

ПЦР-ПЛАТФОРМА НА ОСНОВЕ МЕТОДА ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ТЕСТ-СИСТЕМ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИОННЫХ ТРАНСМИССИВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ (ОБЗОР)

Юхнева М.А., Мясников В.А., Каневский Б.А., Шевченко В.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение

«Государственный научно-исследовательский испытательный институт военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации, 195043, Санкт-Петербург, ул. Лесопарковая д. 4, телефон/факс: 8(812)775-02-41,

Резюме. В статье приведён обзор одного из перспективных направлений в области индикации нуклеиновых кислот возбудителей инфекционных трансмиссивных заболеваний бактериальной и вирусной природы, ряд из которых относят к потенциальным патогенным биологическим агентам, способным вызывать гарантированный поражающий эффект и для которых необходимо разрабатывать средства индикации и терапии. Рекомбиназная полимеразная амплификация (РПА) является одним из наиболее быстрых и чувствительных методов изотермической амплификации нуклеиновых кислот, не требующих для своей реализации дорогостоящего стационарного оборудования на этапах амплификации и детекции результатов анализа, а также участия высококвалифицированного персонала. На базе данного метода можно разработать ПЦР-платформу с иммунохроматографической детекцией результатов амплификации на тест-полосках с целью создания экспрессных тест-систем для быстрой, простой и точной диагностики возбудителей трансмиссивных заболеваний. Оператору только необходимо подобрать и добавить пару специфичных праймеров, зонд к целевой мишени и недостающие компоненты реакционной смеси. Уже через 25–30 минут (для ДНК-содержащих геномов) может быть проведена качественная оценка результатов амплификации на тест-полоске в виде появления тестовой линии, коррелирующей с наличием

меченого ПЦР-продукта. В случае РНК-содержащих геномов время анализа увеличено в соответствии с длительностью этапа обратной транскрипции. Данный формат индикации аналитов является удобным для диагностики на месте оказания помощи (ДМОП) и в полевых условиях.

Ключевые слова: рекомбиназная полимеразная амплификация; иммунохроматографическая детекция; ИХ тест-полоски; трансмиссивные заболевания; патогенные биологические агенты; диагностика на месте оказания помощи

Для корреспонденции: Юхнева Мария Александровна, gniiivm_7@mil.ru

PCR PLATFORM BASED ON ISOTHERMAL NUCLEIC ACID AMPLIFICATION METHOD FOR CREATING TEST SYSTEMS FOR DIAGNOSTICS OF INFECTIOUS TRANSMISSIBLE DISEASES (REVIEW)

Yukhneva M.A., Myasnikov V.A., Kanevsky B.A., Shevchenko V.A.

State Scientific Research Testing Institute of Military Medicine,

Lesoparkovaya St. 4, St. Petersburg 195043, Russian Federation

Abstract. The article presents a review of one of the promising areas in the field of nucleic acid detection of infectious transmissible diseases pathogens, such as bacteria and viruses. A part of them is classified as potential pathogenic biological agents capable of causing a guaranteed damaging effect and requires the development of detection and therapy. Recombinase polymerase amplification (RPA) is one of the fastest and most sensitive methods of isothermal nucleic acid amplification that does not require expensive laboratory equipment at the stages of amplification and detection of analysis results, as well as the participation of highly qualified personnel. It is possible to develop a PCR platform, based on this method, with immunochromatographic detection of amplification results on test strips for creating express test systems with fast, simple and accurate diagnosis of transmissible diseases pathogens. The operator only needs to develop a design of a specific primer pair and probe to the target and add them to the reaction mixture. After 25–30 minutes (for DNA genomes) it is possible to register amplification result on test strip and observe the

appearance test line, that correlates with the presence of labeled PCR product. In the case of RNA genomes, the analysis time is increased in accordance with the duration of the reverse transcription stage. This format of analyte indication is convenient for use «point of care testing» (POCT) and in the field trial.

Keywords: recombinase polymerase amplification; immunochromatographic detection; immunochromatographic test strips; transmissible diseases; pathogenic biological agents; "point of care testing"

Введение. В последние годы на территории нашего государства, а также в странах ближнего зарубежья наблюдается сохранение напряженной эпидемиологической обстановки по ряду природно-очаговых инфекций (ПОИ) бактериальной и вирусной природы, общих для человека и животных, возбудители которых способны длительное время сохраняться в природе в пределах ограниченного географического ландшафта, образуя природный резервуар инфекции, и способны к передаче трансмиссивным путем с помощью кровососущих насекомых. Ряд ПОИ относят к особо опасным инфекциям, возбудители которых являются потенциальными патогенными биологическими агентами (ПБА), способными вызывать гарантированный поражающий эффект с высокой летальностью при незначительной инфицирующей дозе и могут применяться в качестве потенциальных средств биологического нападения [1]. Отмечено увеличение числа случаев заражения трансмиссивными инфекциями, относящимися ко 2 группе патогенности: туляремией, лихорадкой западного Нила, лихорадкой Ку, клещевым энцефалитом, а также расширение круга инфекционных болезней, не эндемичных для территории России, таких как лихорадка Денге и Зика [2–7]. Сохраняется напряженная эпидемиологическая обстановка на территории двух природных очагов чумы [8, 9].

Постоянный мониторинг особо опасных инфекций в Российской Федерации (РФ) осуществляется органами Роспотребнадзора и включает в себя референс-центры и лаборатории для проведения ПЦР-анализа, золотого стандарта лабораторной диагностики, требующие оснащения в виде наличия дорогостоящего оборудования на этапах амплификации и детекции аналита,

достаточно продолжительного времени анализа и потребности в высококвалифицированных кадрах [10, 11]. Принимая во внимание данные по эпидемиологическому надзору по ПОИ, а также сохранение напряженной геополитической обстановки с потенциальной опасностью применения ПБА со стороны стран-противников, возникает острая необходимость в разработке экспресс-средств специфической индикации, в частности, разработка ПЦР-платформы для создания на ее основе тест-систем с целью быстрой диагностики инфекционных заболеваний на месте оказания помощи (ДМОП) для принятия необходимых мер по ликвидации развития заболевания.

Одним из наиболее перспективных направлений в области индикации нуклеиновых кислот ПБА является разработка методов изотермической амплификации в качестве простого, точного и быстрого метода ПЦР-анализа, при котором процесс амплификации аналита протекает при одинаковой температуре, а следовательно, не требует наличия стационарного амплификатора [12]. Данная группа методов обладает высокой чувствительностью, специфичностью и активно применяется на практике в условиях со слабым материально-техническим оснащением, в мобильных подвижных лабораториях или «у постели больного» без необходимости транспортировки образцов в соответствующие лаборатории.

К настоящему времени в литературе описано более 10 методов изо-ПЦР: петлевая изотермическая амплификация (LAMP), рекомбиназная полимеразная амплификация (RPA, РПА), хеликаз-зависимая амплификация (HDA), амплификация по типу катящегося кольца (RCA), амплификация с вытеснением цепи (SDA), амплификация, основанная на последовательности нуклеиновых кислот (NASBA). Каждый вид амплификации имеет свои характеристики: аналитическую чувствительность, время реакции, температурные условия и состав реакционных смесей (таблица 1) [13].

Все рассмотренные методы изотермической амплификации превосходят по своей чувствительности, скорости классическую ПЦР и позволяют выявлять от 1–10 копий нуклеиновых кислот в пробе в течение часа. Анализ

публикационной активности в базе данных PubMed за последние несколько лет показал, что метод РПА занимает второе место по популярности среди всех методов изо-ПЦР, уступая лишь методу LAMP, и активно используется для амплификации различных мишеней из широкого спектра организмов и образцов (РНК, микро-РНК, однокитевой и двуцепочечной ДНК) [14].

Метод РПА является наиболее перспективным методом изо-ПЦР, отвечающим требованиям высокой аналитической чувствительности и специфичности, с одновременной возможностью проведения реакции амплификации даже при комнатной температуре без применения термоблока или при температуре тела человека [15, 16, 17]. Метод не требует предварительного нагрева пробы для инициации денатурации ДНК. Данную функцию выполняет фермент рекомбиназа. Важным моментом является возможность детектировать продукты реакции амплификации с применением иммунохроматографических (ИХ) тест-полосок, удобного формата экспресс-диагностики инфекционных заболеваний в полевых условиях [15, 18, 19]. Применение лиофилизированных реагентов реакции РПА облегчает эксплуатацию тест-систем, увеличивая температурный диапазон стабильности ферментов и исключая необходимость реализации морозильных камер в процессе хранения и транспортировки.

Таблица 1.

Основные характеристики методов изотермической ПЦР, перспективных при использовании в полевых условиях

№	Метод	Мишень	Кол-во праймеров и зондов	Чувствительность*	Время амплификации, мин	Температура реакции, °С	Потребность реакции в предварительном нагреве	Возможность мультиплексного формата	Возможность использования лиофилизированных реагентов
1	LAMP	ДНК, РНК	4-6	от 5-10	от 20	60-65	+	+	-
2	NASBA	РНК	2	от 1	от 60	41	-	+	+
3	SDA	ДНК	2-4	от 10	от 60	30-55	+	+	-
4	RCA	ДНК, РНК	2	от 10	от 60	30-65	+	-	-
5	HDA	ДНК	2	от 1	от 30	65	-	+	-
6	RPA	ДНК, РНК	2-3	от 1	от 20	30-42	-	+	+
Примечание: – * – количество копий ДНК или РНК в пробе									

Метод РПА – ПЦР-платформа для создания диагностических экспресс тест-систем, предназначенных для диагностики инфекционных заболеваний

Ключевым моментом в разработке ПЦР-платформы с целью создания диагностических экспресс тест-систем к различным видам патогенов является выбор метода амплификации аналита, отвечающего требованиям высокой специфичности и чувствительности, а также выбор метода детекции ампликонов, соответствующего высокой скорости, простоте исполнения и интерпретации результатов анализа. Высокая публикационная активность в отношении разработки диагностических тест-систем на основе РПА с ИХ детекцией результатов амплификации на тест-полосках, а также наличие иностранных коммерческих наборов свидетельствуют о том, что на базе имеющихся подходов можно создать ПЦР-платформу, в которой будет необходимо лишь добавление пары специально подобранных праймеров и специфичного зонда к целевой мишени для выявления аналита [16, 20–25]. Такая ПЦР-платформа будет соответствовать требованиям высокой аналитической чувствительности благодаря большому числу копий нуклеиновых кислот, образующихся в ходе реакции амплификации, специфичности и экспрессности с сохранением основных достоинств метода ИХ.

По данным литературного анализа для разработки тест-систем на основе метода РПА широко применяется набор «TwistAmp® DNA Amplification Kits» биотехнологической компании «TwistDX» (Великобритания) [20, 26]. Данный метод изотермической амплификации разработан в 2006 году британским учёным N.A. Armes и моделирует естественный процесс гомологичной рекомбинации ДНК бактериофага T4 *in vitro*. Метод РПА позволяет амплифицировать до 10^6 – 10^7 копий нуклеиновых кислот на реакцию в течение 20–40 минут при постоянной температуре 37–42 °C [15]. Обычно данное значение температуры поддерживается путем применения портативных термоблоков и термошейкеров. Метод имеет сложный состав реакционной смеси, включающий ферменты и другие компоненты реакции: рекомбиназу фага T4 UvsX, белок фага T4 UvsY, большой фрагмент Bsu-полимеразы *Bacillus*

subtilis, ДНК-связывающий SSB-белок gp32 фага T4, краудинг-агент (высокомолекулярный полиэтиленгликоль), стабилизатор работы ферментов (дитиотреитол), источник энергии в виде аденозинтрифосфата и креатинкиназы, реакционный буфер, дидезоксинуклеозидтрифосфаты и ацетат магния в качестве инициатора реакции амплификации. Благодаря достаточно низким показателям температурного оптимума работы фермента Bsu-полимеразы (37 °C) и способности белка фага T4 UvsY инициировать процесс расплетения нитей ДНК в местах гибридизации праймеров с матрицей, стало возможным получать ампликоны без применения стационарных амплификаторов и даже портативных термоблоков, используя в качестве источника тепла температуру тела человека (при инкубировании пробирки с реакционной смесью в кулаке) или при комнатной температуре [16, 17].

Набор «TwistAmp® DNA Amplification Kits» (Великобритания) представлен в нескольких модификациях: «TwistAmp® Basic» для детекции амплификатов по конечной точке методом электрофореза, набор «TwistAmp® exo» и «TwistAmp® fpg» для визуализации продуктов реакции в режиме реального времени, набор «TwistAmp® nfo» для детекции аналита по конечной точке с помощью ИХ тест-полосок. Также набор «TwistAmp® RT» для работы с РНК-содержащими геномами, например, при амплификации вирусной РНК с дополнительным этапом обратной транскрипции [20]. В меньшей степени в научном сообществе востребован аналог - набор Qitian RT-RAA kit (Qitian, Китай) и набор Lyo-Ready RPA kit (Invitrogen, США) для детекции продуктов реакции по конечной точке в агарозном геле, особенно применимо к особо опасным инфекциям [16, 27, 28]. В РФ коммерчески доступные готовые наборы реагентов для проведения реакции РПА, а также тест-системы на основе данного метода амплификации отсутствуют.

Рассмотрим подходы к разработке тест-систем на основе РПА на примере набора «TwistAmp® DNA Amplification Kits» в модификации «TwistAmp® nfo» (Великобритания), применяющегося для быстрой и точной амплификации относительно коротких целевых последовательностей ДНК длиной 80-500 п.н.

(оптимально 100-200 п.н.) [20]. Набор содержит все необходимые реакционные компоненты для проведения РПА и ИХ тест-полоску. Оператору только необходимо подобрать и добавить пару специфичных праймеров и зонд «TwistAmp® nfo» к целевой матрице, недостающие компоненты реакционной смеси, и уже через 20 минут можно проводить детекцию результатов амплификации на тест-полоске. Общее время амплификации и детекции аналита для ДНК-содержащих геномов составляет 25–30 минут (набор «TwistAmp® nfo», Великобритания). При анализе РНК-содержащих геномов с помощью данного комплекта реагентов необходимо проводить дополнительный этап обратной транскрипции для получения кДНК на матрице РНК с применением фермента обратной транскриптазы. Время анализа в таком случае будет увеличено в соответствии с длительностью этапа обратной транскрипции и будет составлять менее 1 часа.

Основные параметры тест-системы, такие как аналитическая чувствительность и специфичность, зависят от состава праймеров и зонда, их основных характеристик и комплементарности матрице, активности компонентов реакционной смеси и выбора метода детекции аналита. Важным моментом является этап пробоподготовки биологических образцов, включающий выбор метода экстракции нуклеиновых кислот (ДНК, РНК), соответствующий заданным показателям чистоты и концентрации. Необходимо отметить, что метод РПА достаточно устойчив к действию ингибиторов (гепарин, этанол, гемоглобин) в отличие от классической ПЦР, что позволяет снизить требования к качеству выделения нуклеиновых кислот и проводить реакцию амплификации непосредственно в биологических образцах (кровь, носоглоточные смывы, бронхоальвеолярный лаваж, культуральные среды, молоко, растительный материал) после предварительного слабощелочного лизиса или нагревания биоматериала [20].

Метод РПА является высокочувствительным и позволяет определять от 1 до 10 копий нуклеиновых кислот на реакцию, что превышает аналогичный показатель ряда методов изотермической амплификации и классической ПЦР

[15, 20]. С целью увеличения аналитической чувствительности и скорости амплификации необходимо проводить оптимизацию условий реакции, меняя такие параметры, как температура (оптимальное значение – 37–42 °С), концентрация ацетата магния (стандартная концентрация – 14 мМ), время перемешивания образца (стандартное время – 4 минуты и более), концентрация и соотношение праймеров и зонда (концентрация каждого праймера – 150–600 нМ, концентрация зонда – 50–150 нМ) и количество исходной матрицы в образце [15, 20].

Высокая специфичность метода изотермической амплификации достигается путем увеличения длин праймеров в сравнении с классической ПЦР (18–20 п.н.) и использования специфичных зондов [20]. Оптимальные характеристики праймеров: длина – 30–35 п.н., GC-состав – 30–70 %, температура плавления – 50–100 °С, максимальная длина однонуклеотидного повтора – С5 (например, «ССССС»). Возможно применение мультиплексного формата анализа, позволяющего одновременно детектировать несколько аналитов, а также использование вырожденных праймеров (с допустимым количеством нуклеотидных несоответствий, равным 5–9 п.н.) при амплификации геномов организмов, содержащих большое количество вариабельных участков.

С целью снижения фонового сигнала амплификации и увеличения специфичности метода компанией «TwistDX» (Великобритания) разработан дизайн зондов, позволяющий проводить детекцию аналитов по конечной точке (зонд «TwistAmp® nfo») или в режиме реального времени (флуоресцентные зонды «TwistAmp® exo» и «TwistAmp® fpg»). Использование флуоресцентных зондов в качестве компонента ПЦР тест-системы требует наличия стационарных или портативных флуориметров для детекции сигнала флуоресценции и оценки результата реакции амплификации, что затрудняет их использование в условиях слабой материально-технической базы. Однако, этого недостатка можно избежать путем применения «TwistAmp® nfo» зонда, адаптированного для качественной оценки продуктов РПА на тест-полосках [20].

Зонд «TwistAmp® nfo» представляет собой олигонуклеотид длиной 46–52 пар оснований, содержащий несколько функциональных групп: 5'-антигенную флуоресцентную метку (например, FAM); 3'-модифицированную группу (С3-спейсер, фосфат или дидезоксинуклеотид), блокирующую действие ДНК-полимеразы; остаток тетрагидрофурана (THF) или «dSpacer», заменяющий азотистое основание в составе ампликона (рисунок). Фермент эндонуклеаза рестрикции IV (Nfo) распознает зонд по остатку тетрагидрофурана и разрезает с образованием свободной гидроксильной группы на 3'-конце ДНК, необходимой для элонгации цепи.

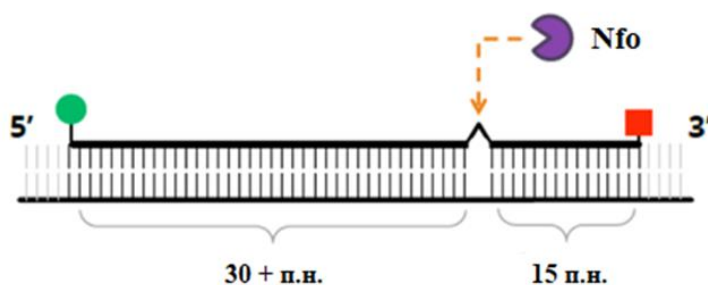


Рисунок. Схематическое изображение зонда «TwistAmp® nfo» (Великобритания), комплементарно связанного с матрицей

Примечание: ● - 5'-FAM, ● - эндонуклеаза IV (Nfo), ■ - 3'-C3-спейсер, ▲ - остаток тетрагидрофурана (THF)

Таким образом зонд превращается в прямой праймер, что позволяет ввести флуоресцентную метку (например, FAM) в продукт амплификации. Благодаря обратному праймеру, содержащему аффинную метку (биотин), происходит накопление ПЦР-продуктов с двойной антигенной меткой. В дальнейшем такие ампликоны иммобилизируются на тест-полоске, покрытой антителами к биотину, с образованием комплекса антиген-антитело в тестовой зоне мембраны. Визуализация продуктов амплификации происходит за счет специфичных к FAM первичных моноклональных антител, конъюгированных с наночастицами

золота. После нанесения аналитического образца на мембрану уже через 5–10 минут можно наблюдать положительный результат реакции амплификации в виде появления тестовой линии, коррелирующей с наличием меченых ПЦР-продуктов, или ее отсутствия (отрицательный результат). Контрольная линия содержит иммобилизированные антитела против видовых специфичных антител, конъюгированных с наночастицами золота, и проявляется при каждом нанесении опытного образца на мембрану как контроль качества компонентов тест-системы [20]. Постановка реакции амплификации может проводиться с добавлением одной пары праймеров к реакционной смеси, в таком случае прямой и обратный праймеры несут специфичные метки (например, FAM и биотин, соответственно) для включения в состав ампликонов и последующей детекции на ИХ тест-полосках.

Тест-системы на основе метода РПА с ИХ детекцией результатов амплификации на тест-полосках отличаются высокой аналитической чувствительностью, специфичностью, скоростью, простотой проведения и интерпретации результатов анализа и применяются авторами зарубежных статей в экспресс-диагностике трансмиссивных заболеваний в условиях ограничения материально-технической базы и в полевых условиях (таблица 2).

Таблица 2.

Применение набора «TwistAmp®nfo kit» (Великобритания) в экспресс-диагностике трансмиссивных заболеваний

№	Патоген	Мишень	Образец	Время амплификации, мин	Температура реакции, °С	Чувствительность, количество копий анализата в пробе	Источник
1	Риккетсия, <i>Rickettsia typhi</i>	ДНК	Плазма крови человека	20	37	20 копий ГЭ/реакцию*	[22]
2	Боррелия, <i>Borrelia burgdorferi</i>	ДНК	Клеточная линия и образцы сыворотки крови	20	37	25 копий ГЭ/реакцию	[23]
3	Вирус желтой лихорадки, <i>Yellow fever virus</i>	оцРНК	Супернатант клеточных культур, комары	20	39	<21 копии ГЭ/реакцию	[24]
4	Вирус лихорадки Денге, <i>Dengue virus</i>	оцРНК	Плазмида	30	39	10 копий ГЭ/реакцию	[19]
5	Вирус лихорадки Эбола, <i>Ebola virus</i>	оцРНК	Супернатант клеточных культур	30	37	134 копии ГЭ/мкл	[25]

№	Патоген	Мишень	Образец	Время амплификации, мин	Температура реакции, °С	Чувствительность, количество копий аналита в пробе	Источник
6	Возбудитель малярии, <i>Plasmodium knowlesi</i>	ДНК	18S рибосомальная РНК	12	37	10 копий ГЭ/мкл	[26]
7	Вирус лихорадки Зика, <i>Zika virus</i>	оцРНК	Плазмида	20	39	<34 копий ГЭ/реакцию	[16]
8	Вирус лихорадки Западного Нила, <i>West Nile virus</i>	оцРНК	Плазмида	30	39	1000 копий ГЭ/реакцию	[27]

Примечание: * - количество копий геномных эквивалентов (нуклеиновых кислот) в единице объема
аналитического образца

Заключение. В последнее время в зарубежных странах наблюдается интенсификация разработок в области индикации нуклеиновых кислот ПБА на основе методов изотермической амплификации. Удобный формат экспресс-диагностики с применением ИХ тест-полосок для оценки продуктов РПА наравне с высокими показателями аналитической чувствительности и специфичности метода, а также возможность проведения реакции амплификации при комнатной температуре без применения портативных термоблоков или при температуре тела человека создают конкурентное преимущество данного метода перед другими методами анализа нуклеиновых кислот. В РФ коммерчески доступные готовые наборы реагентов и тест-системы для диагностики инфекционных заболеваний *in vitro* методом РПА отсутствуют. Принимая во внимание данный факт, а также наличие на территории субъектов РФ ПОИ и потенциальную возможность применения ПБА со стороны стран-противников, разработка отечественной ПЦР-платформы на основе метода РПА для создания экспресс тест-систем, предназначенных для диагностики инфекционных трансмиссивных заболеваний, на сегодняшний день является одним из приоритетных направлений в системе биологической защиты и позволит в короткие сроки обеспечить индикацию патогенов различного генеза с целью принятия срочных мер для предотвращения развития заболевания, изоляции пациентов и госпитализации в соответствующие учреждения для проведения терапии.

Библиография

1. Калевич А.А. Актуальные проблемы современной медицины и фармации 2019: «рейтинг» потенциальных средств биологического терроризма». М.: Белорусский государственный медицинский университет; 2019.
2. Кудрявцева Т.Ю., Попов В.П., Мокриевич А.Н. и др. Анализ эпизоотологической и эпидемиологической ситуации по туляремии на территории Российской Федерации в 2023 г. и прогноз на 2024 г. *Проблемы*

особо опасных инфекций. 2024; 1: 17–29. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2024-1-17-29>.

3. Путинцева Е.В., Удовиченко С.К., Никитин Д.Н. и др. Лихорадка Западного Нила: анализ эпидемиологической ситуации в Российской Федерации в 2023 г., прогноз на 2024 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2024; 1: 89–101. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2024-1-89-101>.

4. Штрек С.В., Рудаков Н.В., Шпынов С.Н. и др. Эпидемиологическая ситуация по риккетсиозам и лихорадке Ку в Российской Федерации за период 2010–2023 гг., прогноз на 2024 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2024; 3: 63-73. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2024-3-63-73>.

5. Никитин А.Я., Андаев Е.И., Толмачева М.И. и др. Эпидемиологическая ситуация по клещевому вирусному энцефалиту в Российской Федерации в 2014–2023 гг. и краткосрочный прогноз заболеваемости на 2024 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2024; 1: 48–58. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2024-1-48-58>.

6. Нечаев В.В., Яровая И.И., Каченя Г.В. и др. Клинико-эпидемиологическая характеристика завозной тропической лихорадки Денге. *Инфектология*. 2021; 13 (1): 78-85. <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2021-13-1-78-85>.

7. Москалев А.В., Гумилевский Б.Ю., Астапенко П.В. и др. Возбудители геморрагических лихорадок и их эпидемиология. *Вестник Российской военно-медицинской академии*. 2020; 22 (1): 163–172. <https://doi.org/10.1017816/brmma25987>.

8. Куличенко А.Н., Малецкая О.В., Манин Е.А. и др. Эпидемиологическая обстановка по природно-очаговым инфекционным болезням на юге европейской части России в 2023 г. С.: Ставропольский противочумный институт Роспотребнадзора, 2024.

9. Попов Н.В., Карнаухов И.Г., Кузнецов А.А. и др. Эпидемиологическая обстановка по чуме в мире и прогноз ее развития на 2025 г.

в Российской Федерации. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2025; 1: 74–83. <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2025-1-74-83>.

10. Смелянский В.П., Жуков К.В., Каргашин С.А. и др. Эпидемиологическая ситуация по природно-очаговым инфекциям в Волгоградской области в 2023 г. *Эпидемиология*. 2024; 15 (1): 66–73. <https://doi.org/10.21886/2219-8075-2024-15-1-66-73>.

11. Чемерис А.В., Магданов Э.Г., Вахитов В.А. Вариации приборного обеспечения полимеразной цепной реакции. *Биомика*. 2012; 2 (2): 85–98.

12. Чемисова О.С., Цырулина О.А. Сравнительный анализ методов изотермической амплификации нуклеиновых кислот. *Микробиология и иммунология*. 2022; 99: 126–138.

13. Srivastava P., Prasad D. Isothermal nucleic acid amplification and its uses in modern diagnostic technologies. *3 Biotech*. 2023; 13 (6): 200. <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03628-6>.

14. Feng X., Liu Y., Zhao Y. et al. Recombinase polymerase amplification-based biosensor for rapid zoonoses screening. *International Journal of Nanomedicine*. 2023; 18: 6311-6331. <https://doi.org/10.2147/IJN.S434197>.

15. Lobato I.M., O’Sullivan C.K. Recombinase polymerase amplification: basics, applications and recent advances. *Trends in Analytical Chemistry Journal*. 2018; 98: 19–35. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015>.

16. Balea R., Pollak N.M., Hobson-Peters J. et al. Development and pre-clinical evaluation of a Zika virus diagnostic for low resource settings. *Frontiers in Microbiology*. 2023; 14: 1214148. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1214148>.

17. Crannell Z., Rohrman B., Richards-Kortum R. Equipment-free incubation of recombinase polymerase amplification reactions using body heat. *PLoS One*. 2014; 9 (11): 112146. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112146>.

18. Андрюков Б.Г., Ляпун И.Н., Бынина М.П. и др. Упрощённые форматы современных биосенсоров: 60 лет использования иммунохроматографических тест-систем в лабораторной диагностике.

Клиническая лабораторная диагностика. 2020; 65 (10): 611–618.
<http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-611-618>.

19. Xi Y., Xu C., Xie Z. et al. Rapid and visual detection of dengue virus using recombinase polymerase amplification method combined with lateral flow. *Molecular and Cellular Probes*. 2019; 46: 101413. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2019.06.003>.

20. TwistAmp® DNA Amplification Kits: assay design manual. United Kingdom. TwistDX; 2018.

21. Chao C., Belinskaya T., Zhang Z. et al. Development of recombinase polymerase amplification assays for detection of *Orientia tsutsugamushi* or *Rickettsia typhi*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2015; 9 (7): 3884. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003884>.

22. Liu W., Liu H.-X., Zhang L. et al. A novel isothermal assay of *Borrelia burgdorferi* by recombinase polymerase amplification with lateral flow detection. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016; 17 (8): 1250. <https://doi.org/10.3390/ijms17081250>.

23. Escadafal C., Faye O., Sall A.A. et al. Rapid molecular assays for the detection of yellow fever virus in low-resource settings. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2014; 8: 2730–2738. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002730>.

24. James A., Todd S., Pollak N. et al. Ebolavirus diagnosis made simple, comparable and faster than molecular detection methods: preparing for the future. *Virology Journal*. 2018; 15: 75–81. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-0985-8>.

25. Lai M., Ooi C., Lau Y. Recombinase Polymerase Amplification Combined with a Lateral Flow Strip for the Detection of *Plasmodium knowlesi*. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2018; 98: 700–703. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0738>.

26. Piepenburg O., Williams C.H., Stemple D.L. et al. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biology*. 2006; 4: 204–211. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0738>.

27. Fan G.H., Shen X.X., Li F. et al. Development of an internally controlled reverse transcription recombinase-aided amplification assay for the rapid and visual

detection of West Nile virus. *Biomedical and environment sciences*. 2019; 32 (12): 926–929. <https://doi.org/10.3967/bes2019.116>.

28. Li X., Shen X., Li M. et al. Applicability of duplex real time and lateral flow strip reverse-transcription recombinase aided amplification assays for the detection of Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16. *Virology Journal*. 2019; 16: 166–175. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1264-z>.

References

1. Kalevich A.A. Current issues of modern medicine and pharmacy 2019: «rating of potential means of biological terrorism». M.: Belarusian State Medical University; 2019.

2. Kudryavtseva T.Yu., Popov V.P., Mokrievich A.N. et al. Analysis of the epizootiological and epidemiological situation on tularemia in the territory of the Russian Federation in 2023 and forecast for 2024. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2024; (1): 17–29 (in Russian). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2024-1-17-29>.

3. Putintseva E.V., Udovichenko S.K., Nikitin D.N. et al. West Nile fever: analysis of the epidemiological situation in the Russian Federation in 2023, forecast for 2024. *Problems of particularly dangerous infections*. 2024; (1): 89-101 (in Russian). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2024-1-89-101>.

4. Shtrek S.V., Rudakov N.V., Shpynov S.N. et al. Epidemiological situation on Rickettsial diseases and Q fever in the Russian Federation over the period of 2010–2023, forecast for 2024. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2024; (3): 63–73 (in Russian). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2024-3-63-73>.

5. Nikitin A.Ya., Andaev E.I., Tolmacheva M.I. et al. Epidemiological situation on Tick-Borne Encephalitis in the Russian Federation in 2014–2023 and short-term forecast of the incidence for 2024. *Problems of particularly dangerous infections*. 2024; (1): 48-58 (in Russian). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2024-1-48-58>.

6. Nechaev V.V., Yarovaya I.I., Kachenya G.V. et al. Clinical-epidemiological characteristics delivery cases of tropic Dengue fever. *Journal Infectology*. 2021; 13 (1): 78–85 (in Russian). <https://doi.org/10.22625/2072-6732-2021-13-1-78-85>.
7. Moskalev A.V., Gumilevskiy B.Y., Astapenko P.V. et al. Activators hemorrhagic fevers and them epidemiology. *Bulletin of the Russian Military Medical Academy*. 2020; 22 (1): 163–172 (in Russian). <https://doi.org/10.17816/brmma25987>.
8. Kulichenko A.N., Maletskaya O.V., Manin E.A. et al. Epidemiological situation of natural focal infectious diseases in the south of the European part of Russia in 2023. S: Stavropol Research Anti-Plague Institute, 2024.
9. Popov N.V., Karnaukhov I.G., Kuznetsov A.A. et al. The epidemiological situation on plague in the world and the forecast of its development in the Russian Federation for 2025. *Problems of particularly dangerous infections*. 2025; 1: 74–83 (in Russian). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2025-1-74-83>.
10. Smelyansky V.P., Zhukov K.V., Kargashin S.A. et al. Epidemiological situation of natural focal infections in the Volgograd region in 2023. *Epidemiology*. 2024; 15 (1): 66–73 (in Russian). <https://doi.org/10.21886/2219-8075-2024-15-1-66-73>.
11. Chemeris A.V., Magdanov E.G., Vakhit V.A. Variations in instrumentation for polymerase chain reaction. *Biomika*. 2012; 2 (2): 85–98 (in Russian).
12. Chemisova O.S., Tsyulina O.A. Comparative analysis of isothermal amplification methods of nucleic acids. *Microbiology and Immunology*. 2022; 99:126–138 (in Russian).
13. Srivastava P., Prasad D. Isothermal nucleic acid amplification and its uses in modern diagnostic technologies. 3 *Biotech*. 2023; 13 (6): 200. <https://doi.org/10.1007/s13205-023-03628-6>.

14. Feng X., Liu Y., Zhao Y. et al. Recombinase polymerase amplification-based biosensor for rapid zoonoses screening. *International Journal of Nanomedicine*. 2023; 18: 6311–6331. <https://doi.org/10.2147/IJN.S434197>.
15. Lobato I.M., O’Sullivan C.K. Recombinase polymerase amplification: basics, applications and recent advances. *Trends in Analytical Chemistry Journal*. 2018; 98: 19–35. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2017.10.015>.
16. Balea R., Pollak N.M., Hobson-Peters J. et al. Development and pre-clinical evaluation of a Zika virus diagnostic for low resource settings. *Frontiers in Microbiology*. 2023; 14: 1214148. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1214148>.
17. Crannell Z., Rohrman B., Richards-Kortum R. Equipment-free incubation of recombinase polymerase amplification reactions using body heat. *PLoS One*. 2014; 9 (11): 112146. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112146>.
18. Andryukov B.G., Lyapun I.N. Simplified formats of modern biosensors: 60 years of use of immunochromatographic test systems in laboratory diagnostics. *Russian Clinical Laboratory Diagnostics*. 2020; 65(10): 611–618. <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2084-2020-65-10-611-618>.
19. Xi Y., Xu C., Xie Z. et al. Rapid and visual detection of dengue virus using recombinase polymerase amplification method combined with lateral flow. *Molecular and Cellular Probes*. 2019; 46: 101413. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2019.06.003>.
20. TwistAmp® DNA Amplification Kits: assay design manual. United Kingdom. TwistDX; 2018.
21. Chao C., Belinskaya T., Zhang Z. et al. Development of recombinase polymerase amplification assays for detection of *Orientia tsutsugamushi* or *Rickettsia typhi*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2015; 9 (7): 3884. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003884>.
22. Liu W., Liu H.-X., Zhang L. et al. A novel isothermal assay of *Borrelia burgdorferi* by recombinase polymerase amplification with lateral flow detection. *International Journal of Molecular Sciences*. 2016; 17 (8): 1250. <https://doi.org/10.3390/ijms17081250>.

23. Escadafal C., Faye O., Sall A.A. et al. Rapid molecular assays for the detection of yellow fever virus in low-resource settings. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2014; 8: 2730–2738. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002730>.
24. James A., Todd S., Pollak N. et al. Ebolavirus diagnosis made simple, comparable and faster than molecular detection methods: preparing for the future. *Virology Journal*. 2018; 15: 75–81. <https://doi.org/10.1186/s12985-018-0985-8>.
25. Lai M., Ooi C., Lau Y. Recombinase Polymerase Amplification Combined with a Lateral Flow Strip for the Detection of Plasmodium knowlesi. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2018; 98: 700–703. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0738>.
26. Piepenburg O., Williams C.H., Stemple D.L. et al. DNA detection using recombination proteins. *PLoS Biology*. 2006; 4: 204–211. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0738>.
27. Fan G.H., Shen X.X., Li F. et al. Development of an internally controlled reverse transcription recombinase-aided amplification assay for the rapid and visual detection of West Nile virus. *Biomedical and environment sciences*. 2019; 32 (12): 926–929. <https://doi.org/10.3967/bes2019.116>.
28. Li X., Shen X., Li M. et al. Applicability of duplex real time and lateral flow strip reverse-transcription recombinase aided amplification assays for the detection of Enterovirus 71 and Coxsackievirus A16. *Virology Journal*. 2019; 16: 166–175. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1264-z>.