnoj i osetljivoj detekciji ribonukleinske kiseline (RNK) ovog virusa. Smatra se da su metode zasnovane na kombinaciji RT-PCR i qPCR najtačnije za otkrivanje prisustva SARS-CoV-2 virusa i predstavljaju „zlatni standard“ dijagnostike ovog patogena [11,12]. Dijagnostičke reakcije mogu biti postavljane ili u *dva koraka (dvostepene)*, kada se prvo postavlja RT-PCR, a posle toga se sprovodi qPCR u drugoj, nezavisnoj reakciji, ili pak postavljane u *jednom koraku (jednostepene)*, kada se sinteza cDNK (RT-PCR) i qPCR odvijaju u jednoj istoj reakcionoj smeši, ali u dva vremenski povezana i temperaturno prilagođena programa. U slučaju jednostepene reakcije, ovakvu vrstu PCR metode je najpravilnije nazivati *kvantitativni reverzno-transkripcioni PCR* skraćeno *QRT-PCR* (od *engl.* quantitative reverse transcription PCR).

Uvidom u internet repozitorijum organizacije FIND – Foundation for Innovative New Diagnostics (<https://www.finddx.org/test-directory/>, na dan 12. 07. 2021), trenutno postoji registrovano 649 različitih vrsta dijagnostičkih testova na SARS-CoV-2 virus, od kojih su 202 molekularna testa zasnovana na qPCR metodi. Na tržištu su dostupne različite QRT-PCR platforme, od kojih su pojedine navedene u **Tabeli 1**.

U najvećem broju slučajeva, QRT-PCR omogućava otkrivanje nekoliko specifičnih gena koji kodiraju strukturne proteine virusa: E protein ovojnice (E od *engl.* envelop), N protein nukleokapsida, S protein šiljka (S od *engl.* spike) i/ili pak nestrukturane proteine - enzime RNK-zavisnu RNK polimerazu (RdRp, *engl.* RNA-dependent RNA polymerase) i 2'-O-metiltransferazu, obe kodirane od strane velikog ORF1ab gena. Gen E nosi informacije za stvaranje proteina u ovojnici, koji imaju svi koronavirusi. Gen N kodira multifunkcionalni N protein, koji indukuje snažan imunološki odgovor i učestvuje u virusnoj replikaciji. Enzim RdRp se prevodi posle oslobađanja virusne RNK u ćeliji domaćina i igra ulogu u umnožavanju genetičkog materijala virusa unutar ćelije, kao i enzim 2'-O-metiltransferaza, dok su ostali nestrukturani proteini SARS-CoV-2 prepisivani sa ORF1ab gena odgovorni za virusnu transkripciju, replikaciju, proteolitičku obradu, ali i suzbijanje imunoloških odgovora domaćina i suzbijanje ekspresije gena domaćina (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1489680>).

Pokazano je da najveću osetljivost i pouzdanost imaju one metode koje uključuju detekciju ORF1ab gena i N gena zajedno, a da najlošiju osetljivost imaju testovi koji detektuju i/ili gen S, i to najverovatnije zbog vrlo prisutnih mutacija na ovom genu [11,12].

## LAMP METODA

Petljom-posredovana izotermalna metoda umnožavanja nukleinskih kiselina (*engl.* loop-mediated isothermal amplification, LAMP), koju je razvila japanska kompanija Eiken [13,14] je poslednjih nekoliko godina stekla veliku popularnost u oblasti terenske dijagnostike [14]. Od svih postojećih tehnika izotermalnog umnožavanja nukleinskih kiselina LAMP je najbolje istražena metoda i ima izuzetno široku primenu. Za razliku od PCR metode kod koje su

Naziv testa	Proizvođač	Zemlja	Ciljna sekvenca	Detekcija signala	Tip uzorka	IVD/RUO	Preporučeni komplet za izolaciju NK
Abbott Real Time SARS-CoV-2	Abbott Molecular Inc.	USA	ORF1ab, N gen, IC	FAM, VIC, ROX	NFB, OFB, NB	IVD	Zatvoren automatski sistem ekstrakcije
Liferiver 2019-nCoV	BioVendor Group	Czech Republic	ORF1ab, N gen, E gen, IC	FAM, HEX, Cal Red, Cy5	NFB, OFB, NB	IVD	nije naveden preporučeni proizvođač
GeneFinder™ COVID-19 Plus RealAmp Kit	OSANG Healthcare Co.	South Korea	ORF1ab, N gen, E gen, IC	FAM, Texas Red, JOE/VIC, Cy5	NFB, BAL, SP	IVD	QIAamp viral RNA Mini Kit
TaqPath™ COVID-19 CE-IVD RT-qPCR Kit	Thermo Fischer Scientific	USA	ORF1ab, N gen, S gen, IC	FAM, VIC, ABY, JUN	NFB, OFB, NB	IVD	MagMAX™ Viral/Pathogen Nucleic Acid Isolation Kit
Novel Coronavirus (2019-nCoV) Nucleic Acid Diagnostic Kit	Sansure Biotech Inc.	China	ORF1ab, N gen, IC	FAM, ROX, Cy5	NFB, OFB, NB	IVD	set za izolaciju uključen u dijagnostički komplet
VIASURE SARS-CoV-2	CerTest Biotech, S.L.	Spain	ORF1ab, N gen, IC		NFB, OFB, NB	IVD	nije naveden preporučeni proizvođač
qMAXsen™ Coronavirus (SARS-CoV-2)	Canvax Biotech	Španija	N gen, IC	FAM1 HEX	NFB, OFB, NB, SP	IVD	nije naveden preporučeni proizvođač
Fosun COVID-19 RT-PCR Detection Kit	Shanghai Fosun Long March Medical Science	Kina	ORF1ab, N gen, E gen, IC	FAM, JOE, ROX, Cy5	NFB, OFB, NB	IVD	QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)

**Tabela 1:** Pregled dostupnih QRT-PCR testova za detekciju SARS-CoV-2 virusa (IC – internal control, NFB – nazofaringealni bris, OFB – orofaringealni bris, NB – nazalni bris, BAL – bronhoalveolarna lavaža, SP – sputum). IVD – *in vitro* diagnostics; RUO – research use only

neophodni koraci na različitim temperaturama, što se omogućava cikličnim termostatom, LAMP se odvija pri konstantnoj temperaturi (izotermalno), a uz prisustvo četiri (do šest) različitih početnica koje se vezuju za šest (ili osam) različitih regiona u okviru ciljnog gena. Na ovaj način se obezbeđuje visoka specifičnost reakcije pri izotermalnim uslovima. Prilagodljivost ove metode omogućava praćenje reakcije umnožavanja u realnom vremenu, direktno u reakcionom sudu, bez naknadnih analiza, čime je omogućena visoka specifičnost i značajno smanjen rizik od zagađenja. Praćenje reakcija u realnom vremenu omogućeno je primenom jeftinih, prenosnih, ručnih uređaja koji ne zahtevaju ciklični termostad sa skupim optičkim modulom kao kod qPCR metode, što je izuzetno pogodno za testiranje na terenu (*engl.* Point-Of-Care testing - POC) [15,16].

## LAMP POČETNICE

Jedna od značajnih razlika između LAMP i PCR metoda je to što se u okviru izvođenja LAMP-a koristi set od četiri (do šest) specifičnih početnica koje se prave na osnovu šest različitih regiona ciljnog gena: F3c, F2c i F1c regioni na 3' kraju i B1, B2 i B3 regioni na 5' kraju ciljnog gena (**Slika 1**):

### Dve unutrašnje početnice:

- prednja unutrašnja početnica (*engl.* forward inner primer, **FIP**) i
- zadnja unutrašnja početnica (*engl.* backward inner primer, **BIP**);

### Dve spoljašnje početnice:

- prednja spoljašnja početnica (*engl.* forward outer primer, **F3**) i
- zadnja spoljašnja početnica (*engl.* backward outer primer, **B3**);

### Dve dodatne početnice komplementarne sa regionom petlje:

- prednja početnica petlje (*engl.* forward loop primer, **FL**) i
- zadnja početnica petlje (*engl.* backward loop primer, **BL**).

Kao što je prikazano na **Slici 1**, FIP se sastoji od F2 regiona na svom 3' kraju, koji je komplementaran F2c regionu ciljnog gena, i regiona na svom 5' kraju, koji je iste sekvence kao F1c region. Dalje, F3 početnica se sastoji od oligonukleotidne sekvence, koja je komplementarna F3c regionu ciljanog gena. Zadnja unutrašnja početnica – BIP, sastoji se od B2 regiona na svom 3' kraju, koji je komplementaran B2c regionu, i regiona na svom 5' kraju, koji je iste sekvence kao B1c region. Zadnja spoljašnja početnica – B3 prajmer, sastoji se od oligonukleotidne sekvence, koja je komplementarna B3c regionu ciljanog gena [13].



Za dizajniranje početnica za LAMP najčešće se koristi besplatni internet softver PrimerExplorer V4, Eiken Chemical Co. Ltd. ([http://primerexplorer.jp/e/v4\\_manual/index.html](http://primerexplorer.jp/e/v4_manual/index.html)). Iako je PrimerExplorer V4 veoma koristan i u širokoj je upotrebi, ima nekoliko ograničenja. Prvo, on podržava samo „ATCG” IUPAC znakove u unešenoj sekvenci. Drugo, radi samo u Windows operativnim sistemima - Windows Vista/7 (ne podržava Mac, Linux i Solaris) i u određenom internet pretraživaču (Internet Explorer 7/8/9). Takođe, manje je prikladan za analize sa visokom stopom istovremene obrade podataka, budući da može da obavlja samo po jedno pretraživanje u jednom trenutku, prihvata sekvence duge samo do 2000 bp i rezultate prikazuje u HTML obliku [17].

PrimerExplorer V5, Fujitsu Ltd., Tokio, Japan je dostupan od oktobra 2016. godine ([https://primerexplorer.jp/e/v5\\_manual/index.html](https://primerexplorer.jp/e/v5_manual/index.html)). Za razliku od verzije V4, PrimerExplorer V5 radi u Windows 7/8.1/10 i Mac OS X 10.8.2 operativnim sistemima i Internet Explorer 10/11 i Safari 6.0.1 internet pretraživačima.

Osim toga, za dizajn početnica se može koristiti i New England BioLabs onlajn softver tj. NEB LAMP Primer Design Tool (<https://lamp.neb.com>), kao i različite aplikacije koje nisu besplatne, poput OptiGene LAMP Designer-a (<http://www.optigene.co.uk/lamp-designer/>).

Takođe, slično kao i kod klasične PCR metode, pre naručivanja i korišćenja početnica u LAMP analizi, potrebno je proveriti njihovu specifičnost BLAST pretraživanjem sekvenci u GenBank bazi podataka (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/howto/design-pcr-primers/>).

Prilikom dizajniranja LAMP početnica neophodno je ispuniti sledeće uslove:

1. dizajnirati ih tako da imaju odgovarajuće temperature topljenja  $T_M$  (*engl.* melting temperature):  $\sim 65^\circ\text{C}$  ( $64\text{--}66^\circ\text{C}$ ) za F1c i B1c,  $\sim 60^\circ\text{C}$  ( $59\text{--}61^\circ\text{C}$ ) za F2, B2 i F3 i B3 i  $\sim 65^\circ\text{C}$  ( $64\text{--}66^\circ\text{C}$ ) za početnice petlje; ([https://primerexplorer.jp/e/v4\\_manual/pdf/PrimerExplorerV4\\_Manual\\_1.pdf](https://primerexplorer.jp/e/v4_manual/pdf/PrimerExplorerV4_Manual_1.pdf))
2. krajevi početnica treba da ispunjavaju određeni stepen stabilnosti, jer smanjenje Gibsove slobodne energije (manje od  $-4$  kcal/mol) za 3' krajeve početnica dovodi do veće stope njihovog vezivanja za ciljnu sekvencu;
3. sadržaj GC baznih parova bi trebalo da bude oko 50–60%;
4. dizajnirane početnice, posebno unutrašnje, ne smeju da formiraju bilo kakve sekundarne strukture, poput dimera početnica ili ukosnica, što se može izbeći dizajnom takvih početnica koje nemaju komplementarne 3' krajeve i previše sadržaj GC baznih parova [18];
5. rastojanje između kraja F2 i B2 početnica (sekvenca koja se umnožava) treba da bude oko 120–180 bp, a između 5' kraja F2 i 5' kraja F1 početnica (deo koji formira petlju) oko 40–60 bp, dok rastojanje između F2 i F3, kao i B2 i B3 početnica, treba da bude od 0–20 bp [13].

## MEHANIZAM LAMP REAKCIJE

U osnovi LAMP metode je sinteza DNK molekula putem cikličnog tj. ponavljajućeg izmeštanja lanaca, što je omogućeno korišćenjem posebne, termostabilne DNK polimeraze izolovane iz (*Geo*)*Bacillus stearothermophilus* (*Bst*), koja poseduje visoku aktivnost izmeštanja lanaca, kao i 5'–3' polimeraznu aktivnost, ali nema 3'–5' egzonukleaznu aktivnost [14,18,19].

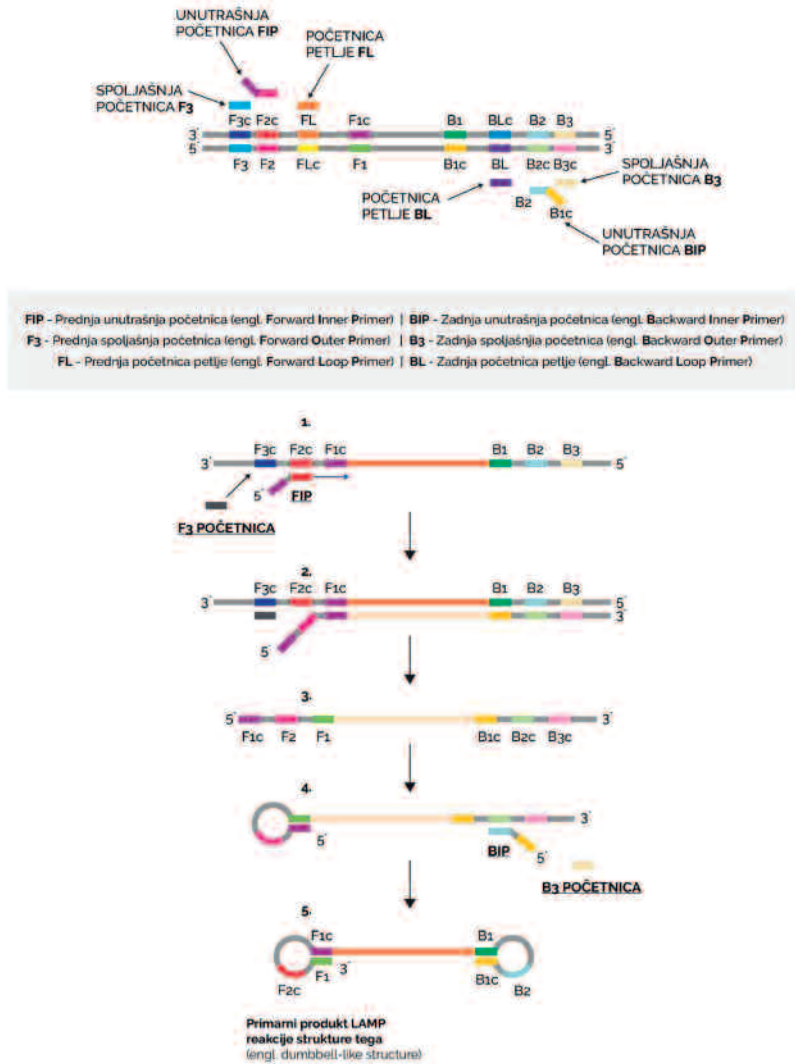
Za izvođenje LAMP reakcije je neophodno:

1. reakciona konstantna temperatura od  $60\text{--}650^\circ\text{C}$  tokom 60 minuta,
2. *Bst* DNK polimeraza,
3. slobodni dezoksiribonukleozid trifosfati tj. nukleotidi (dNTP),
4. specifične grupe početnica (četiri do šest) i
5. ciljna DNK sekvencu koju treba umnožiti [20].

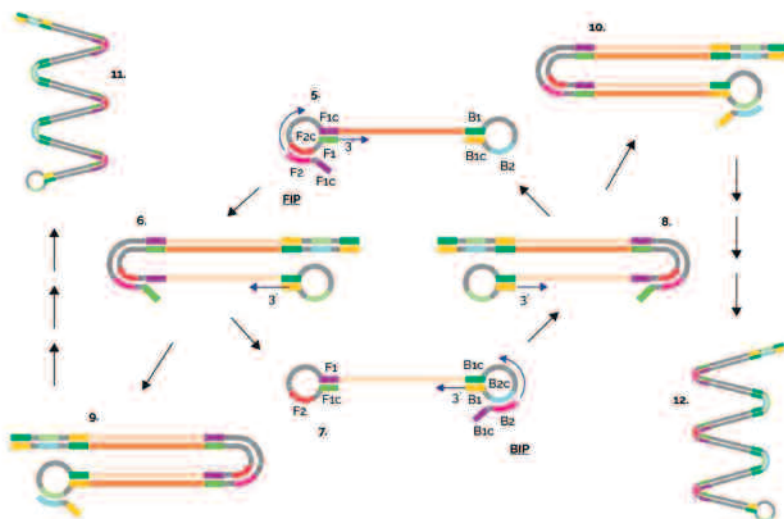
Mehanizam reakcije LAMP umnožavanja uključuje tri koraka (**Sluke 1 i 2**):

1. proizvodnju početnog materijala,
2. ciklično umnožavanje i
3. elongaciju i recikliranje

Prvi koraci LAMP reakcije podrazumevaju prisustvo svih početnica, unutrašnjih i spoljašnjih. Najpre dolazi do vezivanja FIP početnica za 3' komplementarni region kodirajućeg lanca (F2c), što inicira oslobađanje matričnog lanca i sintezu novog lanca prisustvom *Bst* DNK polimeraze. Sledeći korak sinteze preuzima spoljašnja početnica (na **Sluci 1** F3 početnica), koja se vezuje uzvodno od ciljnog regiona, prilikom čega dolazi do zamene lanaca i oslobađanja jednolančane DNK. Otpušteni lanac, tj. LAMP produkt dalje formira strukturu petlje na svom 5' kraju, zbog postojanja komplementarnih regiona u okviru novosintetisanog lanca (F1 i F1c). Ovakav ciklus vezivanja i zamene lanaca će se ponoviti i na suprotnoj strani ciljne DNK, prilikom čega se dobija kratka DNK struktura nalik tegu (*engl.* dumbbell-like DNA structure), koja služi za dalje umnožavanje ciljnog DNK molekula. Ova struktura takođe sadrži mnoge regione za inicijaciju LAMP amplifikacije na 3' krajevima petlje, kao i regione za vezivanje unutrašnjih početnica, što kao posledicu



**Slika 1.** LAMP početnice i mehanizam stvaranja primarnog LAMP produkta strukture tega (Prilagođeno prema [13])



**Slika 2.** Dalji mehanizam LAMP reakcije: formiranje struktura različitih veličina

ima formiranje konkatamernih struktura sa sve više regiona za inicijaciju sinteze [22]. Povećan broj polaznih tačaka za novosintezu DNK putem LAMP metode pružaju upravo početnice za petlje tj. sekvencu koju umožavamo sa LB i FB, koji sadrže sekvence komplementarne jednostrukoj petlji (između B1 i B2 regiona i F1 i F2 regiona).

Rezultati LAMP metode su brza akumulacija produkata dvostruke DNK i umožavanje bioprodukata koji mogu lako da se detektuju [21], bilo kao endpoint esej ili u realnom vremenu. Za endpoint detekciju se koristi klasična elektroforeza na agaroznom gelu, ili vizuelna evaluacija („golim okom“) putem kolorimetrije u okviru tzv. uređaja sa lateralnim protokom (engl. lateral flow device). Za detekciju u realnom vremenu kod LAMP metode se koriste turbidimetrija ili fluorescencija. Kod turbidimetrije se meri stepen замуćenja rastvora zbog nagomilavanja magnezijum pirofosfata, nusproizvoda DNK sinteze [22], dok se za fluorescenciju (ili čak i kolorimetriju golim okom) koriste helirajuće boje kao što su kalcein [23], hidroksinaftol plavo (engl. hydroxynaphthol blue, HNB) [24], SYBR green I i druge [25].

U poređenju sa klasičnom PCR metodom, LAMP metoda je otpornija na različite vrste inhibitora prisutnih u kliničkim uzorcima, tako da nema potrebe za mukotrpnim koracima prečišćavanja DNK. Ne zahteva ciklični termostat i u kombinaciji sa reakcijom reverzne transkripcije ima veliku moć umožavanja i RNK sekvenci. Veoma je brza, specifična, osetljiva i efikasna metoda koja omogućava detekciju DNK sa svega šest kopija u reakcionoj smeši. LAMP ima prednost u odnosu na PCR metode amplifikacije i zbog manjeg broja jednostavnijih koraka pripreme uzoraka. Upravo zbog toga, LAMP metoda ima veliki potencijal za primenu u POC ekonomičnoj dijagnostici zaraznih bolesti, kao i u medicinskim, farmakološkim i istraživanjima higijene životne sredine. Osim toga, LAMP metoda je pogodna za pripremu uzoraka za sekvenciranje DNK Sangerovom metodom ili pirosekvenciranjem [26]. Najvažnije razlike između PCR i LAMP metoda su sumirane u **Tabeli 2**.

	LAMP	PCR ili qPCR
<b>Priprema uzorka</b>	Ne zahteva prethodnu pripremu uzoraka	Zahteva/ju prethodnu pripremu uzoraka
<b>Amplifikacija</b>		
Enzim	$\beta$ st DNK polimeraza Autocikličirajuća DNK amplifikacija Izotermalni uslovi (60 °C-65 °C)	$\gamma$ q DNK polimeraza Zahteva ciklični termostat (95 °C/55 °C/72 °C)
Početnice	Četiri (ili šest)	Dve (plus jedna ili više proba qPCR)
Ostale komponente	dNTP, pufer, Mg <sup>2+</sup> , voda	dNTP, pufer, Mg <sup>2+</sup> , voda
<b>Detekcija</b>	Gel-elektroforeza, turbidimetrijski, golim okom, kolorimetrijski, fluorescencija, bioluminescencija itd.  Moguće je vizuelno detektovati proizvode reakcije (turbidimetrijski i sl.)	Gel-elektroforeza, fluorescencija (qPCR)  Nemoguće je direktno vizuelno detektovati produkte reakcije
<b>Vreme trajanja reakcije</b>	Brza metoda. Obično traje < 30 min	Sporija metoda. Obično traje > 1 h
<b>Tipičan prinos reakcije</b>	~ 10-20 mg	~ 0.2 mg
<b>Osetljivost na inhibitore matriksa uzoraka</b>	tolerantna	osetljiva

**Tabela 2:** Poređenje parametara LAMP metode u odnosu na klasičnu PCR (ili PCR u realnom vremenu) metodu (Prilagodjeno iz: [20,53]).

## UPOTREBA LAMP METODE U DIJAGNOSTICI SARS-CoV-2 (COVID-19)

Budući da je virus SARS-CoV-2 RNK virus, neophodno je korišćenje RT-LAMP metode tj. metode sa primenjenom reverznom transkripcijom. Prva istraživanja u oblasti upotrebe RT-LAMP metode za brže otkrivanje virusa SARS-CoV-2 započela je grupa istraživača u februaru 2020 [27]. Ova studija je izvedena pre nego što je COVID-19 dobio dimenzije pandemije, stoga nisu korišćeni stvarni klinički uzorci. Da bi se testirala RT-LAMP metoda korišćena je sintetička DNK virusnog agensa, tada nazvanog novi koronavirus (ili nCoV). U ovoj studiji dizajniran je dvostepeni LAMP (Covid-19 Penn RAMP) u zatvorenoj cevi sa kolorimetrijskom ili fluorescentnom detekcijom. Rezultati LAMP testa pokazali su deset puta veću osetljivost od konvencionalnih RT-PCR testova. U drugoj studiji [28] simulirani su uzorci pacijenata tako što je u ljudsku pljuvačku, serum, oro- i nazofaringealne briseve i uzorke urina dodavan biološki uzorak sa frakcijom nukleinske sekvence SARS-CoV-2 virusa. Studija je imala za cilj razvoj brzog skrining dijagnostičkog testa i uzorci su analizirani pomoću RT-LAMP metode. Početnice su dizajnirane na osnovu javno dostupnih podataka o SARS-CoV-2 i upoređivane sa drugim sekvencama koronavirusa. Da bi se utvrdili optimalni uslovi za RT-LAMP testirani su različiti setovi početnica, nekoliko temperaturnih opsega (55–65 °C) i različita vremena inkubacije (20–45 min). Najbolji rezultati amplifikacije postignuti su na temperaturi od 63 °C tokom 30 minuta. Specifičnost LAMP testova proverena je ispitivanjem uzoraka različitih patogena uključujući viruse, bakterije i gljivice. U sledećoj studiji [29] pokazano je da su početnice dizajnirane za RNK-zavisnu sekvencu polimeraze (RdRp sekvencu) poliproteinskog regiona „otvorenog okvira za čitanje 1ab“ (ORF1ab) virusne RNK imale veću sposobnost umnožavanja. Test je pokazao visoku specifičnost kod kliničkih uzoraka pozitivnih na nekoliko drugih poznatih respiratornih virusa.

Druge studije su ispitivale upotrebu ciljnih početnica za različite regione koji kodiraju strukturne proteine, kao što je protein šiljka kojeg kodira S gen ili protein nukleokapsida kojeg kodira N gen, odvojeno ili u kombinaciji radi postizanja što veće osetljivosti [30,31] i [32]<sup>P</sup>. Strategija ciljanja gena Nsp3 početnicom u kombinaciji sa onim početnicama koje ciljaju N i S gene, pokazala se uspešnom, ispoljivši značajne rezultate i najkraće vreme za sintezu cDNK [31]. U pomenutom radu je dobijena visoka specifičnost dizajniranih početnica i nešto manja osetljivost. Da bi poboljšali efikasnost reakcije RT-LAMP istraživači su koristili nekoliko kolorimetrijskih metoda detekcije, gde su reagensi koji menjaju boju ugrađeni u reakcionu smešu. U studiji [31] dizajnirani su i ispitivani visoko specifični RT-LAMP testovi za detekciju SARS-CoV-2. Rezultati se mogu dobiti 30 minuta posle umnožavanja. Optimizovani reakcioni uslovi kolorimetrijske terenske detekcije u opisanom radu podrazumevaju upotrebu leuko-kristalno ljubičaste boje (*engl.* LVC-leuco cristal violet). U cilju unapređenja jednostavnosti upotrebe, prenosivosti i ponovljivosti, u studiji [34]<sup>P</sup> je primenjena kombinacija 3D štampane inkubacione komore za komercijalne PCR kivete i kolorimetrijske RT-LAMP reakcije. Studija [35] je imala za cilj unapređenje i RT-LAMP testa i same vizualizacije rezultata. Dizajnirano je 6 početnica koje su specifične za N gen, a reakcioni sistem je optimizovan plazmidom pUC57 koji sadrži N sekvencu gena. Rezultati ove studije su pokazali

da RT-LAMP testovi mogu detektovati prisustvo SARS-CoV-2 virusa sa ograničenjem od  $\geq 6$  kopija po  $\mu\text{l}$  pUC57 koji sadrži N sekvencu gena. Nedavno je [36] uspešno razvijen brz ( $< 40$  min), jednostavan i precizan test koji se bazira na CRISPR-Cas12 metodi u kombinaciji sa RT-LAMP, primenjen u formatu uređaja sa lateralnim protokom (*engl.* lateral flow device). Ovaj test je nazvan SARS-CoV-2 DNA Endonuclease-Targeted CRISPR Trans Reporter (DETECTR). Prvi korak je primena RT-LAMP-a za umnožavanje RNK izolovane iz nazo/orofaringealnih uzoraka, zatim sledi detekcija virusne RNK-a posredovana Cas12 molekulom i fluorescentnim probama. Novorazvijeni test DETECTR može da pruži rezultat u roku od 30 minuta (od uzorka do rezultata) sa visokom osetljivošću (10 kopija RNK po  $\mu\text{l}$ ). Format uređaja sa lateralnim protokom je vrlo efikasan za detekciju čak i vrlo niske koncentracije virusne RNK.

Nagura-Ikeda i saradnici su radili kliničke procene performansi molekularno-dijagnostičkih testova baziranih na RT-qPCR, direktnom RT-qPCR i RT-LAMP, kao i brzog antigenskog testa za dijagnostiku SARS-CoV-2, na uzorku pljuvačke pacijenata sa potvrđenim COVID-19-om [37]. Rezultati studije su pokazali da pljuvačka pacijenata u ranoj fazi pojave simptoma predstavlja alternativnu opciju uzorka za postavljanje dijagnoze COVID-19 infekcije. Poređenje RT-qPCR testa, tri "direktna" RT-qPCR kompleta i RT-LAMP testa pokazalo je različitu osetljivost za detekciju virusne RNK, ali je zaključeno da bi svaki od ovih testova mogao da se koristi u zavisnosti od kliničke postavke, ukoliko se dobro obrati pažnja na bilo kakve lažno-negativne rezultate.

Usled nestašice zaliha kritičnih reagenasa poput nazalnih briseva, kompleta za izolaciju RNK i dr. tokom pandemije COVID-19, kao i činjenice da aktuelni konvencionalni testovi za NK doprinose samojoj nestašici, Lali i saradnici [38] su razvili brz, jednostavan, osetljiv i jeftin kolorimetrijski test koristeći RT-LAMP metodu optimizovanu na uzorcima humane pljuvačke bez koraka prečišćavanja RNK, u cilju prevazilaženja pomenutih izazova. U studiji je opisana optimizacija protokola predtretmana ispljivka i reakcionih uslova kako bi se omogućila analitički osetljiva detekcija virusa pomoću RT-LAMP metode. Takođe, testirano je i da li bi predtretman ispljivka mogao da omogući i detekciju virusa konvencionalnom RT-qPCR metodom. S tim u vezi, došlo se do zaključka da optimizovani protokol predtretmana ispljivka omogućava analitički osetljivu detekciju SARS-CoV-2 iz uzorka kako kolorimetrijskim RT-LAMP-om, tako i RT-qPCR-om, bez koraka prečišćavanja RNK. Još jedan od značajnih doprinosa ove studije jeste isticanje fleksibilnosti primene LAMP eseja korišćenjem tri načina očitavanja: kolorimetrija golim okom, spektrofotometrija i fluorescencija u realnom vremenu. Sledeća studija bazirana na razvoju protokola za detekciju SARS-CoV-2 koji se zasniva na kolorimetrijskoj RT-LAMP metodi i ne podrazumeva korak prečišćavanja RNK jeste studija koju su izveli Ben-Assa i kolege [39]. Još jedan primer brzog, osetljivog RT-LAMP testa za dijagnostiku SARS-CoV-2 virusa koji koristi kolorimetrijsko očitavanje za samo 30 minuta i pritom je kompatibilan sa postojećim, lako dostupnim reagensima je i studija autora Rabe i Cepko [40]. Ovakav vid testa u kombinaciji sa protokolima za inaktivaciju (nukleaza i viriona) i prečišćavanje, koji su optimizovani u istoj studiji, dovodi osetljivost metode na jednu kopiju virusne RNK po mikrolitru u pojedinačnom uzorku i ima za cilj povećanje mogućnosti testiranja na SARS-CoV-2. Takođe, u još jednoj studiji [41] je razvijen RT-LAMP test za detekciju SARS-CoV-2 koji već posle 30 minuta detektuje jednu kopiju viralne RNK po reakciji. Klinička osetljivost i specifičnost ovog testa iznose 100% i njegove performanse su uporedive sa RT-qPCR-om. Da bi dodatno smanjili troškove i omogućili detekciju golim okom, autori su koristili HNB boju za kolorimetrijsku detekciju reakcije umnožavanja. Još jedna grupa autora [42] je koristila HNB kao fluorescentni reagens za detekciju prilikom razvoja vizuelnog i brzog RT-LAMP testa za detekciju SARS-CoV-2 iz „respiratornih“ uzoraka, koji pritom kao ciljni gen koristi S gen ovog virusa.

U studiji koju su izveli Sun i saradnici [43] prikazan je sistem za terensku detekciju živog virusa iz medijuma nazalnog brisa koji je integrisan sa pametnim telefonom i koristi panel konjskih respiratornih zaraznih bolesti kao model sistem za odgovarajuće ljudske bolesti, kao što je COVID-19. Specifične sekvence NK poreklom iz pet patogena umnožavane su LAMP metodom na mikrofluidičnom čipu i na završetku reakcija detektovane pomoću pametnog telefona. Već posle 30 minuta patogeni su uspešno detektovani, sa limitom detekcije koji je uporediv sa limitom konvencionalne PCR metode.

Još jedan robustan, tačan i jednostavan metod za brzu detekciju SARS-CoV-2 virusa razvijen je od strane Yu i tima [44]. Metod je baziran na RT-LAMP metodi i nosi naziv iLACO (*engl.* isothermal LAMP-based method for COVID-19) – izotermalni metod za COVID-19 baziran na LAMP-u, pri čemu je kao ciljni region odabran fragment ORF1ab gena. Interesantna stavka u ovoj studiji jeste dodatak SYBR green boje u cilju proširenja mogućnosti iLACO detekcije. Takođe, korišćen je i novi tip boje za NK, GeneFinder™ (D039 from Bridgen), koji ima poboljšan fluorescentni signal i osetljivost. Žu i saradnici [45] osmislili su test koji podrazumeva višestruko, petljom-posredovano izotermalno umnožavanje reverznom transkripcijom (*engl.* multiplex reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, mRT-LAMP) kombinovano sa biosenzorom lateralnog protoka na bazi nanočestica (*engl.* nanoparticle-based lateral flow biosensor, LFB) – mRT-LAMP-LFB, za dijagnostiku COVID-19. Korišćenjem dva seta LAMP početnica, ORF1ab gen (otvoreni okvir čitanja 1a/b) i N gen SARS-CoV-2 virusa istovremeno su umnožavani u jednoj reakcionoj tubici i detektovani, a rezultati detekcije su interpretirani pomoću LFB-a. U prisustvu početnica obeleženih sa FITC (fluoresceinom)/digoksinom i biotinom, mRT-LAMP je proizveo brojne dupleks amplikone sa vezanim FITC/digoksinom i biotinom. Amplikoni su utvrđeni pomoću LFB putem imunoreakcija (FITC/digoksin na dupleksu i anti-FITC/digoksin na test-liniji LFB-a) i bio-



tin/streptavidin interakcija (biotin na duplesku i streptavidin na nanočestici polimeraze). Nakupljanje nanočestica je dovelo do pojave karakteristične grimizne trake, što omogućava multipleks analizu ORF1ab i N gena bez instrumenata.

U radu koji je objavila grupa naučnika sa Univerziteta Oksford [46], opisana je uspešna primena RT-LAMP metode za brzu detekciju SARS-CoV-2 (u roku od 30 minuta) korišćenjem kolorimetrijskog LAMP kompleta – WarmStart™ Colorimetric LAMP 29 Master Mix (DNA & RNA) (New England Biolabs). U ove svrhe korišćeno je 16 kliničkih uzoraka nazofaringealnog brisa (osam pozitivnih i osam negativnih). Kako bi se procenio potencijal RT-LAMP-a u detekciji SARS-CoV-2 sintetisana su četiri različita seta početnica (O117, S17, N1 i N15), čije su preformanse potom testirane na sintetisanim RNK fragmentima za N gen, S gen i ORF1ab gen dobijenih *in vitro* transkripcijom. U radu je pokazano da tridesetominutna RT-LAMP reakcija ima mogućnost detekcije do 2 kopije ciljane RNK po 25 µl reakcije. Još jedan rad u kojem je pokazan veliki kapacitet RT-LAMP metode u brzom skriningu SARS-CoV-2 objavili su Džiang i kolege [47]. U ovom radu akcent je stavljen na brzinu i specifičnost ove metode koja bi, kako je u radu navedeno, mogla i do 2 puta da proširi kapacitete laboratorija za obradu kliničkih uzoraka. Primena RT-LAMP u detekciji kliničkih uzoraka je takođe pokazala visok stepen specifičnosti (99.5%) i osetljivosti (91.4%).

Radi se i na različitim poboljšanjima RT-LAMP-a za detekciju SARS-CoV-2. Na primer, rad [48] opisuje razvoj metode za smanjenje rizika od prenosne kontaminacije, poboljšanje validnosti testa uz kolorimetrijsku vizuelizaciju rezultata upotrebom HNB, dok su u radu [49] koristili sonde za razmenu fluorogenih oligonukleotidnih lanaca specifične za sekvencu, kako bi povećali brzinu i osetljivost u kolorimetrijskom RT-LAMP-u. Dao Ti i kolege [50] su evaluirali specifičnost RT-LAMP-a na kliničkim uzorcima nazofaringealnog brisa i utvrdili su da RT-LAMP testovi imaju odličnu specifičnost, uprkos manjoj osetljivosti u poređenju sa RT-PCR. Pored toga, razvili su protokol multipleksiranog sekvenciranja (LAMP - sekvenciranje) kao postupak dijagnostičke validacije za otkrivanje i beleženje ishoda RT - LAMP reakcija.

Postoje i komercijalni kompleti bazirani na RT-LAMP metodi za detekciju SARS-CoV-2 virusa – predstavljeni u **Tabeli 3**. Izdvajamo Color SARS-CoV-2 RT-LAMP Diagnostic Assay kompanije Color Health koji ima limit detekcije od 0.75 kopija viralne RNK po µl i dobio je tzv. autorizaciju za hitnu primenu (engl. emergency use authorization – EUA) od strane američke Agencije za hranu i lekove (engl. U.S: Food and Drug Administration - FDA) u maju 2020. godine [51]. AQ-TOP™ COVID-19 Rapid Detection Kit kompanije Seasun Biomaterials je još jedan kvalitativni RT-LAMP esej koji je takođe dobio EUA dozvolu od strane FDA u maju 2020 [52].

	LAMP	PCR ili qPCR
<b>Priprema uzorka</b>	Ne zahteva prethodnu pripremu uzoraka	Zahteva/ju prethodnu pripremu uzoraka
<b>Amplifikacija</b>		
Enzim	Bst DNK polimeraza Autocikličajuća DNK amplifikacija Izotermalni uslovi (60 °C-65 °C)	Taq DNK polimeraza Zahteva ciklični termostat (95 °C/55 °C/72 °C)
Početnice	Četiri (ili šest)	Dve (plus je dna ili više proba qPCR)
Ostale komponente	dNTP, pufer, Mg <sup>2+</sup> , voda	dNTP, pufer, Mg <sup>2+</sup> , voda
<b>Detekcija</b>	Gel-elektroforeza, turbidimetrijski, golim okom, kolorimetrijski, fluorescencija, bioluminescencija itd.  Moguće je vizuelno detektovati proizvode reakcije (turbidimetrijski i sl.)	Gel-elektroforeza, fluorescencija (qPCR).  Nemoguće je direktno vizuelno detektovati proizvode reakcije
<b>Vreme trajanja reakcije</b>	Brza metoda: Obično traje < 30 min	Sporija metoda: Obično traje > 1 h
<b>Tipičan prinos reakcije</b>	~ 10-20 mg	~ 0.2 mg
<b>Osetljivost na inhibitore matriksa uzoraka</b>	tolerantna	osetljiva

Tabela 3: Pregled komercijalnih LAMP testova za detekciju SARS-CoV-2 virusa

## ZAKLJUČAK

U preglednom radu su predstavljeni osnovni mehanizam, dizajn početnica i procedure izvođenja **izotermalne amplifikacije posredovane petljom** (engl. loop-mediated isothermal amplification, **LAMP**), sa posebnim akcentom na primenu LAMP metode za detekciju SARS-CoV-2 virusa, kao i na poređenje parametara LAMP metode sa PCR metodom kao

„zlatnim standardom“. Iz prikazanih radova se može zaključiti da je LAMP metoda značajno pristupačniji način testiranja na terenu, zahvaljujući tome što ne zahteva prethodnu pripremu uzoraka, manje je osetljiva na inhibitore prisutne u uzorcima, izvodi se na konstantnoj temperaturi i zbog toga je pogodna za minijaturizaciju procesa u vidu korišćenja mikroluidičnih uređaja i uređaja lateralnog protoka (*engl.* lateral flow device). Takođe, LAMP reakcija je brža od PCR-a, dok je princip detekcije signala značajno jednostavniji – u zavisnosti od dizajna moguće je signal očitati i golim okom (kvalitativno) ili pametnim telefonom, što značajno povećava pristupačnost za korišćenje od strane većeg broja korisnika. Pri tome LAMP poseduje komparabilan nivo specifičnosti u odnosu na PCR. Zbog svega nabrojanog, testovi bazirani na RT-LAMP metodi predstavljaju dobru i ekonomičnu alternativu za masivno testiranje na SARS-CoV-2.

## ZAHVALNICA.

Izrada ovog rada je omogućena zahvaljujući projektima iz programa Horizont 2020 Evropske unije sa brojevima ugovora 739570 (ANTARES) i 872662 (IPANEMA), kao i kroz podršku Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije – broj ugovora 451-03-68/2020-14/ 200358 za autore M. Dj, T.K i Lj.J i broj ugovora 451-03-9/2021-14/200125 za Ž.D.P.

Autori zahvaljuju Jeleni Ognjenov na pomoći u pripremi ilustracija za rad.

## LITERATURA

- Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'—3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991 Aug 15;88(16):7276–80.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (NY)*. 1992 Apr;10(4):413–7.
- Kralik P, Ricchi M. A basic guide to real time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Front Microbiol*. 2017 Feb 2;8:108.
- Clark MS, Thorne MA, Purać J, Burns G, Hillyard G, Popović ZD, et al. Surviving the cold: molecular analyses of insect cryoprotective dehydration in the Arctic springtail *Megaphorura arctica* (Tullberg). *BMC Genomics*. 2009 Jul 21;10:328.
- Purać J, Kojić D, Petri E, Popović ŽD, Grubor-Lajšić G, Blagojević DP. Cold adaptation responses in insects and other arthropods: an “omics” approach. In: Raman C, Goldsmith MR, Agunbiade TA, editors. *Short views on insect genomics and proteomics*. Cham: Springer International Publishing; 2016. p. 89–112.
- Popović ŽD, Subotić A, Nikolić TV, Radojičić R, Blagojević DP, Grubor-Lajšić G, et al. Expression of stress-related genes in diapause of European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hbn.). *Comp Biochem Physiol B, Biochem Mol Biol*. 2015 Aug;186:1–7.
- Yodmuang S, Gadjanski I, Chao PG, Vunjak-Novakovic G. Transient hypoxia improves matrix properties in tissue engineered cartilage. *J Orthop Res*. 2013 Apr;31(4):544–53.
- Yodmuang S, Marolt D, Marcos-Campos I, Gadjanski I, Vunjak-Novakovic G. Synergistic effects of hypoxia and morphogenetic factors on early chondrogenic commitment of human embryonic stem cells in embryoid body culture. *Stem Cell Rev and Rep*. 2015 Apr;11(2):228–41.
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem*. 2009 Apr;55(4):611–22.
- Kim D, Lee J-Y, Yang J-S, Kim JW, Kim VN, Chang H. The Architecture of SARS-CoV-2 Transcriptome. *Cell*. 2020 May 14;181(4):914–921.e10.
- van Kasteren PB, van der Veer B, van den Brink S, Wijsman L, de Jonge J, van den Brandt A, et al. Comparison of seven commercial RT-PCR diagnostic kits for COVID-19. *J Clin Virol*. 2020 Jul;128:104412.
- Banko A, Petrovic G, Miljanovic D, Loncar A, Vukcevic M, Despot D, et al. Comparison and Sensitivity Evaluation of Three Different Commercial Real-Time Quantitative PCR Kits for SARS-CoV-2 Detection. *Viruses*. 2021 Jul 8;13(7):1321.
- Eiken Chemical Co. Ltd. [ Eiken GENOME SITE ] - The principle of LAMP method [Internet]. 2005 [cited 2021 Jul 12]. Available from: <http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/primer.html>
- Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res*. 2000 Jun 15;28(12):63e–63.
- Vidic J, Vizzini P, Manzano M, Kavanaugh D, Ramarao N, Zivkovic M, et al. Point-of-Need DNA Testing for Detection of Foodborne Pathogenic Bacteria. *Sensors (Basel)*. 2019 Mar 4;19(5).
- Wan L, Gao J, Chen T, Dong C, Li H, Wen Y-Z, et al. LampPort: a handheld digital microfluidic device for loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Biomed Microdevices*. 2019 Jan 7;21(1):9.
- 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 Jun 16;12:240.
- Welter M, Marx A. Combining the Sensitivity of LAMP and Simplicity of Primer Extension via a DNA-Modified Nucleotide. *Chemistry*. 2020 May 14;2(2):490–8.
- Chander Y, Koelbl J, Puckett J, Moser MJ, Klingele AJ, Liles MR, et al. A novel thermostable polymerase for RNA and DNA loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Front Microbiol*. 2014 Aug 1;5:395.
- Yang Q, Domesle KJ, Ge B. Loop-Mediated Isothermal Amplification for Salmonella Detection in Food and Feed: Current Applications and Future Directions. *Foodborne Pathog Dis*. 2018 Jun;15(6):309–31.
- Esmatabadi M javad D, Bozorgmehr A, zadeh HM, Bodaghabadi N, Farhangi B, Babashah S, et al. Techniques for Evaluation of LAMP Amplicons and their Applications in Molecular Biology. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015 Dec 3;16(17):7409–14.



22. Deng H, Gao Z. Bioanalytical applications of isothermal nucleic acid amplification techniques. *Anal Chim Acta*. 2015 Jan 1;853:30–45.
23. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc*. 2008;3(5):877–82.
24. Goto M, Honda E, Ogura A, Nomoto A, Hanaki K-I. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxy naphthol blue. *BioTechniques*. 2009 Mar;46(3):167–72.
25. Seyrig G, Stedtfeld RD, Tourlousse DM, Ahmad F, Towery K, Cupples AM, et al. Selection of fluorescent DNA dyes for real-time LAMP with portable and simple optics. *J Microbiol Methods*. 2015 Dec;119:223–7.
26. Niessen L. Current state and future perspectives of loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based diagnosis of filamentous fungi and yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015 Jan;99(2):553–74.
27. El-Tholoth M, Bau HH, Song J. A Single and Two-Stage, Closed-Tube, Molecular Test for the 2019 Novel Coronavirus (COVID-19) at Home, Clinic, and Points of Entry. 2020 Feb 19;
28. Lamb LE, Bartolone SN, Ward E, Chancellor MB. Rapid detection of novel coronavirus/Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *PLoS One*. 2020 Jun 12;15(6):e0234682.
29. Lu R, Wu X, Wan Z, Li Y, Jin X, Zhang C. A Novel Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Rapid Detection of SARS-CoV-2. *Int J Mol Sci*. 2020 Apr 18;21(8).
30. Yan C, Cui J, Huang L, Du B, Chen L, Xue G, et al. Rapid and visual detection of 2019 novel coronavirus (SARS-CoV-2) by a reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay. *Clin Microbiol Infect*. 2020 Jun;26(6):773–9.
31. Park G-S, Ku K, Beak S-H, Kim SJ, Kim SI, Kim B-T, et al. Development of Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assays Targeting SARS-CoV-2. *BioRxiv*. 2020 Mar 12;
32. Butt AM, Siddique S, An X, Tong Y. Development of a dual-gene loop-mediated isothermal amplification (LAMP) detection assay for SARS-CoV-2: A preliminary study. *medRxiv*. 2020 Apr 11;
33. Vabret N, Samstein R, Fernandez N, Merad M, Sinai Immunology Review Project, Trainees, et al. Advancing scientific knowledge in times of pandemics. *Nat Rev Immunol*. 2020 Jun;20(6):338.
34. Gonzalez-Gonzalez E, Lara-Mayorga IM, Garcia-Rubio A, Garciamendez-Mijares CE, Guerra-Alvarez GE, Garcia-Martinez G, et al. Scaling diagnostics in times of COVID-19: Rapid prototyping of 3D-printed water circulators for Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) and detection of SARS-CoV-2 virus. *medRxiv*. 2020 Apr 14;
35. Wang D. One-pot Detection of COVID-19 with Real-time Reverse-transcription Loop-mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assay and Visual RT-LAMP Assay. *BioRxiv*. 2020 Apr 22;
36. Broughton JP, Deng X, Yu G, Fasching CL, Servellita V, Singh J, et al. CRISPR-Cas12-based detection of SARS-CoV-2. *Nat Biotechnol*. 2020 Jul;38(7):870–4.
37. Nagura-Ikeda M, Imai K, Tabata S, Miyoshi K, Murahara N, Mizuno T, et al. Clinical Evaluation of Self-Collected Saliva by Quantitative Reverse Transcription-PCR (RT-qPCR), Direct RT-qPCR, Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification, and a Rapid Antigen Test To Diagnose COVID-19. *J Clin Microbiol*. 2020 Aug 24;58(9).
38. Lalli MA, Langmade JS, Chen X, Fronick CC, Sawyer CS, Burcea LC, et al. Rapid and Extraction-Free Detection of SARS-CoV-2 from Saliva by Colorimetric Reverse-Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification. *Clin Chem*. 2021 Jan 30;67(2):415–24.
39. Ben-Assa N, Naddaf R, Gefen T, Capucha T, Hajjo H, Mandelbaum N, et al. SARS-CoV-2 On-the-Spot Virus Detection Directly From Patients. *medRxiv*. 2020 Apr 27;
40. Rabe BA, Cepko C. SARS-CoV-2 detection using isothermal amplification and a rapid, inexpensive protocol for sample inactivation and purification. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2020 Sep 29;117(39):24450–8.
41. Lau YL, Ismail I, Mustapa NI, Lai MY, Tuan Soh TS, Hassan A, et al. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of SARS-CoV-2. *PeerJ*. 2020 Jun 3;8:e9278.
42. Hu X, Deng Q, Li J, Chen J, Wang Z, Zhang X, et al. Development and Clinical Application of a Rapid and Sensitive Loop-Mediated Isothermal Amplification Test for SARS-CoV-2 Infection. *mSphere*. 2020 Aug 26;5(4).
43. Sun F, Ganguli A, Nguyen J, Brisbin R, Shanmugam K, Hirschberg DL, et al. Smartphone-based multiplex 30-minute nucleic acid test of live virus from nasal swab extract. *Lab Chip*. 2020 May 5;20(9):1621–7.
44. Yu L, Wu S, Hao X, Dong X, Mao L, Pelechano V, et al. Rapid Detection of COVID-19 Coronavirus Using a Reverse Transcriptional Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Diagnostic Platform. *Clin Chem*. 2020 Jul 1;66(7):975–7.
45. Zhu X, Wang X, Han L, Chen T, Wang L, Li H, et al. Multiplex reverse transcription loop-mediated isothermal amplification combined with nanoparticle-based lateral flow biosensor for the diagnosis of COVID-19. *Biosens Bioelectron*. 2020 Oct 15;166:112437.
46. Huang WE, Lim B, Hsu C-C, Xiong D, Wu W, Yu Y, et al. RT-LAMP for rapid diagnosis of coronavirus SARS-CoV-2. *Microb Biotechnol*. 2020 Jul;13(4):950–61.
47. Jiang M, Pan W, Arasthrer A, Fang W, Ling L, Fang H, et al. Development and Validation of a Rapid, Single-Step Reverse Transcriptase Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) System Potentially to Be Used for Reliable and High-Throughput Screening of COVID-19. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Jun 16;10:331.
48. Kellner MJ, Ross JJ, Schnabl J, Dekens MPS, Heinen R, Tanner NA, et al. Scalable, rapid and highly sensitive isothermal detection of SARS-CoV-2 for laboratory and home testing. *BioRxiv*. 2020 Jun 23;
49. Bhadra S, Riedel TE, Lakhotia S, Tran ND, Ellington AD. High-surety isothermal amplification and detection of SARS-CoV-2, including with crude enzymes. *BioRxiv*. 2020 Apr 14;
50. Dao Thi VL, Herbst K, Boerner K, Meurer M, Kremer LP, Kirrmaier D, et al. A colorimetric RT-LAMP assay and LAMP-sequencing for detecting SARS-CoV-2 RNA in clinical samples. *Sci Transl Med*. 2020 Aug 12;12(556).
51. FDA. EMERGENCY USE AUTHORIZATION (EUA) SUMMARY FOR THE COLOR SARS-COV-2 RT-LAMP DIAGNOSTIC ASSAY. FDA; 2020 Mar.
52. SeaSun Biomaterials. AQ-TO P™ COVID-19 Rapid Detection Kit . FDA; 2020 May.
53. Rockweiler T. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) Primer Design and Assay Optimization. Lucigen Webinar; 2018.



**NOBELOVA NAGRADA ZA HEMIJU:**  
CRISPR/Cas9 tehnologija za editovanje genoma

**THE NOBEL PRIZE IN CHEMISTRY:**  
CRISPR/Cas9 genome editing



## IMPRESUM

### Trendovi u molekularnoj biologiji, 2021.

Izdavač

**Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,  
Univerzitet u Beogradu**

Uređivački odbor

Dr **Sonja Pavlović**, naučni savetnik,  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo  
Univerzitet u Beogradu

Dr **Jelena Begović**, naučni savetnik,  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo  
Univerzitet u Beogradu

Prof. dr **Ivana Novaković**, redovni profesor,  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Prof. dr **Dužanka Savić Pavićević**, redovni profesor,  
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Ana Đorđević**, naučni savetnik,  
Univerzitet u Beogradu Institut za biološka istraživanja  
„Siniša Stanković“

Recenzenti

Dr **Svetlana Radović**, redovni profesor,  
Biološki fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Vesna Škodrić Trifunović**, redovni profesor,  
Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

Dr **Gordana Nikčević**, naučni savetnik,  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo  
Univerzitet u Beogradu

Dizajn i izrada korica

**Ivan Strahinić**

Štampa

**Curent Print**, Beograd

Periodičnost izlaza publikacije

**Godišnje**

Tiraž

**200 primeraka**

### Autori

Anđelković Marina .....	71
Arsić Aleksandra.....	152
Bosnić Dragana .....	180
Djusalov Mila .....	21
Đorić Ilona .....	133
Gadjanski Ivana .....	21
Gašić Vladimir .....	113
Išić Denčić Tijana .....	96
Janjušević Ljiljana .....	21
Janković Miljuš Jelena .....	133
Janković Radmila .....	96
Jovčić Branko .....	166
Keckarević Dušan .....	54
Keckarević Marković Milica .....	54
Kecmanović Miljana .....	54
Knežić Teodora .....	21
Kojadinović Milica .....	152
Kokanov Nikola .....	123
Komazec Jovana .....	84
Kosijer Petar .....	21
Kotur Nikola .....	6
Kožik Bojana .....	123
Krajnović Milena .....	123
Malešević Milka .....	166
Nikolić Dragana .....	180
Panić Marko .....	33
Perić Stojan .....	60
Pešović Jovan .....	60
Popović D. Željko .....	21
Radenković Lana .....	60
Rakićević Ljiljana .....	146
Rakočević-Stojanović Vidosava .....	60
Ristić Nina .....	96
Samardžić Jelena .....	180
Savić-Pavićević Dužanka .....	60
Šelemetjev Sonja .....	133
Skakić Anita .....	42
Spasovski Vesna .....	107
Stanković Biljana .....	6
Stojiljković Maja .....	42
Tošić Nataša .....	113
Ugrin Milena .....	84
Vreća Miša .....	107
Zukić Branka .....	6

CIP - Каталогизacija y publikaciji  
Народна библиотека Србије, Београд

577.2

**TRENDOVI u molekularnoj biologiji** = Trends in  
Molecular Biology. - 2021, br. 1 (sep.)- . - Beograd :  
Institut za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo,  
2021- (Beograd : Curent Print). - 28 cm

Godišnje. - Tekst na srp. i engl. jeziku.  
ISSN 2787-2947 = Trendovi u molekularnoj biologiji  
COBISS.SR-ID 45105929