

DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-29-40

УДК 616.98:579.842.23

К.А. Никифоров

Современные молекулярно-генетические методы и перспективы их применения для индикации и идентификации штаммов *Yersinia pestis*

ФКУН «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация

В обзоре представлен анализ литературных данных, посвященных применению разнообразных современных молекулярно-генетических методов для проведения индикации и идентификации штаммов *Yersinia pestis*, обладающих разными свойствами и степенью вирулентности, что обусловлено разнообразными природными условиями, в которых они циркулируют. Методы рассмотрены и с позиции перспективности их применения на трех уровнях (территориальном, региональном и федеральном) системы лабораторной диагностики инфекционных болезней в организациях Роспотребнадзора, для решения задачи поддержания санитарно-эпидемиологического благополучия населения страны. Рассмотрены основные группы методов: основанные на анализе длин рестрикционных фрагментов (рибо- и IS-типирование, пульс-гельэлектрофорез); основанные на анализе специфических фрагментов (DFR-типирование, VNTR-типирование); основанные на секвенировании (MLST, CRISPR-анализ, SNP-анализ); ПЦР-методы (включая IPCR, SPA); методы изотермической амплификации (LAMP, HDA, RPA, SEA, PCA, SHERLOCK); ДНК-чипы; методы, использующие технологию аптамеров; био- и наносенсоры; ДНК-оригами; методы на основе нейронных сетей. В результате проведенного анализа можно сделать вывод о стремительном развитии молекулярной диагностики и генетики, которое направлено на повышение оперативности, многофакторности и упрощение применения с отсутствием необходимости в дорогостоящем оборудовании и высококвалифицированных кадрах для проведения анализа. На всех уровнях системы лабораторной диагностики инфекционных болезней в организациях Роспотребнадзора возможно использование методов, основанных на ПЦР, изотермической амплификации, SHERLOCK, биосенсорах, малогабаритных приборах для секвенирования. На территориальном уровне в противочумных станциях перспективным является использование иммуно-ПЦР и SPA для проведения индикации *Y. pestis*. На региональном уровне многообещающим выглядит внедрение технологий, основанных на использовании аптамеров и ДНК-чипах. Для федерального уровня перспективно применение методов ДНК-оригами и новых технологий полногеномного секвенирования в рамках выполнения расширенной идентификации, молекулярного типирования и секвенирования геномов штаммов возбудителя чумы.

Ключевые слова: возбудитель чумы, молекулярно-генетические методы.

Корреспондирующий автор: Никифоров Константин Алексеевич, e-mail: rusrapi@microbe.ru.

Для цитирования: Никифоров К.А. Современные молекулярно-генетические методы и перспективы их применения для индикации и идентификации штаммов *Yersinia pestis*. Проблемы особо опасных инфекций. 2022; 4:29–40. DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-29-40.

Поступила 05.07.2022. Принята к публ. 01.08.2022.

К.А. Nikiforov

Advanced Molecular-Genetic Methods and Prospects for Their Application for the Indication and Identification of *Yersinia pestis* Strains

Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe", Saratov, Russian Federation

Abstract. The review provides an analysis of the literature data on the use of various modern molecular-genetic methods for the indication and identification of *Yersinia pestis* strains with different properties and degree of virulence, which is caused by the diverse natural conditions in which they circulate. The methods are also considered from the perspective of their promising application at three levels (territorial, regional and federal) of the system for laboratory diagnosis of infectious diseases at the premises of Rospotrebnadzor organizations to solve the problem of maintaining the sanitary and epidemiological well-being of the country's population. The main groups of methods considered are as follows: based on the analysis of the lengths of restriction fragments (ribo- and IS-typing, pulse gel electrophoresis); based on the analysis of specific fragments (DFR typing, VNTR typing); based on sequencing (MLST, CRISPR analysis, SNP analysis); PCR methods (including IPCR, SPA); isothermal amplification methods (LAMP, HDA, RPA, SEA, PCA, SHERLOCK); DNA-microarray; methods using aptamer technology; bio- and nano-sensors; DNA origami; methods based on neural networks. We can conclude that the rapid development of molecular diagnostics and genetics is aimed at increasing efficiency, multi-factorial approaches and simplifying the application of techniques with no need for expensive equipment and highly qualified personnel for analysis. At all levels of the system for laboratory diagnosis of infectious diseases at the Rospotrebnadzor organizations, it is possible to use methods based on PCR, isothermal amplification, SHERLOCK, biosensors, and small-sized sequencing devices. At the territorial level, at plague control stations, the use of immuno-PCR and SPA for the indication of *Y. pestis* is viable. At the regional level, introduction of the technologies based on the use of aptamers and DNA chips looks promising. For the federal level, the use of DNA origami methods and new technologies of whole genome sequencing is a prospect within the framework of advanced identification, molecular typing and sequencing of the genomes of plague agent strains.

Key words: plague agent, molecular-genetic methods.

Conflict of interest: The authors declare no conflict of interest.

Corresponding author: Konstantin A. Nikiforov, e-mail: rusrap@microbe.ru.

Citation: Nikiforov K.A. Advanced Molecular-Genetic Methods and Prospects for Their Application for the Indication and Identification of *Yersinia pestis* Strains. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2022; 4:29–40. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2022-4-29-40
Received 05.07.2022. Accepted 01.08.2022.

Nikiforov K.A., ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4115-9486>

Важнейшими составляющими обеспечения санитарно-эпидемиологического благополучия населения страны являются санитарная охрана территории Российской Федерации, государственный санитарно-эпидемиологический надзор и меры по его совершенствованию, предупреждение и ликвидация чрезвычайных ситуаций (ЧС) санитарно-эпидемиологического характера и обеспечение биологической безопасности [1]. В текущих социально-экономических и геополитических реалиях чума является одной из актуальных угроз международному санитарно-эпидемиологическому благополучию населения [2].

В соответствии с усовершенствованной внутривидовой классификацией, основанной на данных полногеномного секвенирования, вид *Yersinia pestis* образован семью подвидами: основным и шестью неосновными (тибетский, кавказский, ангольский, центральноазиатский, цинхайский, улегейский). Центральноазиатский подвид состоит из четырех биоваров: алтайского, гиссарского, таласского и *microtus* [3–5]. Штаммы основного подвида отличаются высокой вирулентностью и эпидемической значимостью и делятся на три биовара: античный, средневековый и восточный, – с возможным выделением четвертого биовара – *intermedium*. Штаммы античного биовара формируют несколько ветвей эволюции. Древняя ветвь античного биовара 0.ANT дала начало другим античным ветвям: 1.ANT, 2.ANT, 3.ANT, 4.ANT. Линия 1.ANT является предковой по отношению к штаммам группы *intermedium* (1.IN) и восточного биовара (1.ORI), а эволюция линии 2.ANT привела к появлению средневекового биовара (2.MED) [6].

В соответствии с трехуровневой системой лабораторной диагностики инфекционных болезней, регламентированной приказами Роспотребнадзора от 17.03.2008 № 88 и от 01.12.2018 № 116, к территориальному уровню относятся лаборатории центров гигиены и эпидемиологии и их филиалов, противочумных станций и противочумных отделений, к региональному – лаборатории центров индикации и диагностики возбудителей инфекционных болезней, региональных центров по мониторингу за возбудителями I–II и II–IV групп патогенности, к федеральному – лаборатории национальных центров верификации диагностической деятельности, референс-центров по мониторингу за возбудителями инфекционных болезней, в том числе с функциями в рамках Международных медико-санитарных правил. В лабораториях территориального уровня осуществляют индикацию возбудителя с использованием зарегистрированных диагностических

препаратов; на уровне лабораторий регионального уровня проводится подтверждение и идентификация возбудителей; а на федеральном уровне выполняют расширенную идентификацию, молекулярное типирование и секвенирование генома штаммов возбудителя чумы.

В молекулярно-генетической диагностике *Y. pestis* можно выделить следующие этапы: индикация, идентификация и внутривидовая дифференциация штаммов. Первостепенной задачей при поступлении материала на исследование является индикация, подтверждение наличия возбудителя, относимого к виду *Y. pestis*. Решение этой задачи в настоящее время возможно на уровне эпидотряда, развернутого в природном очаге чумы, или на уровне противочумной станции. Следующей задачей является подтверждение, идентификация найденного штамма. Это можно осуществить в лабораториях регионального уровня. Внутривидовая дифференциация и молекулярное типирование штаммов *Y. pestis* с определением принадлежности к определенной филогенетической линии и выяснением возможного места происхождения проводится в научно-исследовательских противочумных институтах федерального уровня.

Широкое использование методов молекулярно-генетической диагностики в системе эпидемиологического надзора за чумой помимо определения принадлежности штамма к той или иной филогенетической линии позволяет оптимизировать и эпидемиологическую диагностику в части слежения за ходом развития эпидемического процесса на территории, дает возможность получения дополнительных сведений о циркуляции штаммов *Y. pestis* с определением источника инфекции, путей и факторов заражения, оперативной корректировки работы зоо групп и эпидотрядов, проведения комплекса профилактических мероприятий.

В настоящее время разработано большое число молекулярно-генетических методов, которые могут быть использованы для индикации, идентификации и внутривидовой дифференциации штаммов возбудителя чумы. **Целью** данной работы стало проведение анализа литературных данных по современным молекулярно-генетическим методам с возможностью их применения на том или ином уровне системы лабораторной диагностики инфекционных болезней РФ применительно к решению задачи по поддержанию санитарно-эпидемиологического благополучия населения страны. Условно все молекулярно-генетические методы можно разделить на методы анализа длин рестрикционных фрагментов; методы типирования на основе специфических фрагментов; методы, базирующиеся на секвенировании;

ПЦР-методы; методы изотермической амплификации; ДНК-чипы; методы, использующие технологию аптамеров; био- и наносенсоры; ДНК-оригами.

Методы анализа длин рестриционных фрагментов (RFLP). К этим методам относятся рибо- и IS-типирование, пульс-гельэлектрофорез. В настоящее время эти методы практически не используются, что связано с их громоздкостью и низкой разрешающей способностью.

Методы типирования на основе специфических фрагментов

Метод DFR-типирования (different region analysis – анализ различных регионов). Метод основан на анализе наличия или отсутствия DFR (в геноме *Y. pestis* их 23). Используя DFR, можно дифференцировать некоторые подвиды и популяции штаммов [7]. Однако анализ DFR не обладает высокой дифференцирующей способностью, а также отличается громоздкостью, что делает DFR-типирование ограниченно применимым к решению вопросов филогеографии и молекулярной эпидемиологии *Y. pestis*.

Метод анализа переменного числа тандемных повторов (VNTR – variable number tandem repeats). Метод обладает высокой дискриминирующей способностью в отношении возбудителя чумы. VNTR-типирование основано на анализе разницы в размере и копийности VNTR-локусов. Примером VNTR-типирования штаммов возбудителя чумы может служить использование 25 локусов (MLVA 25) с применением метода капиллярного или гельэлектрофореза [8] и 43 локусов с применением капиллярного электрофореза. Также разработана третья система MLVA, включающая 14+12 VNTR, которая по способности дифференцировать штаммы чумы показывает результаты, согласующиеся с результатами SNPs-анализа [9].

Метод VNTR-типирования может использоваться для анализа штаммов *Y. pestis*, выделенных во время одной вспышки чумы, однако имеет ограниченную эффективность для филогенетического анализа из-за высокой скорости мутирования VNTR-локусов.

Методы, основанные на секвенировании

MLST (multilocus sequence typing – мультилокусное секвенс-типирование). Этот метод основан на анализе фрагментов нескольких генов «домашнего хозяйства», расположенных так, чтобы они не были сцеплены друг с другом [10]. С помощью этого метода возможно проведение дифференциации *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* и ряда подвидов *Y. pestis*.

Благодаря значительному снижению стоимости проведения полногеномного секвенирования предложен новый подход для проведения MLST в рамках молекулярно-эпидемиологических исследований – полногеномный MLST (wgMLST), использующий различные типы нуклеотидных различий (SNP, VNTR и INDEL) в открытых рамках считывания (ORF) организма, что значительно расширяет диф-

ференцирующие возможности [11]. Преимуществом wgMLST является низкая вычислительная мощность компьютера, необходимого для проведения анализа. Недостатками метода wgMLST являются недостаточно высокая точность получаемых результатов, а также необходимость проведения анализа высококвалифицированным специалистом.

CRISPR-анализ (clustered regularly interspaced short palindromic repeats – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами). В CRISPR-анализе используют последовательности повторяющихся элементов CRISPR (кластерные регулярно разделенные короткие палиндромные повторы, состоящие из прямых повторов длиной 21–37 п.н., разделенных спейсерами) [12]. В геноме *Y. pestis* присутствуют три CRISPR-области: YPa, YPb и YPc. CRISPR-анализ как инструмент для внутривидовой дифференциации штаммов *Y. pestis* не обладает высокой разрешающей способностью и при этом характеризуется дороговизной и достаточно продолжительным временем, необходимым для получения результата.

Таким образом, методы VNTR-, MLST- и CRISPR-анализа могут быть использованы в рамках научно-исследовательской деятельности противочумных институтов РФ при проведении молекулярно-генетических исследований штаммов возбудителя чумы и для молекулярной экспертизы случаев чумы.

Полногеномное секвенирование и SNP-анализ. Полногеномное секвенирование считается одним из самых эффективных методов молекулярного типирования и применяется как для анализа современных штаммов, так и для реконструкции древних геномов *Y. pestis* [13]. Суть метода заключена в исследовании эволюционного порядка дивергенции геномов путем сравнения их нуклеотидных последовательностей и оценки генетической дистанции между парами последовательностей, выражаемых в виде филогенетического дерева. Полногеномный SNP-анализ характеризуется высокой воспроизводимостью результатов и является эффективным инструментом для внутривидовой дифференциации штаммов чумы. Однако проведение такого анализа трудоемко, отличается высокой себестоимостью и нуждается в высокотехнологичном оборудовании и высококвалифицированных кадрах. Но в настоящее время технологии полногеномного секвенирования стремительно развиваются и существуют разработки малогабаритных приборов для секвенирования. В частности, компания Oxford Nanopore Technologies разработала прибор MinION, который можно использовать в полевых условиях и перемещать даже во время работы. Однако для проведения анализа полученного сиквенса все еще необходим высококвалифицированный специалист и мощный компьютер со специальным программным обеспечением. Кроме того, частота ошибки у прибора MinION выше, чем у стационарных секвенаторов. Но не вызывает сомнения, что эти минусы в дальнейшем будут устранены

и возможность использования полногеномного секвенирования в полевых условиях будет повсеместной.

Таким образом, в системе лабораторной диагностики инфекционных болезней Российской Федерации для решения задачи по установлению филогенетического родства штаммов возбудителя чумы и определению их принадлежности к определенным линиям эволюции, а также выяснению источника заноса при проведении эпидемиологического расследования могут быть использованы методы полногеномного секвенирования на уровне научно-исследовательских противочумных институтов.

Методы ПЦР. Одними из наиболее простых, быстрых и доступных методов молекулярно-генетического анализа с низкой себестоимостью являются методы ПЦР-типирования. В их основе лежит многократное копирование специфических локусов ДНК *in vitro* как результат циклического повторения температурных режимов. В литературе имеется информация о значительном числе модификаций ПЦР для повышения ее специфичности и чувствительности: Touchdown ПЦР (ПЦР с этапом постепенного снижения температуры отжига праймеров); ПЦР с перекрывающимися праймерами, или продлением перекрывания (overlap extension PCR) – дает возможность получать длинные фрагменты ДНК, состоящие из двух разных фрагментов без рестрикции и лигирования [14]; метилспецифичная ПЦР (methylation-specific PCR) – применяется, чтобы понять, метилирован ли определенный участок ДНК по цитозину, что позволяет определить, принадлежит ли ДНК живой клетке [15]; «холодная» ПЦР (COLD-PCR – CO-amplification at Lower Denaturation temperature-PCR) – эффективна, когда необходимо обнаружить, однонуклеотидную мутацию гена, но при этом проба содержит ДНК-матрицу как с мутантным геном, так и с геном дикого типа (в основе «холодной» ПЦР лежит тот факт, что замена даже одного нуклеотида в одной из цепей ДНК-фрагмента приводит к изменению его температуры плавления, в результате подбора критической температуры денатурации эффективность ПЦР резко падает из-за малого числа денатурированных матриц) [16]; цифровая ПЦР (digital PCR) – точный и воспроизводимый метод количественного определения ДНК. При проведении цифровой ПЦР пробу делят на большое количество маленьких субъединиц (компарментов) и проводят ПЦР в каждой из них отдельно. Этот метод обладает большей точностью, чем ПЦР-РВ, при этом он дороже и более трудоемок, но, возможно, в будущем получит большее распространение. В настоящее время работы в этом направлении активно ведутся, в частности компанией Bio-Rad разработана система QX200 для одновременного проведения высокоточной цифровой ПЦР у 96 образцов.

Однако на современном этапе своего развития большинство из этих методов ПЦР-типирования характеризуются громоздкостью, относительно низкой межлабораторной воспроизводимостью и низкой

разрешающей способностью для проведения внутривидовой дифференциации *Y. pestis*.

Одним из самых эффективных, быстрых и точных вариантов ПЦР с возможностью одновременной детекции нескольких ДНК-локусов является ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Высокой специфичностью и низким уровнем фонового свечения красителей характеризуется способ применения олигонуклеотидных зондов с ковалентно связанными с ними флуоресцентными красителями на 5'-конце и гасителями флуоресценции на 3'-конце (TaqMan-зонды) [17]. К настоящему времени разработано множество вариантов зондов для детекции ампликонов в ПЦР-РВ. Одним из таких способов является использование праймер-зондов «Скорпион», имеющих две метки по типу «шпилька – петля» из-за комплементарной последовательности на 5'- и 3'-конце. Использование праймер-зондов «Скорпион» повышает точность детекции, гарантируя практически полное отсутствие фонового свечения [18]. Еще одним вариантом детекции ампликонов в ПЦР-РВ является FRET (Fluorescence resonance energy transfer), принцип которого заключен в использовании двух зондов, разделенных друг от друга 1–3 нуклеотидами [19]. Также разработан вариант ПЦР-РВ с использованием зондов с комплементарными концевыми последовательностями (molecular beacons) [20].

ПЦР-РВ применяется для индикации, идентификации и дифференциации штаммов возбудителя чумы с использованием хромосомных и плазмидных мишеней. В Российской Федерации зарегистрированы следующие наборы реагентов: «Набор реагентов для ускоренной идентификации штаммов *Y. pestis* методом мультилокусной ПЦР с гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени (Ген *Y. pestis* идентификация – РГФ)», «ГенПест-подвид/алтай-РГФ» производства РосНИПЧИ «Микроб» [21]; «АмплиСенс *Y. pestis* – FL» производства ЦНИИ эпидемиологии; «ОМ-Скрин-Чума-РВ» производства ЗАО «Синтол».

М.С. Thomas *et al.* разработали способ детекции патогенных для человека микроорганизмов из рода *Yersinia* в образцах пищевых продуктов, сочетающий в себе мультиплексную ПЦР-РВ и пиросеквенирование для обнаружения и дифференциации патогенных иерсиний с высокой степенью достоверности [22].

Особое внимание привлекают работы, направленные на упрощение SNP-анализа путем использования для выявления полиморфных нуклеотидов амплификационных технологий. Аллель-специфическая ПЦР (АС-ПЦР) основана на использовании двух аллель-специфичных праймеров, у которых 3'-концевой нуклеотид комплементарен SNP, и третьего общего праймера [23]. Метод основан на разной эффективности элонгации спаренного и неспаренного 3'-нуклеотида Taq-полимеразой, что должно приводить к отсутствию продукта амплификации при неполной комплементарности

3'-концевого нуклеотида праймера и SNP. Но в реальности полное ингибирование реакции отмечается не всегда. Повышение точности АС-ПЦР возможно путем использования дополнительных неспаренных нуклеотидных оснований на 3'-конце праймера. Для АС-ПЦР предложен ряд вариаций, повышающих производительность, скорость анализа, а также дающих возможность количественного определения ДНК-мишени [24]. А. J. Vogler *et al.* разработали АС-ПЦР с зондами TaqMan-MGB для детекции SNPs, характерных для штаммов *Y. pestis*, выделенных на территории Северной Америки [25]. АС-ПЦР-РВ занимает меньше времени, является более экономически выгодной и чувствительной по сравнению с прямым секвенированием ДНК по Сенгеру.

Основываясь на приведенных выше фактах, становится очевидно, что ПЦР-РВ – высокоточный, быстрый и надежный метод индикации, идентификации и дифференциации штаммов чумы в исследуемом материале. В настоящее время ПЦР-РВ используется на всех уровнях системы лабораторной диагностики инфекционных болезней РФ (начиная с мобильных лабораторий СПЭБ и эпидотрядов и заканчивая противочумными институтами), что позволяет проводить быструю индикацию, идентификацию и дифференциацию штаммов *Y. pestis*.

Иммуно-ПЦР (иПЦР, IPCR). Метод разработан сотрудниками Калифорнийского университета в Беркли в 1992 г. [26]. Суть метода заключается в следующем: пробы, где проводят детекцию определенной молекулы (гормон, токсин и др.), вносят в специальные пробирки, материал которых характеризуется высокой антигенсвязывающей способностью и термостойкостью. Затем добавляют специфические антитела со связанными с ними ДНК-фрагментами длиной 150–300 п.н. После связывания антител с искомыми антигенами, иммобилизованными на стенках пробирок, осуществляют промывку. Затем в пробирки вносят смесь для ПЦР-РВ и проводят реакцию, в результате которой амплифицируются ДНК-фрагменты на антителах, связавшихся с антигенами. Как итог получают сведения о наличии антигенов и их количестве в пробе [27]. По разрешающей способности иммуно-ПЦР превосходит ИФА на 2–5 порядков и позволяет детектировать антиген при невозможности концентрирования пробы. Также иммуно-ПЦР дает возможность одновременного обнаружения множества различных антигенов, так как с ними связаны разные ДНК-фрагменты. В работе N. Malou *et al.* показано, что иммуно-ПЦР является эффективным методом для обнаружения антигенов *Y. pestis* в пробах, полученных из массовых древних захоронений людей, погибших от чумы [28]. Иммуно-ПЦР является довольно интересным и перспективным методом, который может быть использован для детекции антигенов чумы на уровне противочумных станций и институтов.

Твердофазная амплификация (SPA – solid phase amplification). Это еще один вариант ампли-

фикации ДНК, который был представлен С. Adessi *et al.* [29]. Основная идея этого метода заключается в прикреплении праймеров (через их 5'-конец) к твердой поверхности (кремнезему, гранулам полистирола). Это ограничивает амплификацию двумерными поверхностями и, следовательно, позволяет легко проводить амплификацию многих ДНК-мишеней в единой системе.

Методы изотермической амплификации – альтернативы ПЦР. В литературе имеются данные о множестве методов изотермической амплификации ДНК или РНК: системы амплификации на основе транскрипции (TAS), самоподдерживающаяся реакция репликации последовательности (3SR), амплификация на основе последовательности нуклеиновой кислоты (NASBA), амплификация со смещением цепи (SDA), репликация по вращающемуся кругу (RCR), изотермическая амплификация, опосредованная петлей (LAMP), хеликазозависимая амплификация (HDA), изотермическая амплификация с одним праймером (SPIA) и кросс-прайминг-амплификация (CPA). TAS, 3SR, NASBA, SDA, HDA и SPIA требуют нескольких ферментов (трех или более) и тщательной оптимизации. RCR, LAMP и CPA могут эффективно протекать при постоянной температуре с помощью одного фермента.

Изотермическая амплификация, опосредованная образованием петель (LAMP – loop-mediated isothermal amplification). Метод впервые описан в 2000 г. [30]. В этом методе используется *Bst*-полимераза, полученная из *Geobacillus stearothermophilus*, совмещающая полимеразную и хеликазную активности, что позволяет исключить фазу денатурации и проводить реакцию при 60–65 °С. LAMP также отличается от обычной ПЦР тем, что при ее проведении используется не одна, а две или три пары праймеров, что повышает специфичность реакции, но в то же время повышает вероятность артефактов. В исследовании R. Singh *et al.* разработали пару LAMP для быстрого обнаружения *Y. pestis*, использующих 6 праймеров, рассчитанных на гены *cafI* и участок 3а [31]. Работа J. Jin *et al.* посвящена разработке метода LAMP с микрожидкостным чипом (LAMP на чипе) для одновременного обнаружения 10 патогенных бактерий, передающихся через воду: *Campylobacter jejuni*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio alginolyticus*, *V. cholerae*, *V. parahemolyticus*, *V. vulnificus* и *Yersinia enterocolitica* [32]. Вариантом LAMP является предложенная W. Liu *et al.* [33] полимеразная спиральная реакция (PSR), требующая одну пару праймеров и один фермент. Последовательности прямого и обратного праймеров обратны друг другу на их 5'-конце, тогда как их 3'-концевые последовательности комплементарны специфическим последовательностям ДНК-мишеней. Использование LAMP дает возможность эффективной детекции *Y. pestis* с высокой чувствительностью и специфичностью в биологических

образцах человека. Метод обладает потенциалом для использования в полевых условиях во время вспышек в условиях ограниченных ресурсов.

Хеликазозависимая амплификация (HDA – helicase-dependent amplification). В 2004 г. сотрудники компании New England Biolabs (NEB) предложили еще одну альтернативу полимеразной цепной реакции – хеликазозависимую амплификацию. Авторы использовали хеликазу UvrD *Escherichia coli*, SSB-белки gp32 фага T4 и фрагмент Клёнова *exo-*. Хеликаза разделяет цепи ДНК, SSB-белки связывают и стабилизируют цепи в этом положении, а фрагмент Клёнова осуществляет синтез новой цепи ДНК. Реакция протекает при 37 °С. Предварительная денатурация ДНК при 95 °С перед ее постановкой повышает эффективность в 1,5–2 раза. В настоящее время выпускаются коммерческие наборы, содержащие вместо фрагмента Клёнова *Bst*-полимеразу, а вместо UvrD *E. coli* – термостабильную хеликазу UvrD *Thermoanaerobacter tengcongensis* (*Tte*-UvrD), что дает возможность проведения реакции при 65 °С. Недостатками этого метода являются необходимость проведения предварительной денатурации образца для получения результатов, сравнимых с результатами стандартной ПЦР, и тот факт, что максимальный размер амплифицируемого фрагмента не превышает 120 п.н. Согласно данным литературы, HDA обладает большей диагностической чувствительностью, чем LAMP. Использование же хелимеразы (особым образом сшитые *Tte*-UvrD и *Bst*-полимераза), разработанной компанией BioHelix, позволяет повысить размер амплифицируемого фрагмента до 1500 п.н.

Рекомбиназная полимеразная амплификация (РПА). Метод разработан в 2006 г. учеными из биотехнологической компании TwistDX LTD. Основным отличием РПА от обычной ПЦР является возможность протекания реакции при комнатной температуре (25 °С), однако оптимальной температурой является диапазон 37–40 °С. В РПА используются большой фрагмент *Bsu*-полимеразы, SSB-белки gp32 фага T4 и его же рекомбиназа *UvsX*. Часть молекул рекомбиназы соединяют с одним праймером, часть – с другим. Процесс протекания РПА является АТФ-зависимым, поскольку энергия требуется для освобождения 3'-конца праймера от молекул рекомбиназы. Размер амплифицируемого фрагмента ограничен тысячей пар нуклеотидов, а минимальная длина праймера должна составлять 30 нуклеотидов. Время, требуемое для проведения РПА, намного меньше, чем для стандартной ПЦР (может длиться 15–30 минут). Этот метод амплификации не обладает значительными недостатками (основным недостатком является необходимость строгого соблюдения условий реакции) и может использоваться как РПА с обратной транскрипцией и РПА в реальном времени. О. Mauboroda *et al.* использовали твердофазную РПА для оптического обнаружения *Y. pestis* [34]. Система продемонстрировала высокую специфичность.

Амплификация с обменом цепей (SEA – strand exchange amplification). SEA – это простая реакция изотермической амплификации, опосредованная «пузырьками» денатурации (небольшие по протяженности локальные участки расхождения цепей ДНК), требующая только одной пары праймеров и одной ДНК-полимеразы [35]. Метод отличается простотой и быстротой, но на современном этапе пригоден лишь для обнаружения коротких фрагментов ДНК, хотя и отличается высокой чувствительностью, то есть может быть использован лишь для первичной детекции патогена. Этот метод применялся вместе с анализом «бокового потока» (LFA) (стрип-биосенсор с сухим реагентом, методологически напоминающий ИХА-тест) для визуальной детекции нуклеиновых кислот. А метод LFA как самостоятельный метод использовался для анализа при оказании скорой медицинской помощи из-за своих преимуществ: отсутствия необходимости предварительной обработки образцов, удобства, небольшого времени на проведение анализа, относительной дешевизны и отсутствия необходимости квалифицированных специалистов и дорогостоящего оборудования. Метод LFA эффективно применялся для обнаружения белков, токсинов, нуклеиновых кислот и однонуклеотидных полиморфизмов геномной ДНК. А.А. Zasada *et al.* применили три метода изотермической амплификации ДНК: LAMP, HDA и RPA – в сочетании с методом LFA для быстрой индикации ДНК *B anthracis*, *Y. pestis* и *F. tularensis* [36]. Недостатком разработанного метода является относительно высокий риск получения ложноположительных результатов. Также в литературе есть информация о разработке быстрых и достаточно точных способов детекции *Y. pestis* методом LFA [37].

Импульсная амплификация (РСА – pulse-controlled amplification). РСА – это технология амплификации нуклеиновых кислот, использующая быстрые импульсы энергии для нагрева (с помощью металлических нагревательных элементов, встроенных непосредственно в реакцию амплификации). Нагревание и охлаждение длятся несколько микросекунд, что обеспечивает сверхбыстрое циклирование, в течение которого происходит амплификация целевой последовательности. Это снижает общее время амплификации до 10 раз, что обеспечивает получение результата за 15 минут при работе на небольшом портативном прототипе устройства. Примером перспективности использования этой технологии является разработка РСА для обнаружения ДНК *Y. pestis* [38].

SHERLOCK (specific high sensitivity enzymatic reporter unlocking). Метод сочетает преамплификацию нуклеиновых кислот с энзимологией CRISPR-Cas для распознавания специфических последовательностей ДНК или РНК. Метод основан на проведении нескольких реакций, первой из которых является рекомбиназная полимеразная амплификация, о которой написано выше. После этого смесь

олигонуклеотидов подвергается транскрипции с использованием T7 РНК-полимеразы, промотор которой находится в праймерах, использованных в РПА. В результате получается смесь нуклеиновых кислот, обогащенная молекулами РНК искомой нуклеотидной последовательности. После этого этапа используется система CRISPR-Cas: в качестве зонда используется сгРНК, часть последовательности которой комплементарна искомой нуклеотидной последовательности полинуклеотида-мишени. Образующийся РНК-дуплекс приводит к активации фермента нуклеазы – неспецифичной Cas13a. При связывании с дуплексом Cas13a неспецифично ферментирует свободные нуклеиновые кислоты и в результате достигает флуоресцентно-меченых РНК-сенсоров, в избытке находящихся в этой системе. Расщепление РНК-сенсоров детектируется флуориметром и говорит об успешности протекания реакции. Метод выглядит перспективно и многообещающе, обладает высокой специфичностью. Проведение анализа методом SHERLOCK возможно при 37 °С и для детекции не требуется наличие амплификатора для ПЦР-РВ, что говорит о перспективности его использования в полевых условиях. В литературе имеются данные о разработке SHERLOCK для детекции всех видов *Plasmodium*, вызывающих малярию у человека [39], для обнаружения вируса SARS-CoV-2 [40].

Методы изотермической амплификации представляют собой очень перспективное направление развития молекулярной диагностики, которое в будущем, возможно, полностью вытеснит стандартную ПЦР-РВ в силу своих преимуществ в виде удобства, небольшого времени на проведение анализа, относительной дешевизны и отсутствия необходимости квалифицированных специалистов и дорогостоящего оборудования, поскольку реакции идут при одной температуре. Эти методы могут быть использованы на всех уровнях системы лабораторной диагностики инфекционных болезней РФ для проведения индикации, идентификации и внутривидовой дифференциации штаммов чумы.

ДНК-чипы. Это биологические макромолекулы, расположенные на специальном носителе, способные избирательно связывать вещества, содержащиеся в анализируемом растворе. ДНК-чипы были разработаны для минисеквенирования *de novo*. С течением времени ДНК-чипы стали использовать для решения более широкого круга задач: сравнения нуклеотидных последовательностей, исследования процесса гибридизации, поиска SNPs, секвенирования, оценки стабильности вторичной структуры ДНК. Метод ДНК-чипов базируется на гибридизации ампликонов, полученных в ПЦР и несущих флуоресцентный краситель с расположенными на стекле уникальными ДНК-зондами. В литературе имеется информация о разработке биочипов отечественными и зарубежными исследователями. Например, в Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН (Москва) разработан биочип для детекции возбу-

лей натуральной оспы, сибирской язвы, гепатитов В и С, ВИЧ-1, вируса гриппа А [41]. В литературе есть сведения о разработке ДНК-чипов для выявления вируса гриппа; детекции генов антибиотикоустойчивости; для детекции и идентификации энтерогеморрагической *E. coli* O157:H7 и *V. cholerae* O139; идентификации возбудителей неонатальных заболеваний и кариотипических изменений; индикации ДНК вируса птичьего гриппа (AIV) [42]. В работе V. Srinivasan *et al.* говорится о разработке ДНК-чипа для одновременной детекции 14 бактериальных патогенов, выделяемых из воды и пищевых продуктов: *Aeromonas hydrophila*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae*, *Legionella pneumophila*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori*, *Cryptosporidium parvum*, *Mycoplasma genitalium*, *Streptococcus agalactiae* и *Proteus mirabilis* [43]. Показана эффективность использования ДНК-чипов как дополнительного инструмента (для связывания определенных ДНК-локусов перед последующим секвенированием) при проведении палеогенетических исследований.

Для детекции возбудителей особо опасных инфекций сконструировано 4 ДНК-чипа: для детекции *B. anthracis* (Affymetrix, США), *Brucella melitensis* (University of Namur, США), *V. cholerae* O1 (Nimblegen, США) и *E. coli* O157 (Agilent Technologies, США). Сконструирован ДНК-чип для индикации и идентификации штаммов по их принадлежности к виду *Y. pestis*, подвидам, биоварам, филогенетическим линиям, а также по наличию основных генов вирулентности [44].

Дальнейшее развитие и усовершенствование технологии ДНК-чипов для индикации и идентификации возбудителей особо опасных инфекций предоставит возможность расширения круга эпидемиологических задач, проведения экспресс-диагностики многих признаков в одном анализе. Кроме того, биочипы могут быть использованы для дифференциации и типирования штаммов возбудителей опасных инфекций и определения их эпидемического потенциала, что позволит повысить эффективность анализа при эпидемиологических расследованиях и определении путей распространения и заноса штаммов возбудителей. Технология ДНК-чипов может быть использована в противочумных станциях и институтах.

Аптамеры. Аптамеры – одноцепочечные молекулы ДНК или РНК, способные формировать сложную трехмерную пространственную структуру, комплементарную другим поверхностям и, следовательно, обладающую возможностью «узнавать» другие молекулы или проявлять каталитическую активность [45]. Для получения аптамеров разработан метод, получивший название SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment – систематическая эволюция лигандов путем экспоненциального обогащения) [46]. Принцип метода заключен

в отборе и воспроизведении из смеси случайных фрагментов нуклеиновых кислот, способных соединяться со специфичными молекулами-мишенями. Отбор состоит из трех стадий: случайная библиотека, содержащая значительное число коротких нуклеотидных последовательностей, способных к формированию разнообразных трехмерных структур, инкубируется с молекулой-мишенью; затем осуществляется разделение связанных и несвязанных олигонуклеотидов; после чего олигонуклеотиды, связавшиеся с мишенью, отделяются и амплифицируются. В результате формируется обогащенная библиотека, которую затем клонируют, и идентифицируют последовательности аптамеров, прошедших этот отбор. В большинстве экспериментов по подбору аптамеров используются библиотеки, содержащие олигонуклеотиды длиной 20–60 нуклеотидов.

Области применения аптамеров очень широки: изучение механизмов взаимодействия белков с нуклеиновыми кислотами: получение высокоэффективных и специфичных ингибиторов белков-мишеней, в том числе облегчая распознавание патогена иммунной системой макроорганизма; направленная доставка лекарственных препаратов; использование в ИФА, иммуно-ПЦР, биосенсорах [47], ДНК-чипах [48] и других методах молекулярно-генетической диагностики. В литературе есть данные по разработке диагностических подходов на основе аптамеров по детекции возбудителя Крымской-Конго геморрагической лихорадки [49], *Cronobacter sakazakii*, *Shigella flexneri*. Аптамеры являются функциональными аналогами моноклональных антител, но они обладают преимуществами перед антителами: получить аптамеры намного проще, дешевле и быстрее, они обладают значительно меньшим размером и, следовательно, легче проникают в ткани и клетки, могут обладать более высокой аффинностью и специфичностью. В настоящее время ведется активная работа по совершенствованию отбора аптамеров, в частности по разработке автоматизированных систем отбора аптамеров. Технология аптамеров, безусловно, является одним из перспективных направлений развития современной молекулярной диагностики и генетики и может быть использована на базе противочумных институтов РФ.

Биосенсоры. Биосенсоры – аналитические устройства, детектирующие определенные молекулы в биологических материалах и выводящие информацию об их наличии и количестве в виде электрического сигнала. Автором первого биосенсора и биосенсорной концепции как таковой является Леланд Кларк (L.C. Clark Jr.) [50] с работой о применении изобретенного им кислородного электрода, получившего затем название электрода Кларка. Наносенсоры – биологические, химические или другие сенсорные точки, передающие информацию о наночастицах на макроскопический уровень. В своей основе наносенсоры имеют квантовые точки – фрагменты проводника или полупроводника, носители

заряда которого ограничены в пространстве по всем трем измерениям [51]. Основными функциональными элементами биосенсоров являются рецептор, физический преобразователь (транздьюсер) и рабочая среда. Принцип действия базируется на взаимодействии рецептора с исследуемым материалом и последующей регистрации взаимодействия транздьюсером и преобразовании в электрический сигнал. В своей основе современные биосенсоры имеют чувствительные полимеры – материалы, способные испытывать обратимые или необратимые изменения физических свойств и/или химической структуры, взаимодействуя с внешними факторами. В зависимости от транздьюсера можно выделить пять основных типов биосенсоров: электрохимические, основанные на измерении электрического тока как результата окисления или восстановления электрохимически активных веществ (среди них выделяют амперометрические, потенциометрические, кондуктометрические и импедансометрические); пьезоэлектрические, основанные на измерении массы, плотности; калориметрические, основанные на измерении количества теплоты, выделяемой при взаимодействии анализируемого соединения с рецептором; оптические, основанные на измерении интенсивности поглощения или отражения света, люминесценции и др.; биосенсоры, основанные на поверхностном плазмонном резонансе, в своей основе имеют определение изменения показателя преломления среды. По виду детектируемых молекул биосенсоры можно разделить на геносенсоры, белковые сенсоры, иммуносенсоры и биосенсоры, детектирующие другие химические вещества. В зависимости от механизма распознавания геносенсоры можно разделить: на гибридизационные – базируются на способности одноцепочечной ДНК распознавать и специфически связываться с комплементарными ей нуклеотидными последовательностями; интеркаляционные – основаны на интеркаляции химических веществ в структуру ДНК; аптамерные – используют специфичные ДНК-аптамеры. Также в настоящее время в биосенсоры активно внедряются методы изотермической амплификации и CRISPR/Cas-системы.

В литературе описаны биосенсоры для индикации иридовирусов, норовирусов, герпесвирусов, вируса Чикунгуны, вируса Зика, вируса гриппа, некоторых онкогенов, *Listeria monocytogenes*, некоторых грибов, простейших, бактерий рода *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Vibrio parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *Clostridium tetani*, *Mycobacterium tuberculosis*, для обнаружения F1 антигена *Y. pestis* [52], бактерий рода *Yersinia* [53]. К сильным сторонам биосенсоров можно отнести высокую чувствительность и специфичность, возможность детекции органических и неорганических молекул, быстрое действие и многократное использование. Удачное сочетание скорости получения результата, стоимости, мобильности и небольшого размера делают их отличными кандидатами для работы в полевых условиях, что указывает на возможность их использования на всех уровнях

системы лабораторной диагностики инфекционных болезней РФ.

ДНК-оригами (DNA-Origami). Это технология направленного синтеза молекул ДНК, обладающих способностью к самоорганизации в заранее смоделированные объекты. Впервые о создании и использовании 3D-структур из ДНК сообщили в 1982 г. [54]. Результаты этого исследования N.C. Seeman стали основой для последующей работы P.W. Rothemund [55], в которой описан метод получения ДНК-структур с определенной формой. ДНК-оригами могут иметь несколько функциональных групп на поверхности, специфически связывающих определенную молекулу, и в результате могут быть использованы для детекции. Использование в ДНК-оригами аптамеров и иных лигандов дает возможность конструирования сенсорных биочипов и биосенсоров для выявления нуклеиновых кислот, вплоть до отдельных SNP, белков и других соединений, в том числе наноразмеров. Специфичность детекции повышается путем размещения ДНК-оригами на твердой подложке, в результате ДНК-структуры располагаются в определенном порядке в необходимой ориентации. M. Raveendran *et al.* сообщили о разработке биосенсора на основе ДНК-оригами с центральной полостью со специфичным для мишени ДНК-аптамером, который может быть использован для детекции отдельных молекул биомаркеров в клинических образцах [56]. В литературе есть данные о разработке прототипа системы для генотипирования вируса гепатита В с использованием ДНК-оригами и для детекции РНК вируса Зика [57]. Также ДНК-оригами могут быть использованы для конструирования систем доставки лекарств и для формирования наноразмерных литографических масок, а в перспективе – разработки электронных устройств на основе ДНК. Технология ДНК-оригами в настоящее время активно развивается, и ее перспективность не вызывает сомнений, в рамках системы лабораторной диагностики инфекционных болезней РФ этот метод может быть использован на уровне противочумных институтов.

Методы с использованием нейронных сетей. Нейронная сеть представляет собой математическую модель, ее программную и аппаратную реализацию, сконструированную подобно биологическим сетям нервных клеток. В настоящее время нейросети стремительно развиваются и каждый год находят применение в новых сферах деятельности: прогноз финансовых изменений, психодиагностика, хемоинформатика, нейроуправление, экономика. В работе V. Yang *et al.* предпринимается попытка использования сверточной нейронной сети (сеть морфологии молекулы – MMNet), в основе которой лежит анализ морфологических и молекулярных характеристик для разделения на отдельные виды насекомых и рыб [58]. Использование нейросетей, безусловно, обладает большим потенциалом во всех сферах человеческой деятельности, но в на-

стоящее время для решения задач биоинформационного анализа требуется дальнейшее усложнение и развитие этого метода.

В результате проведенного анализа литературных данных можно сделать вывод о стремительном развитии новых методов молекулярной диагностики и генетики. Основными направлениями этого развития являются повышение оперативности, многофакторности и упрощение использования с отсутствием необходимости в дорогостоящем оборудовании и высококвалифицированных специалистах для проведения анализа. Все многообразие современных молекулярно-генетических методов можно условно и обобщенно разделить: на методы, основанные на анализе длин рестрикционных фрагментов; методы типирования на основе специфических фрагментов; методы, основанные на секвенировании; ПЦР-методы; методы изотермической амплификации; ДНК-чипы; методы, использующие технологию аптамеров; био- и наносенсоры; ДНК-оригами. В Российской Федерации для решения задач по поддержанию санитарно-эпидемиологического благополучия населения и развитию эпидемиологического надзора путем совершенствования способов индикации, идентификации и внутривидовой дифференциации штаммов возбудителя чумы перспективным является внедрение новых технологий. На всех уровнях системы лабораторной диагностики возможно использование методов, основанных на ПЦР, изотермической амплификации, SHERLOCK, биосенсорах, малогабаритных приборах для секвенирования. На территориальном уровне на противочумных станциях перспективным выглядит использование иммуно-ПЦР и SPA для проведения индикации *Y. pestis*. На региональном уровне выглядит многообещающим внедрение технологий, основанных на использовании аптамеров, ДНК-чипов для подтверждения и идентификации *Y. pestis*. А для федерального уровня перспективно внедрение методов ДНК-оригами и стремительно развивающихся новых технологий полногеномного секвенирования в рамках выполнения расширенной идентификации, молекулярного типирования и секвенирования геномов штаммов возбудителя чумы.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы

1. Онищенко Г.Г., Смоленский В.Ю., Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Топорков В.П., Топорков А.В., Ляпин М.Н., Кутырев В.В. Концептуальные основы биологической безопасности. Часть 1. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2013; 10:4–13.
2. Онищенко Г.Г., Кутырев В.В., Кривуля С.Д., Федоров Ю.М., Топорков В.П. Стратегия борьбы с инфекционными болезнями и санитарная охрана территорий в современных условиях. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2006; 2:5–9.
3. Ерошенко Г.А., Краснов Я.М., Носов Н.Ю., Куклева Л.М., Никифоров К.А., Оглодин Е.Г., Кутырев В.В. Совершенствование подвидовой классификации *Yersinia pestis* на основе данных полногеномного секвенирования штаммов из России и сопредельных государств. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2015; 4:58–64. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-58-64.

4. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L., Nosov N.Y., Krasnov J.M., Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Al'khova Z.V., Oglodin E.G., Guseva N.P. Phylogeny and classification of *Yersinia pestis* through the lens of strains from the plague foci of Commonwealth of Independent States. *Front. Microbiol.* 2018; 9:1106. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01106.
5. Никифоров К.А., Морозов О.А., Носов Н.Ю., Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Популяционная структура, таксономия и генетические особенности штаммов *Yersinia pestis* центральноазиатского подвида. *Генетика*. 2018; 54(10):1125–35. DOI: 10.1134/S0016675818100107.
6. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., Xu L., Zhang Y., Zheng H., Qin N., Xiao X., Wu M., Wang X., Zhou D., Qi Z., Du Z., Wu H., Yang X., Cao H., Wang H., Wang J., Yao S., Rakin A., Li Y., Falush D., Balloux F., Achtman M., Song Y., Wang J., Yang R. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2013; 110(2):577–82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110.
7. Платонов М.Е., Евсеева В.В., Дентовская С.В., Анисимов А.П. Молекулярное типирование *Yersinia pestis*. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2013; 2:3–12.
8. Zhang Y., Luo T., Yang C., Yue X., Guo R., Wang X., Buren M., Song Y., Yang R., Cao H., Cui Y., Dai X. Phenotypic and molecular genetic characteristics of *Yersinia pestis* at an emerging natural plague focus, Junggar Basin, China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2018; 98(1):231–7. DOI: 10.4269/ajtmh.17-0195.
9. Wang P., Shi L., Zhang F., Guo Y., Zhang Z., Tan H., Cui Z., Ding Y., Liang Y., Liang Y., Yu D., Xu J., Li W., Song Z. Ten years of surveillance of the Yulong plague focus in China and the molecular typing and source tracing of the isolates. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(3):e0006352. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006352.
10. Nour El-Din H.T., Yassin A.S., Ragab Y.M., Hashem A.M. Phenotype-genotype characterization and antibiotic-resistance correlations among colonizing and infectious methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* recovered from intensive care units. *Infect. Drug Resist.* 2021; 14:1557–71. DOI: 10.2147/IDR.S296000.
11. Jolley K.A., Maiden M.C. Using multilocus sequence typing to study bacterial variation: prospects in the genomic era. *Future Microbiol.* 2014; 9(5):623–30. DOI: 10.2217/fmb.14.24.
12. Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) for the genotyping of bacterial pathogens. *Methods Mol. Biol.* 2009; 551:105–16. DOI: 10.1007/978-1-60327-999-4_9.
13. Spyrou M.A., Keller M., Tukhbatova R.I., Scheib C.L., Nelson E.A., Andrade Valtueña A., Neumann G.U., Walker D., Alterauge A., Carty N., Cessford C., Fetz H., Gourvenec M., Hartle R., Henderson M., von Heyking K., Inskip S.A., Kacki S., Key F.M., Knox E.L., Later C., Maheshwari-Aplin P., Peters J., Robb J.E., Schreiber J., Kivisild T., Castex D., Lösch S., Harbeck M., Herbig A., Bos K.I., Krause J. Phylogeography of the second plague pandemic revealed through analysis of historical *Yersinia pestis* genomes. *Nat. Commun.* 2019; 10(1):4470. DOI: 10.1038/s41467-019-12154-0.
14. Chen F., Ye J., Liu W., Chio C., Wang W., Qin W. Knockout of a highly GC-rich gene in *Burkholderia pyrrocinia* by recombineering with freeze-thawing transformation. *Mol. Plant Pathol.* 2021; 22(7):843–57. DOI: 10.1111/mpp.13058.
15. Yang S., Yuan Z.J., Zhu Y.H., Chen X., Wang W. lncRNA PVT1 promotes cetuximab resistance of head and neck squamous cell carcinoma cells by inhibiting miR-124-3p. *Head Neck*. 2021; 43(9):2712–23. DOI: 10.1002/hed.26742.
16. Mortazavipour M.M., Shahbazi S., Mahdian R. Detection of paternal IVS-II-1 (G>A) (*HBB*: c.315+1G>A) mutation in cell-free fetal DNA using COL-D-PCR assay. *Hemoglobin*. 2020; 44(3):168–73. DOI: 10.1080/03630269.2020.1768864.
17. Kane S.R., Shah S.R., Alfaro T.M. Development of a rapid viability polymerase chain reaction method for detection of *Yersinia pestis*. *J. Microbiol. Methods*. 2019; 162:21–7. DOI: 10.1016/j.mimet.2019.05.005.
18. Siggillino A., Ulivi P., Pasini L., Reda M.S., Chiadini E., Tofanetti F.R., Baglivo S., Metro G., Crinó L., Delmonte A., Minotti V., Roila F., Ludovini V. Detection of *EGFR* mutations in plasma cell-free tumor DNA of TKI-treated advanced-NSCLC patients by three methodologies: Scorpion-ARMS, PNAclamp, and Digital PCR. *Diagnostics (Basel)*. 2020; 10(12):1062. DOI: 10.3390/diagnostics10121062.
19. Schneider R., Lamien-Meda A., Auer H., Wiedermann-Schmidt U., Chiodini P.L., Walochnik J. Validation of a novel FRET real-time PCR assay for simultaneous quantitative detection and discrimination of human *Plasmodium* parasites. *PLoS One*. 2021; 16(6):e0252887. DOI: 10.1371/journal.pone.0252887.
20. Sherrill-Mix S., Hwang Y., Roche A.M., Glascock A., Weiss S.R., Li Y., Haddad L., Deraska P., Monahan C., Kromer A., Graham-Wooten J., Taylor L.J., Abella B.S., Ganguly A., Collman R.G., Van Duyn G.D., Bushman F.D. Detection of SARS-CoV-2 RNA using RT-LAMP and molecular beacons. *Genome Biol.* 2021; 22(1):169. DOI: 10.1186/s13059-021-02387-y.
21. Никифоров К.А., Куклева Л.М., Ситмбетов Д.А., Осина Н.А., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Конструирование набора реагентов «ГенПест-подвид/алтай-ПГФ». *Проблемы осо-*
- бо опасных инфекций*. 2021; 4:90–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-90-95.
22. Thomas M.C., Janzen T.W., Husczyzinsky G., Mathews A., Amoako K.K. Development of a novel multiplexed qPCR and Pyrosequencing method for the detection of human pathogenic *Yersinia*. *Int. J. Food Microbiol.* 2017; 257:247–53. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.019.
23. Newton C.R., Graham A., Heptinstall L.E., Powell S.J., Summers C., Kalsheker N., Smith J.C., Markham A.F. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 1989; 17(7):2503–16. DOI: 10.1093/nar/17.7.2503.
24. Cai L., Kong F., Jelfs P., Gilbert G.L., Sintchenko V. Rolling circle amplification and multiplex allele-specific PCR for rapid detection of *katG* and *inhA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Med. Microbiol.* 2009; 299(8):574–81. DOI: 10.1016/j.ijmm.2009.05.006.
25. Vogler A.J., Driebe E.M., Lee J., Auerbach R.K., Allender C.J., Stanley M., Kubota K., Andersen G.L., Radnedge L., Worsham P.L., Keim P., Wagner D.M. Assays for the rapid and specific identification of North American *Yersinia pestis* and the common laboratory strain CO92. *Biotechniques*. 2008; 44(2):201, 203–204, 207. DOI: 10.2144/000112815.
26. Sano T., Smith C.L., Cantor C.R. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science*. 1992; 258(5079):120–2. DOI: 10.1126/science.1439758.
27. Jayathilake C., Nemoto N. cDNA Display-mediated immuno-PCR (cD-IPCR): An ultrasensitive immunoassay for biomolecular detection. *Methods Mol Biol.* 2021; 2261:307–21. DOI: 10.1007/978-1-0716-1186-9_19.
28. Malou N., Tran T.N., Nappez C., Signoli M., Le Forestier C., Castex D., Drancourt M., Raoult D. Immuno-PCR – a new tool for paleomicrobiology: the plague paradigm. *PLoS One*. 2012; 7(2):e31744. DOI: 10.1371/journal.pone.0031744.
29. Adessi C., Matton G., Ayala G., Turcatti G., Mermoud J.J., Mayer P., Kawashima E. Solid phase DNA amplification: characterization of primer attachment and amplification mechanisms. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(20):E87. DOI: 10.1093/nar/28.20.e87.
30. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(12):E63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63.
31. Singh R., Pal V., Tripathi N.K., Goel A.K. Development of a pair of real-time loop mediated isothermal amplification assays for detection of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Mol. Cell Probes*. 2020; 54:101670. DOI: 10.1016/j.mcp.2020.101670.
32. Jin J., Duan L., Fu J., Chai F., Zhou Q., Wang Y., Shao X., Wang L., Yan M., Su X., Zhang Y., Pan J., Chen J. A real-time LAMP-based dual-sample microfluidic chip for rapid and simultaneous detection of multiple waterborne pathogenic bacteria from coastal waters. *Anal. Methods*. 2021; 13(24):2710–21. DOI: 10.1039/d1ay00492a.
33. Liu W., Dong D., Yang Z., Zou D., Chen Z., Yuan J., Huang L. Polymerase spiral reaction (PSR): A novel isothermal nucleic acid amplification method. *Sci. Rep.* 2015; 5:12723. DOI: 10.1038/srep12723.
34. Mayboroda O., Gonzalez Benito A., Sabaté del Rio J., Svobodova M., Julich S., Tomaso H., O'Sullivan C.K., Katakis I. Isothermal solid-phase amplification system for detection of *Yersinia pestis*. *Anal. Bioanal. Chem.* 2016; 408(3):671–6. DOI: 10.1007/s00216-015-9177-1.
35. Shi L., Yang G., Zhang Z., Xia L., Liang Y., Tan H., He J., Xu J., Song Z., Li W., Wang P. Reemergence of human plague in Yunnan, China in 2016. *PLoS One*. 2018; 13(6):e0198067. DOI: 10.1371/journal.pone.0198067.
36. Zasada A.A., Zacharczuk K., Formińska K., Wiatrzyk A., Ziółkowski R., Malinowska E. Isothermal DNA amplification combined with lateral flow dipsticks for detection of bioterror agents. *Anal. Biochem.* 2018; 560:60–6. DOI: 10.1016/j.ab.2018.09.008.
37. Kortli S., Jauset-Rubio M., Tomaso H., Abbas M.N., Bashammakh A.S., El-Shahawi M.S., Alyoubi A.O., Ben-Ali M., O'Sullivan C.K. *Yersinia pestis* detection using biotinylated dNTPs for signal enhancement in lateral flow assays. *Anal. Chim. Acta*. 2020; 1112:54–61. DOI: 10.1016/j.aca.2020.03.059.
38. Müller K., Daßen S., Holowachuk S., Zwirgmaier K., Stehr J., Buersgens F., Ullerich L., Stoeker K. Pulse-Controlled Amplification – A new powerful tool for on-site diagnostics under resource limited conditions. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2021; 15(1):e0009114. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009114.
39. Cunningham C.H., Hennessey C.M., Lin J.T., Ubalee R., Boyce R.M., Mulogo E.M., Hathaway N., Thwai K.L., Phanu F., Kalonji A., Mwandagirwa K., Tshetu A., Juliano J.J., Parr J.B. A novel CRISPR-based malaria diagnostic capable of Plasmodium detection, species differentiation, and drug-resistance genotyping. *EBioMedicine*. 2021; 68:103415. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103415.
40. Schermer B., Fabretti F., Damagnez M., Di Cristanziano V., Heger E., Arjune S., Tanner N.A., Imhof T., Koch M., Ladha A., Joung J., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Burst V., Zhang F.,

Klein F., Benzing T., Müller R.U. Rapid SARS-CoV-2 testing in primary material based on a novel multiplex RT-LAMP assay. *PLoS One*. 2020; 15(11):e0238612. DOI: 10.1371/journal.pone.0238612.

41. Савватеева Е.Н., Дементьева Е.И., Цыбульская М.В., Осипова Т.В., Рябых Т.П., Турьгин А.Ю., Юрасов Р.А., Заседателев А.С., Рубина А.Ю. Биологический микрочип для одновременного количественного иммунологического анализа маркеров онкологических заболеваний в сыворотке крови человека. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2009; 6:679–83.

42. Jiang D., Tian Y., Zhang Y., Lu X., Xiao D., Zhou C. One-step fast and label-free imaging array for multiplexed detection of trace avian influenza viruses. *Anal. Chim. Acta*. 2021; 1171:338645. DOI: 10.1016/j.aca.2021.338645.

43. Srinivasan V., Stedtfeld R.D., Tourlousse D.M., Baushke S.W., Xin Y., Miller S.M., Pham T., Rouillard J.M., Gulari E., Tiedje J.M., Hashsham S.A. Diagnostic microarray for 14 water and foodborne pathogens using a flatbed scanner. *J. Microbiol. Methods*. 2017; 139:15–21. DOI: 10.1016/j.mimet.2017.04.009.

44. Никифоров К.А., Уткин Д.В., Макашова М.А., Куклева Л.М., Ерошенко Г.А., Кутырев В.В. Конструирование системы мультитекстных ПЦР с гибридно-флуоресцентным учетом результатов на твердой подложке для индикации и идентификации штаммов возбудителя чумы. *Биотехнология*. 2020; 36(3):46–56. DOI: 10.21519/0234-2758-2020-36-3-46-56.

45. Famulok M. Allosteric aptamers and aptazymes as probes for screening approaches. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2005; 7(2):137–43.

46. Ellington A.D., Szostak J.W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. 1990; 346(6287):818–22. DOI: 10.1038/346818a0.

47. Jeddi I., Saiz L. Computational design of single-stranded DNA hairpin aptamers immobilized on a biosensor substrate. *Sci. Rep.* 2021; 11(1):10984. DOI: 10.1038/s41598-021-88796-2.

48. Duanghathairornsuk S., Reaver N.G.F., Cameron B.D., Kim D.S. Adsorption kinetics of glycated hemoglobin on aptamer microarrays with antifouling surface modification. *Langmuir*. 2021; 37(15):4647–57. DOI: 10.1021/acs.langmuir.1c00446.

49. Jalali T., Salehi-Vaziri M., Pouriayevali M.H., Gargari S.L.M. Aptamer based diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever from clinical specimens. *Sci. Rep.* 2021; 11(1):12639. DOI: 10.1038/s41598-021-91826-8.

50. Qlark L.C. Jr. Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions. *ASAIO J.* 1956; 2(1):41–8.

51. Hong C.A., Park J.C., Na H., Jeon H., Nam Y.S. Short DNA-catalyzed formation of quantum dot-DNA hydrogel for enzyme-free femtomolar specific DNA assay. *Biosens Bioelectron*. 2021; 182:113110. DOI: 10.1016/j.bios.2021.113110.

52. Born F., Braun P., Scholz H.C., Grass G. Specific detection of *Yersinia pestis* based on receptor binding proteins of phages. *Pathogens*. 2020; 9(8):611. DOI: 10.3390/pathogens9080611.

53. Liu X., Wang L., Zhao J., Zhu Y., Yang J., Yang F. Enhanced binding efficiency of microcantilever biosensor for the detection of *Yersinia*. *Sensors (Basel)*. 2019; 19(15):3326. DOI: 10.3390/s19153326.

54. Seeman N.C. Nucleic acid junctions and lattices. *J. Theor. Biol.* 1982; 99(2):237–47. DOI: 10.1016/0022-5193(82)90002-9.

55. Rothmund P.W. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*. 2006; 440(7082):297–302. DOI: 10.1038/nature04586.

56. Raveendran M., Lee A.J., Sharma R., Wälti C., Actis P. Rational design of DNA nanostructures for single molecule biosensing. *Nat. Commun.* 2020; 11(1):4384. DOI: 10.1038/s41467-020-18132-1.

57. Ochmann S.E., Vietz C., Trofymchuk K., Acuna G.P., Lalkens B., Tinnefeld P. Optical nanoantenna for single molecule-based detection of Zika virus nucleic acids without molecular multiplication. *Anal. Chem.* 2017; 89(23):13000–7. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b04082.

58. Yang B., Zhang Z., Yang C., Wang Y., Orr M.C., Hongbin W., Zhang A.B. Identification of species by combining molecular and morphological data using convolutional neural networks. *Syst. Biol.* 2022; 71(3):690–705. DOI: 10.1093/sysbio/syab076.

References

1. Onishchenko G.G., Smolensky V.Yu., Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Toporkov V.P., Toporkov A.V., Lyapin M.N., Kutyrev V.V. [Conceptual bases of biological safety. Part 1]. *Vestnik Rossiyskoi Akademii Meditsinskikh Nauk [Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences]*. 2013; (10):4–13.

2. Onishchenko G.G., Kutyrev V.V., Krivulya S.D., Fedorov Yu.M., Toporkov V.P. [Strategy for combating infectious diseases and sanitary protection of territories under modern conditions]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2006; (2):5–9.

3. Eroshenko G.A., Krasnov Y.M., Nosov N.Yu., Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Ogolodin E.G., Kutyrev V.V. [Updating of intra-specific *Yersinia pestis* classification, based on the results of

whole-genome sequencing of the strains from the Russian Federation and the neighboring states]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2015; (4):58–64. DOI: 10.21055/0370-1069-2015-4-58-64.

4. Kutyrev V.V., Eroshenko G.A., Motin V.L., Nosov N.Y., Krasnov Y.M., Kukleva L.M., Nikiforov K.A., Al'khova Z.V., Ogolodin E.G., Guseva N.P. Phylogeny and classification of *Yersinia pestis* through the lens of strains from the plague foci of Commonwealth of Independent States. *Front. Microbiol.* 2018; 9:1106. DOI: 10.3389/fmicb.2018.01106.

5. Nikiforov K.A., Morozov O.A., Nosov N.Yu., Kukleva L.M., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Population structure, taxonomy and genetic features of *Yersinia pestis* strains of the Central Asian sub-species]. *Genetika [Genetics]*. 2018; 54(10):1125–35. DOI: 10.1134/S0016675818100107.

6. Cui Y., Yu C., Yan Y., Li D., Li Y., Jombart T., Weinert L.A., Wang Z., Guo Z., Xu L., Zhang Y., Zheng H., Qin N., Xiao X., Wu M., Wang X., Zhou D., Qi Z., Du Z., Wu H., Yang X., Cao H., Wang H., Wang J., Yao S., Rakin A., Li Y., Falush D., Balloux F., Achtman M., Song Y., Wang J., Yang R. Historical variations in mutation rate in an epidemic pathogen, *Yersinia pestis*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2013; 110(2):577–82. DOI: 10.1073/pnas.1205750110.

7. Platonov M.E., Evseeva V.V., Dentovskaya S.V., Anisimov A.P. [Molecular typing of *Yersinia pestis*]. *Molekulyarnaya Genetika, Mikrobiologiya i Virusologiya [Molecular Genetics, Microbiology, and Virology]*. 2013; (2):3–12.

8. Zhang Y., Luo T., Yang C., Yue X., Guo R., Wang X., Buren M., Song Y., Yang R., Cao H., Cui Y., Dai X. Phenotypic and molecular genetic characteristics of *Yersinia pestis* at an emerging natural plague focus, Junggar Basin, China. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2018; 98(1):231–7. DOI: 10.4269/ajtmh.17-0195.

9. Wang P., Shi L., Zhang F., Guo Y., Zhang Z., Tan H., Cui Z., Ding Y., Liang Y., Liang Y., Yu D., Xu J., Li W., Song Z. Ten years of surveillance of the Yulong plague focus in China and the molecular typing and source tracing of the isolates. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018; 12(3):e0006352. DOI: 10.1371/journal.pntd.0006352.

10. Nour El-Din H.T., Yassin A.S., Ragab Y.M., Hashem A.M. Phenotype-genotype characterization and antibiotic-resistance correlations among colonizing and infectious methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* recovered from intensive care units. *Infect. Drug Resist.* 2021; 14:1557–71. DOI: 10.2147/IDR.S296000.

11. Jolley K.A., Maiden M.C. Using multilocus sequence typing to study bacterial variation: prospects in the genomic era. *Future Microbiol.* 2014; 9(5):623–30. DOI: 10.2217/fmb.14.24.

12. Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) for the genotyping of bacterial pathogens. *Methods Mol. Biol.* 2009; 551:105–16. DOI: 10.1007/978-1-60327-999-4_9.

13. Spyrou M.A., Keller M., Tukhbatova R.I., Scheib C.L., Nelson E.A., Andrades Valtueña A., Neumann G.U., Walker D., Alterauge A., Carty N., Cessford C., Fetz H., Gourvenec M., Hartle R., Henderson M., von Heyking K., Inskip S.A., Kacki S., Key F.M., Knox E.L., Later C., Maheshwari-Aplin P., Peters J., Robb J.E., Schreiber J., Kivisild T., Castex D., Löscher S., Harbeck M., Herbig A., Bos K.I., Krause J. Phylogeography of the second plague pandemic revealed through analysis of historical *Yersinia pestis* genomes. *Nat. Commun.* 2019; 10(1):4470. DOI: 10.1038/s41467-019-12154-0.

14. Chen F., Ye J., Liu W., Chio C., Wang W., Qin W. Knockout of a highly GC-rich gene in *Burkholderia pyrrocinia* by recombineering with freeze-thawing transformation. *Mol. Plant Pathol.* 2021; 22(7):843–57. DOI: 10.1111/mpp.13058.

15. Yang S., Yuan Z.J., Zhu Y.H., Chen X., Wang W. lncRNA PVT1 promotes cetuximab resistance of head and neck squamous cell carcinoma cells by inhibiting miR-124-3p. *Head Neck*. 2021; 43(9):2712–23. DOI: 10.1002/hed.26742.

16. Mortazavipour M.M., Shahbazi S., Mahdian R. Detection of paternal IVS-II-1 (G>A) (*HBB*: c.315+1G>A) mutation in cell-free fetal DNA using COLD-PCR assay. *Hemoglobin*. 2020; 44(3):168–73. DOI: 10.1080/03630269.2020.1768864.

17. Kane S.R., Shah S.R., Alfaro T.M. Development of a rapid viability polymerase chain reaction method for detection of *Yersinia pestis*. *J. Microbiol. Methods*. 2019; 162:21–7. DOI: 10.1016/j.mimet.2019.05.005.

18. Siggillino A., Ulivi P., Pasini L., Reda M.S., Chiadini E., Tofanetti F.R., Baglivo S., Metro G., Crinó L., Delmonte A., Minotti V., Roila F., Ludovini V. Detection of *EGFR* mutations in plasma cell-free tumor DNA of TKI-treated advanced-NSCLC patients by three methodologies: Scorpion-ARMS, PNAclamp, and Digital PCR. *Diagnostics (Basel)*. 2020; 10(12):1062. DOI: 10.3390/diagnostics10121062.

19. Schneider R., Lamien-Meda A., Auer H., Wiedermann-Schmidt U., Chiodini P.L., Walochnik J. Validation of a novel FRET real-time PCR assay for simultaneous quantitative detection and discrimination of human *Plasmodium* parasites. *PLoS One*. 2021; 16(6):e0252887. DOI: 10.1371/journal.pone.0252887.

20. Sherrill-Mix S., Hwang Y., Roche A.M., Glascock A., Weiss S.R., Li Y., Haddad L., Deraska P., Monahan C., Kromer A., Graham-Wooten J., Taylor L.J., Abella B.S., Ganguly A., Collman R.G., Van Duyn G.D., Bushman F.D. Detection of SARS-CoV-2 RNA using

- RT-LAMP and molecular beacons. *Genome Biol.* 2021; 22(1):169. DOI: 10.1186/s13059-021-02387-y.
21. Nikiforov K.A., Kukleva L.M., Sitmbetov D.A., Osina N.A., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Construction of the reagent panel "GenPest-subspecies/Altai-RGF"]. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsiy [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2021; (4):90–5. DOI: 10.21055/0370-1069-2021-4-90-95.
22. Thomas M.C., Janzen T.W., Husczyzinsky G., Mathews A., Amoako K.K. Development of a novel multiplexed qPCR and Pyrosequencing method for the detection of human pathogenic *Yersinia*. *Int. J. Food. Microbiol.* 2017; 257:247–53. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2017.06.019.
23. Newton C.R., Graham A., Heptinstall L.E., Powell S.J., Summers C., Kalsheker N., Smith J.C., Markham A.F. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res.* 1989; 17(7):2503–16. DOI: 10.1093/nar/17.7.2503.
24. Cai L., Kong F., Jelfs P., Gilbert G.L., Sintchenko V. Rolling circle amplification and multiplex allele-specific PCR for rapid detection of *katG* and *inhA* gene mutations in *Mycobacterium tuberculosis*. *Int. J. Med. Microbiol.* 2009; 299(8):574–81. DOI: 10.1016/j.ijmm.2009.05.006.
25. Vogler A.J., Driebe E.M., Lee J., Auerbach R.K., Allender C.J., Stanley M., Kubota K., Andersen G.L., Radnedge L., Worsham P.L., Keim P., Wagner D.M. Assays for the rapid and specific identification of North American *Yersinia pestis* and the common laboratory strain CO92. *Biotechniques*. 2008; 44(2):201, 203–204, 207. DOI: 10.2144/000112815.
26. Sano T., Smith C.L., Cantor C.R. Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates. *Science*. 1992; 258(5079):120–2. DOI: 10.1126/science.1439758.
27. Jayathilake C., Nemoto N. cDNA Display-mediated immuno-PCR (cD-IPCR): An ultrasensitive immunoassay for biomolecular detection. *Methods Mol Biol.* 2021; 2261:307–21. DOI: 10.1007/978-1-0716-1186-9_19.
28. Malou N., Tran T.N., Nappez C., Signoli M., Le Forestier C., Castex D., Drancourt M., Raoult D. Immuno-PCR – a new tool for paleomicrobiology: the plague paradigm. *PLoS One*. 2012; 7(2):e31744. DOI: 10.1371/journal.pone.0031744.
29. Adessi C., Matton G., Ayala G., Turcatti G., Mermod J.J., Mayer P., Kawashima E. Solid phase DNA amplification: characterization of primer attachment and amplification mechanisms. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(20):E87. DOI: 10.1093/nar/28.20.e87.
30. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000; 28(12):E63. DOI: 10.1093/nar/28.12.e63.
31. Singh R., Pal V., Tripathi N.K., Goel A.K. Development of a pair of real-time loop mediated isothermal amplification assays for detection of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Mol. Cell Probes*. 2020; 54:101670. DOI: 10.1016/j.mcp.2020.101670.
32. Jin J., Duan L., Fu J., Chai F., Zhou Q., Wang Y., Shao X., Wang L., Yan M., Su X., Zhang Y., Pan J., Chen J. A real-time LAMP-based dual-sample microfluidic chip for rapid and simultaneous detection of multiple waterborne pathogenic bacteria from coastal waters. *Anal. Methods*. 2021; 13(24):2710–21. DOI: 10.1039/d1ay00492a.
33. Liu W., Dong D., Yang Z., Zou D., Chen Z., Yuan J., Huang L. Polymerase spiral reaction (PSR): A novel isothermal nucleic acid amplification method. *Sci. Rep.* 2015; 5:12723. DOI: 10.1038/srep12723.
34. Mayboroda O., Gonzalez Benito A., Sabaté del Rio J., Svobodova M., Julich S., Tomaso H., O'Sullivan C.K., Katakis I. Isothermal solid-phase amplification system for detection of *Yersinia pestis*. *Anal. Bioanal. Chem.* 2016; 408(3):671–6. DOI: 10.1007/s00216-015-9177-1.
35. Shi L., Yang G., Zhang Z., Xia L., Liang Y., Tan H., He J., Xu J., Song Z., Li W., Wang P. Reemergence of human plague in Yunnan, China in 2016. *PLoS One*. 2018; 13(6):e0198067. DOI: 10.1371/journal.pone.0198067.
36. Zasada A.A., Zacharczuk K., Formińska K., Wiatrzyk A., Ziółkowski R., Malinowska E. Isothermal DNA amplification combined with lateral flow dipsticks for detection of biothreat agents. *Anal. Biochem.* 2018; 560:60–6. DOI: 10.1016/j.ab.2018.09.008.
37. Kortli S., Jauset-Rubio M., Tomaso H., Abbas M.N., Bashammakh A.S., El-Shahawi M.S., Alyoubi A.O., Ben-Ali M., O'Sullivan C.K. *Yersinia pestis* detection using biotinylated dNTPs for signal enhancement in lateral flow assays. *Anal. Chim. Acta*. 2020; 1112:54–61. DOI: 10.1016/j.aca.2020.03.059.
38. Müller K., Daßen S., Holowachuk S., Zwirgmaier K., Stehr J., Buersgens F., Ullerich L., Stoecker K. Pulse-Controlled Amplification – A new powerful tool for on-site diagnostics under resource limited conditions. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2021; 15(1):e0009114. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009114.
39. Cunningham C.H., Hennelly C.M., Lin J.T., Ubalee R., Boyce R.M., Mulogo E.M., Hathaway N., Thwai K.L., Phanzu F., Kalonji A., Mwandagaliwa K., Tshetu A., Juliano J.J., Parr J.B. A novel CRISPR-based malaria diagnostic capable of Plasmodium detection, species differentiation, and drug-resistance genotyping. *EBioMedicine*. 2021; 68:103415. DOI: 10.1016/j.ebiom.2021.103415.
40. Schermer B., Fabretti F., Damagnez M., Di Cristanziano V., Heger E., Arjune S., Tanner N.A., Imhof T., Koch M., Ladha A., Joong J., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Burst V., Zhang F., Klein F., Benzing T., Müller R.U. Rapid SARS-CoV-2 testing in primary material based on a novel multiplex RT-LAMP assay. *PLoS One*. 2021; 15(11):e0238612. DOI: 10.1371/journal.pone.0238612.
41. Savvateeva E.N., Dement'eva E.I., Tsybul'skaya M.V., Osipova T.V., Ryabykh T.P., Turygin A.Yu., Yurasov R.A., Zasedatelev A.S., Rubina A.Yu. [Biological microchip for simultaneous quantitative immunological analysis of cancer markers in human blood serum]. *Byulleten' Eksperimental'noy Biologii i Meditsiny [Bulletin of Experimental Biology and Medicine]*. 2009; 6:679–83.
42. Jiang D., Tian Y., Zhang Y., Lu X., Xiao D., Zhou C. One-step fast and label-free imaging array for multiplexed detection of trace avian influenza viruses. *Anal. Chim. Acta*. 2021; 1171:338645. DOI: 10.1016/j.aca.2021.338645.
43. Srinivasan V., Stedtfeld R.D., Turlouise D.M., Baushe S.W., Xin Y., Miller S.M., Pham T., Rouillard J.M., Gulari E., Tiedje J.M., Hashsham S.A. Diagnostic microarray for 14 water and food-borne pathogens using a flatbed scanner. *J. Microbiol. Methods*. 2017; 139:15–21. DOI: 10.1016/j.mimet.2017.04.009.
44. Nikiforov K.A., Utkin D.V., Makshova M.A., Kukleva L.M., Eroshenko G.A., Kutyrev V.V. [Construction of a multiplex PCR system with hybridization-fluorescence registration of results on a solid substrate for the indication and identification of plague agent strains]. *Biotehnologiya [Biotechnology]*. 2020; 36(3):46–56. DOI: 10.21519/0234-2758-2020-36-3-46-56.
45. Famulok M. Allosteric aptamers and aptazymes as probes for screening approaches. *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2005; 7(2):137–43.
46. Ellington A.D., Szostak J.W. *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature*. 1990; 346(6287):818–22. DOI: 10.1038/346818a0.
47. Jeddi I., Saiz L. Computational design of single-stranded DNA hairpin aptamers immobilized on a biosensor substrate. *Sci. Rep.* 2021; 11(1):10984. DOI: 10.1038/s41598-021-88796-2.
48. Duangthaiapornasuk S., Reaver N.G.F., Cameron B.D., Kim D.S. Adsorption kinetics of glycated hemoglobin on aptamer microarrays with antifouling surface modification. *Langmuir*. 2021; 37(15):4647–57. DOI: 10.1021/acs.langmuir.1c00446.
49. Jalali T., Salehi-Vaziri M., Pouriayevali M.H., Gargari S.L.M. Aptamer based diagnosis of Crimean-Congo hemorrhagic fever from clinical specimens. *Sci. Rep.* 2021; 11(1):12639. DOI: 10.1038/s41598-021-91826-8.
50. Clark L.C. Jr. Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions. *ASAIO J.* 1956; 2(1):41–8.
51. Hong C.A., Park J.C., Na H., Jeon H., Nam Y.S. Short DNA-catalyzed formation of quantum dot-DNA hydrogel for enzyme-free femtomolar specific DNA assay. *Biosens Bioelectron.* 2021; 182:113110. DOI: 10.1016/j.bios.2021.113110.
52. Born F., Braun P., Scholz H.C., Grass G. Specific detection of *Yersinia pestis* based on receptor binding proteins of phages. *Pathogens*. 2020; 9(8):611. DOI: 10.3390/pathogens9080611.
53. Liu X., Wang L., Zhao J., Zhu Y., Yang J., Yang F. Enhanced binding efficiency of microcantilever biosensor for the detection of *Yersinia*. *Sensors (Basel)*. 2019; 19(15):3326. DOI: 10.3390/s19153326.
54. Seeman N.C. Nucleic acid junctions and lattices. *J. Theor. Biol.* 1982; 99(2):237–47. DOI: 10.1016/0022-5193(82)90002-9.
55. Rothmund P.W. Folding DNA to create nanoscale shapes and patterns. *Nature*. 2006; 440(7082):297–302. DOI: 10.1038/nature04586.
56. Raveendran M., Lee A.J., Sharma R., Wälti C., Actis P. Rational design of DNA nanostructures for single molecule biosensing. *Nat. Commun.* 2020; 11(1):4384. DOI: 10.1038/s41467-020-18132-1.
57. Ochmann S.E., Vietz C., Trofymchuk K., Acuna G.P., Lalkens B., Tinnefeld P. Optical nanoantenna for single molecule-based detection of Zika virus nucleic acids without molecular multiplication. *Anal. Chem.* 2017; 89(23):13000–7. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b04082.
58. Yang B., Zhang Z., Yang C., Wang Y., Orr M.C., Hongbin W., Zhang A.B. Identification of species by combining molecular and morphological data using convolutional neural networks. *Syst. Biol.* 2022; 71(3):690–705. DOI: 10.1093/sysbio/syab076.

Authors:

Nikiforov K.A. Russian Research Anti-Plague Institute "Microbe". 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.

Об авторах:

Никифоров К.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.