

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2021-6-1-77-85>

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ В ПРАКТИКЕ СОВРЕМЕННЫХ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ. ЧАСТЬ II: ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЦР В ДИАГНОСТИКЕ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА

ВОЛКОВ А.Н. *, НАЧЕВА Л.В., ЗАХАРОВА Ю.В.

ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения
Российской Федерации, г. Кемерово, Россия

Резюме

ПЦР-диагностика является одним из наиболее современных и технологичных методов выявления микроорганизмов. Основанная на амплификации нуклеиновых кислот, ПЦР позволяет достичь высокой диагностической чувствительности и специфичности в сочетании с высокой скоростью выполнения исследования. В отличие от бактериологического метода ПЦР-диагностика не требует предварительного культивирования исследуемых микроорганизмов для их идентификации, что позволяет применять метод для обнаружения некультивируемых бактерий и вирусов.

В лекции обсуждаются молекулярные процессы, положенные в основу современных технических решений для молекулярно-генетической диагностики. Рассматриваются фундаментальные и прикладные аспекты выполнения мультиплексной ПЦР и ПЦР с обратной транскрипцией. Анализируются способы качественного и количественного выявления возбудителей в биологических материалах с помощью молекулярно-генетических методов. Приводятся примеры использования ПЦР-исследования для решения конкретных диагностических задач.

Лекция ориентирована на студентов медико-биологических специальностей, а также молодых специалистов, планирующих использовать в своей практической деятельности молекулярно-генетические методы исследований.

молекулярно-генетические методы исследований.

Ключевые слова: молекулярно-генетическая диагностика, ПЦР, идентификация микроорганизмов.

Список сокращений

ВКР – высокий канцерогенный риск

ВПЧ – вирус папилломы человека

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

МАНК – методы амплификации нуклеиновых кислот

НК – нуклеиновые кислоты

ОТ-ПЦР – ПЦР с обратной транскрипцией

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

COVID-19 – (англ. COroNaVirus Disease 2019) заболевание, вызванное коронавирусом-19

C_t – (англ. Threshold Cycle) пороговый цикл

LAMP – (англ. Loop-mediated isothermal amplification) петлевая изотермическая амплификация

NASBA – (англ. Nucleic acid sequence-based amplification) амплификация нуклеиновой кислоты на основе нуклеотидной последовательности

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источник финансирования

Данная работа не имела источника финансирования.

Для цитирования:

Волков А. Н., Начева Л. В., Захарова Ю. В. Молекулярно-генетические методы в практике современных медико-биологических исследований. Часть II: использование ПЦР в диагностике инфекционных заболеваний человека. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2021; 6(1): 77-85. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2021-6-1-77-85>

*Корреспонденцию адресовать:

Волков Алексей Николаевич, 650056, Россия, г. Кемерово, ул. Ворошилова, д. 22а, e-mail: volkov_alex@yandex.ru

© Волков А.Н. и др.

LECTURES

MOLECULAR GENETIC TECHNIQUES IN CURRENT BIOMEDICAL RESEARCH. PART II: PCR APPLICATIONS IN DIAGNOSTICS OF HUMAN INFECTIOUS DISEASES

ALEXEY N. VOLKOV **, LYUBOV V. NACHEVA, YULIYA V. ZAKHAROVA

Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

English ►

Abstract

Polymerase chain reaction (PCR)-based diagnostics is currently established as a gold standard for the detection of microorganisms. The features of PCR include rapid amplification of DNA and RNA as well as high sensitivity and specificity. In contrast to diagnostic microbiology, PCR diagnostics does not require preliminary culture of the microorganisms for their identification, reducing both time and costs of the diagnostic procedure.

The lecture discusses the molecular basis behind the modern technical solutions for the PCR diagnostics of human infectious diseases including multiplex and reverse transcription PCR. We

describe the principles of qualitative and quantitative PCR-based detection of pathogens in biological samples and provide the examples of PCR application for solving specific diagnostic scenarios.

The lecture is primarily designed for students of biomedical specialties and healthcare professionals using molecular genetic techniques in their practice.

Keywords: molecular genetic diagnostics, PCR, microbial detection.

Conflict of Interest

None declared.

Funding

There was no funding for this project.

For citation:

Alexey N. Volkov, Lyubov V. Nacheva, Yuliya V. Zakharova. Molecular genetic techniques in current biomedical research. Part II: PCR applications in diagnostics of human infectious diseases. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2021; 6(1): 77-85. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2021-6-1-77-85>

****Corresponding author:**

Alexey N. Volkov, 22a, Voroshilova Street, Kemerovo, Russian Federation, 650056, Russian Federation, E-mail: volkov_alex@yandex.ru

© Dr. Alexey N. Volkov et al.

Введение

Написание данной лекции проходит в период беспрецедентного по масштабу внедрения ПЦР-диагностики в практику клинической медицины. Пандемия коронавирусной инфекции COVID-19 потребовала экстренной разработки тест-систем для быстрой диагностики заболевания, предпочтительно на ранней и даже на доклинической стадии. При этом отсутствие выраженных специфических признаков патологии у большинства больных предъявляет дополнительное требование к методу исследования — анализ должен свидетельствовать о присутствии самого вируса в биологическом материале, а не физиологических последствий его активности¹.

¹ Согласно Временным методическим рекомендациям «Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19)», основное значение для этиологической лабораторной диагностики COVID-19 имеет выявление РНК SARS-CoV-2 с помощью методов амплификации нуклеиновых кислот.

Молекулярно-генетические методы оказались оптимальным инструментом для решения поставленной задачи. Рассчитанные на обнаружение нуклеиновых кислот с высокой специфичностью, они позволяют дифференцировать вирус SARS-CoV-2 от прочих возбудителей респираторных заболеваний даже при наличии в клиническом образце комплекса различных патогенных бактерий и вирусов [1, 2]. Как было сказано ранее, в основе ПЦР-диагностики лежит амплификация информативных участков нуклеиновых кислот (НК) возбудителя, что позволяет обнаружить его присутствие даже при незначительной концентрации [3].

Следует напомнить, что молекулярно-генетические методы охватывают широкий спектр манипуляций с нуклеиновыми кислотами и многие из них подразумевают амплификацию НК. Методы амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) включают такие по-своему интересные и полезные подходы, как NASBA

(Nucleic acid sequence-based amplification), LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) и др. [4–6]. Однако ни один из альтернативных методов до сих пор не может вытеснить ПЦР-исследование, что учитывают разработчики тест-систем (в том числе, создавая диагностические наборы реагентов для выявления SARS-CoV-2). По этой причине в данной лекции основное внимание будет уделяться практическим вопросам проведения полимеразной цепной реакции.

ПЦР-диагностика и классические микробиологические исследования

Появление новых многообещающих методов лабораторного исследования часто не означает отмены прежних, хорошо зарекомендовавших себя подходов. В большинстве случаев ПЦР-диагностика не вытесняет, а дополняет классические микробиологические исследования. Такую закономерность можно проследить на примере применения генодиагностики во фтизиатрии при идентификации микобактерий туберкулезного комплекса.

В соответствии с международной практикой все биологические материалы, подозрительные на наличие *Mycobacterium tuberculosis*, должны проходить генодиагностику для обнаружения ДНК возбудителя. Одновременно с этим проводится микроскопический анализ образцов за исключением образцов крови. Результат обоих тестов, учитывая высокую скорость их исполнения, может быть получен и предоставлен в медицинскую организацию в течение суток [7].

Вместе с тем, по-прежнему «золотым стандартом» в диагностике многих инфекционных заболеваний является метод бактериального посева, позволяющий идентифицировать только жизнеспособные микробные клетки после их размножения на/в питательной среде и изучить их биологические свойства, например, чувствительность к антибиотикам, химиотерапевтическим препаратам. Это невозможно осуществить с помощью ПЦР-диагностики и микроскопического анализа, что позволяет минимизировать количество ложноотрицательных заключений. При наличии микобактерий в образце положительный результат культивирования будет установлен и задокументирован не ранее 21 дня, но для получения надежного отрицательного заключения рекомендуется продолжить культивирование до 6 недель [7]. Таким образом, разумное сочетание трех методических подходов может обеспечить необхо-

димую срочность и надежность диагностики туберкулеза.

В противоположность культуральному методу ПЦР-диагностика не подразумевает накопления бактериальной массы в искусственных условиях, что можно считать несомненным преимуществом такого анализа. Манипуляции с клиническим образцом сведены к минимуму. Более того, уже на стадии выделения нуклеиновых кислот происходит обеззараживание биологического материала за счет использования лизирующих реагентов и нагревания [2]. Данный метод может считаться наиболее безопасным для медицинского персонала и окружающей среды.

Однако использование ПЦР-анализа во фтизиатрии не ограничивается простой идентификацией *Mycobacterium*. После получения положительного результата диагностики врач должен принять решение о назначении эффективной противотуберкулезной терапии. В настоящее время сделать это становится все сложнее в связи с появлением штаммов микобактерий с лекарственной устойчивостью. Данное явление объясняется постоянным мутационным процессом, происходящим в микробном геноме, поэтому наиболее эффективным способом выявления лекарственной устойчивости является опять генодиагностика [8, 9]. Однако в данном случае целью исследования будет не обнаружение видоспецифической последовательности ДНК, а поиск минимальных нуклеотидных изменений в отдельных участках бактериального генома. Способы такого анализа будут рассмотрены в следующей лекции на примере поиска однонуклеотидных замен в геноме человека.

Мультиплексный ПЦР-анализ для выявления патогенных микроорганизмов

Видовая идентификация микроорганизмов при выполнении бактериального посева обычно основана на изучении совокупности фенотипических свойств бактерий: морфологических, тинкториальных, культуральных, биохимических, антигенных и/или факторов вирулентности. В случае обнаружения близкородственных таксонов или нестабильности генома микробов такой способ может оказаться непродуктивным. Существенным недостатком метода является не только длительность его проведения, но и высокая стоимость питательных сред и тест-систем для идентификации. В случае предполагаемой микст-инфекции себесто-

Рисунок 1.

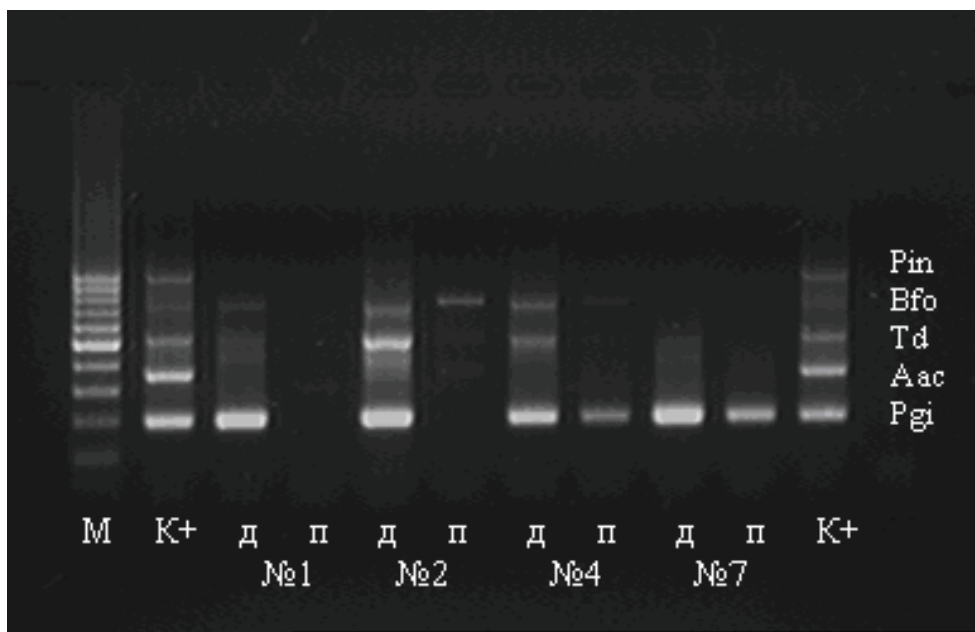
Результаты выявления ДНК патогенных микроорганизмов у больных пародонти- том до и после ле- чения

Примечание. М – маркер молекуляр- ного веса, К+ – кон- трольная ДНК, д – до лечения, п – после лечения (из [12])

Figure 1.

Detection of DNA be- longing to the patho- genic microorganisms in the patients with periodontitis before and after the treat- ment

M – molecular weight marker (ladder), K+ – positive control, д – before treatment, п – after treatment (from [12])



имость анализа, трудо- и времязатраты суще- ственно увеличиваются. Наконец, бактерио- логический метод неприменим к вирусам и к ряду бактерий, являющимся облигатными вну- триклеточными паразитами или перешедшими в некультивируемое состояние.

Мультиплексное ПЦР-исследование в ряде случаев позволяет одновременно решить все перечисленные проблемы. Особенность дан- ной модификации метода заключается в ис- пользовании в составе ПЦР-смеси нескольких пар праймеров, специфичных к уникальным участкам геномов различных патогенных об- ектов [10, 11]. Примером такого исследования может служить единовременное выявление пя- ти пародонтопатогенных микроорганизмов в одном клиническом образце [12].

Анаэробные бактерии *Porphyromonas gin- givalis*, *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Treponema denticola*, *Bacteroides forsythus* и *Prevotella intermedia* являются частой причи- ной поражения тканей пародонта. Их иденти- фикация затруднена в связи со сложностями культивирования *in vitro*. Использование муль- типраймерной ПЦР для диагностики показы- вает высокую вероятность сочетанной инфек- ции с наличием более одного микроорганизма у многих пациентов (рисунок 1).

Такое развернутое заключение имеет важное клиническое значение, так как позволяет леча- щему врачу подобрать необходимое сочетание антибиотиков с максимальным терапевтическим эффектом в каждом отдельном случае. Более то- го, высокая скорость выполнения ПЦР-диагно-

стики и низкая себестоимость анализа позволя- ют многократно повторять исследование для мо- ниторинга течения инфекции [12].

Анализ электрофореграмм, полученных при генодиагностике микроорганизмов, демон- стрирует не только широкий спектр возможных возбудителей, но и варьирующую концентра- цию каждого из них [10, 12]. Возникает необхо- димость в количественной оценке результатов ПЦР-исследования для более точного дози- рования антибиотиков в динамике инфекцион- ного процесса и определения эффективности са- мого лечения.

Количественная ПЦР-диагностика возбу- дителей инфекционных заболеваний чело- века

Определение абсолютного или относитель- ного содержания возбудителя в биологическом образце в ряде случаев важно для принятия ре- шения о необходимости начала терапии. Так, при бактериальном вагинозе спектр микроор- ганизмов, заселяющих урогенитальный тракт женщин, может не меняться по отношению к нормальным показателям, изменяется лишь ко- личественное содержание и соотношение от- дельных представителей. Такого дисбалан- са бывает достаточно для начала клинических проявлений и свидетельствует о необходимости медицинского вмешательства. В этом слу- чае ПЦР-диагностика может дать исчерпываю- щее описание условно-патогенной и нормаль- ной микрофлоры [13, 14].

Электрофоретическая детекция результа- та ПЦР дает приблизительное представление о со-

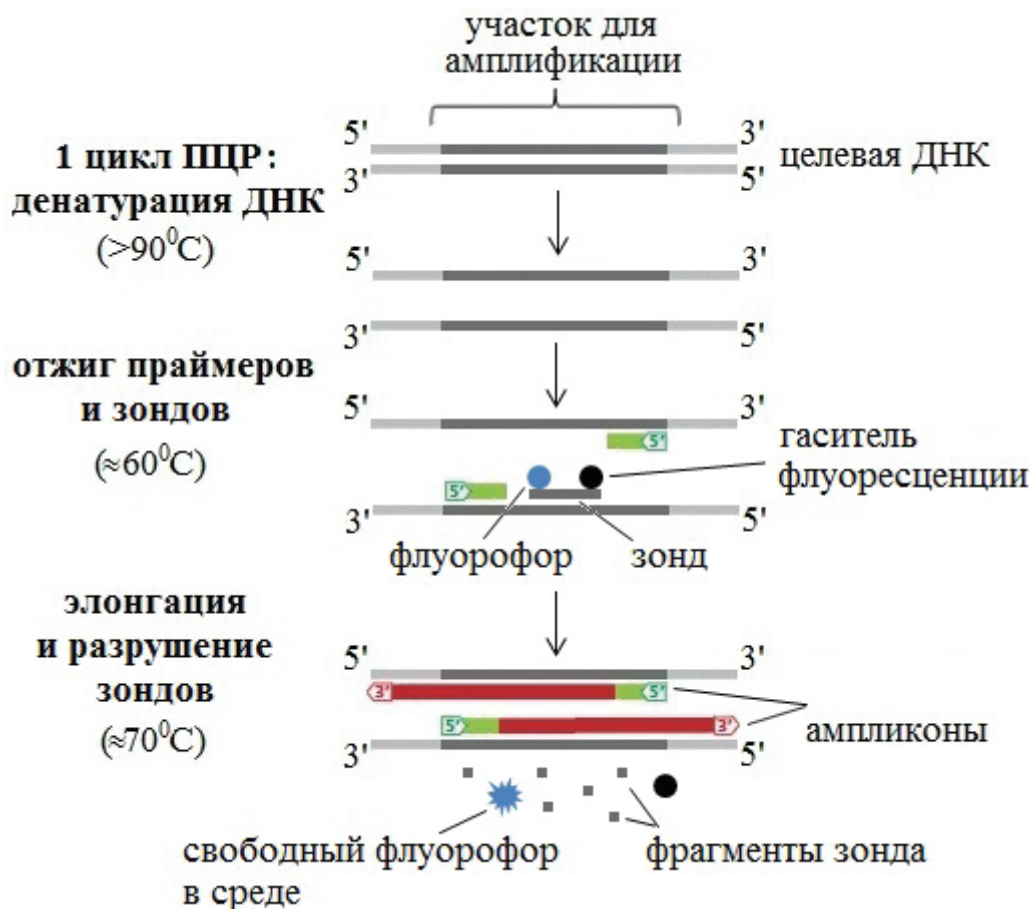


Рисунок 2.

Этапы ПЦР с детекцией «в реальном времени»

Figure 2.

Stages of real-time PCR

держании НК возбудителя в исходном материале [12]. Точный количественный учет возможен лишь при сопоставлении продукта амплификации с большим количеством стандартных образцов с известной концентрацией ДНК, что сильно усложняет процедуру и едва ли выполнимо при мультиплексном анализе. На практике обычно используют другой подход, основанный на изучении кинетики ПЦР в ходе процесса амплификации НК.

Для осуществления ПЦР с детекцией «в реальном времени» (син. real-time PCR, qPCR) применяют два технологических новшества. Во-первых, в реакционную смесь добавляют небольшой олигонуклеотидный зонд, комплементарный внутреннему участку изучаемого фрагмента ДНК (рисунок 2). Во-вторых, предусматривают возможность регистрации флуоресценции смеси прямо через оптически прозрачные крышки ПЦР-пробирок с помощью оптического модуля в составе амплификатора. Сам режим ПЦР при этом не изменяется.

На этапе отжига праймеров к ДНК-матрице и ампликонам присоединяется зонд, который содержит в своем составе флуорофор и гаситель флуоресценции. Интактный зонд не дол-

жен флуоресцировать за счет взаимодействия этих элементов. На стадии элонгации происходит разрушение зондов. Это осуществляется ДНК-полимеразой, которая способна не только наращивать праймер с 3'-конца, но и устранять со своего пути по мере движения любые полинуклеотидные структуры (5'-экзонуклеазная активность). Зонд, оказавшийся на пути ДНК-полимеразы, фрагментируется и вытесняется с ДНК-матрицы. Его компоненты оказываются в реакционной смеси. При этом флуорофор перестает взаимодействовать с гасителем флуоресценции и при возбуждении УФ-светом начинает флуоресцировать [15, 16].

Очевидно суммарная флуоресценция ПЦР-смеси будет пропорциональна количеству разрушенных зондов. В свою очередь, это количество пропорционально числу образовавшихся ампликонов (и числу рабочих циклов ДНК-полимеразы). Регистрация уровня флуоресценции осуществляется после каждого цикла ПЦР и выводится аппаратно-программным комплексом на экран «в реальном времени» (рисунок 3).

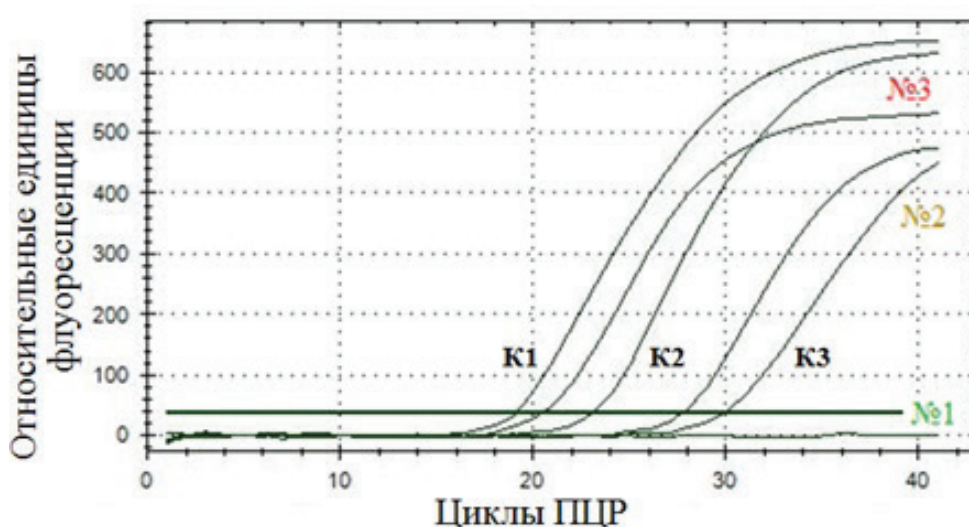
График накопления флуоресценции при анализе клинического образца легко может быть

Рисунок 3.

Количественный ПЦР-анализ ВПЧ филогенетической группы А9 в трех клинических образцах (№1, №2, №3) в сопоставлении с ДНК-калибраторами (K1, K2, K3).

Figure 3.

Quantitative PCR analysis of HPV phylogenetic group A9 in three clinical samples (№1, №2, №3) in comparison with DNA calibrators (K1, K2, K3).



сопоставлен с эталонными кривыми, полученными при амплификации ДНК-стандартов с известной концентрацией [1, 2, 15]. В ряде случаев программное обеспечение в состоянии автоматически определить исходную концентрацию НК возбудителя в исследуемом образце на основании такого сравнения.

Стоит добавить, что для маркировки зондов для ПЦР могут использоваться несколько десятков известных флуорофоров, каждый из которых имеет свой диапазон излучения. Это позволяет выполнять в одной реакционной пробирке одновременно несколько ПЦР-реакций с участием различных зондов, несущих различные флуорофоры и комплементарных различным ДНК-мишеням. Оптические системы современных амплификаторов могут одновременно использовать до 6 каналов детекции флуоресценции, что определяет максимальное число объектов исследования в ходе мультиплексной ПЦР.

Используя такой алгоритм, удастся существенно повысить информативность и надежность ПЦР-анализа. Он становится незаменимым при осуществлении скрининга некоторых инфекционных заболеваний. Так, согласно принятому в России регламенту обследования при проведении скрининга рака шейки матки (ГОСТ Р 57005-2016), если при цитологическом исследовании цервикальных соскобов обследуемых женщин выявляются патологические изменения, эти образцы также необходимо исследовать на наличие ДНК онкогенных вирусов папилломы человека (ВПЧ). В зависимости от наличия и концентрации обнаруженного возбудителя принимаются дальнейшие профилактические и терапевтические меры [17].

Существует более 100 типов ВПЧ, около 30 из которых регулярно обнаруживаются в пораженных тканях урогенитального тракта. На долю 10–15 наиболее распространенных ВПЧ высокого канцерогенного риска (ВКР) приходится более 90% случаев злокачественного перерождения тканей. Максимальной частотой как среди здоровых носительниц, так и среди онкобольных характеризуются ВПЧ 16, 18, 33 и 45 типов, считающиеся маркерами повышенного онкологического риска [18]. Таким образом, задача ПЦР-диагностики будет сводиться к выявлению в клиническом образце, по крайней мере, десяти наиболее клинически значимых типов ВПЧ с количественной оценкой их присутствия. Уточним, что в рамках скрининговых программ нежелательно (а иногда и невозможно) проведение многочисленных повторных анализов одного биологического образца. В идеале – одномоментное выявление максимального числа мишеней.

Для решения поставленной задачи разработчики тест-систем учитывают филогенетическое сходство различных ВПЧ. В простейшем случае можно идентифицировать участок ДНК, присущий всем ВПЧ ВКР, что, однако, не позволит установить тип выявленных вирусов. Наоборот, можно провести ПЦР-диагностику с индивидуальной идентификацией наиболее распространенных и значимых типов ВПЧ (например, 16, 18, 33 и 45), а прочие выявлять на основании общих нуклеотидных последовательностей. Компромиссный вариант предполагает выявлять ВПЧ с точностью до филогенетической группы. В этом случае ВПЧ 16 и 33 типов выявляется среди прочих в составе филогенетической группы А9. ВПЧ 18

и 45 генотипируются как члены филогенетической группы А7. Оставшиеся каналы детекции флуоресценции могут регистрировать индивидуальные или групповые генотипы прочих ВПЧ.

При проведении количественной ПЦР одновременно с клиническими образцами необходимо осуществить амплификацию ДНК-калибраторов. Они содержат ДНК возбудителя в различных разведениях, соответствующие нескольким уровням инфекционной нагрузки. Образцы, свободные от ДНК патогенных микроорганизмов, сохраняют исходный уровень фоновой флуоресценции на протяжении всего времени (образец №1, **рисунок 3**). Инфицированные пробы демонстрируют накопление флуоресценции в последовательных циклах ПЦР (образцы № 2, 3, **рисунок 3**). При этом чем больше концентрация инфекционной ДНК в образце, тем раньше кривая пересекает установленную пороговую линию фоновой флуоресценции. Эта точка, известная как «пороговый цикл» (C_t), сопоставляется с C_t калибраторов и используется для расчета концентрации возбудителя в исходных образцах.

Выявление РНК-содержащих патогенных вирусов молекулярно-генетическими методами

Одной из сложных задач лабораторной медицины является выявление вирусов в клинических образцах. Для этого применяются иммунохимические исследования, распознающие

специфические белковые антигены вируса, или молекулярно-генетические методы для идентификации вирусных НК. Многие эпидемиологически значимые вирусы человека в качестве основного носителя генетической информации содержат РНК. Таковы вирусы, вызывающие грипп, гепатит С, клещевой энцефалит, COVID-19 и др. Для идентификации РНК вирусов могут использоваться уже упомянутые методы на основе амплификации нуклеиновых кислот NASBA и LAMP [4, 5], но в большинстве случаев предпочтение отдается ПЦР-диагностике [1, 2].

Одним из ключевых принципов ПЦР, определяющих цепной характер реакции, является использование двунитевой ДНК-матрицы. Это, на первый взгляд, делает невозможным применение ПЦР-диагностики для выявления однонитевой РНК. Решению проблемы способствовало открытие процесса обратной транскрипции. Установлено, что ряд РНК-содержащих вирусов способен синтезировать ДНК, комплементарную собственной РНК, используя последнюю как матрицу. Важнейший участник этого процесса – РНК-зависимая ДНК-полимераза или обратная транскриптаза обнаружена у ВИЧ и прочих ретро-вирусов [19].

Для амплификации РНК *in vitro* в реакционную пробирку, помимо прочего, добавляют данный фермент и на предварительном этапе при температуре около 37°C проводят обратную транскрипцию (**рисунок 4**).

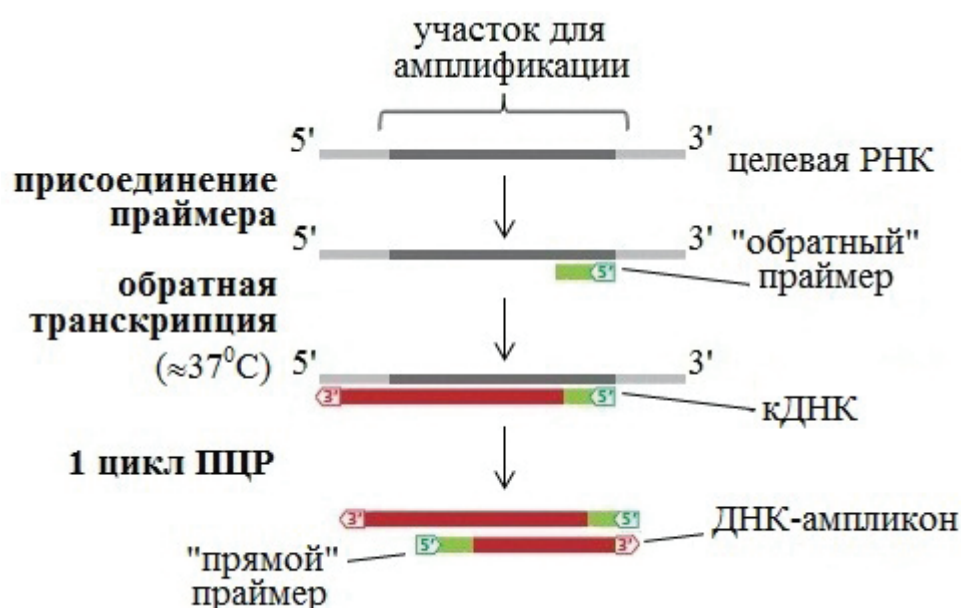


Рисунок 4.

Этапы ПЦР с обратной транскрипцией

Figure 4.

Stages of reverse transcription PCR

Полученная при этом гибридная молекула РНК-ДНК содержит ДНК, комплементарную исходной РНК (кДНК), которая непосредственно используется в ходе дальнейшей ПЦР как ДНК-матрица для работы ДНК-полимеразы. Обсуждаемая модификация ПЦР получила название «ПЦР с обратной транскрипцией» (ОТ-ПЦР). Однако возможности ОТ-ПЦР выходят за рамки выявления РНК-содержащих вирусов. Данная методика оказалась пригодной для изучения любых РНК и стимулировала многочисленные исследования транскриптома (совокупности всех образующихся в клетке РНК) различных биологических объектов, в том числе человека [20].

Завершая обсуждение темы, можно сделать следующее заключение. Методы обнаружения и идентификации патогенных микроорга-

низмов, основанные на ПЦР, оказались полезным дополнением классических лабораторных исследований. Несомненным преимуществом ПЦР-диагностики является высокая диагностическая специфичность и чувствительность метода, при этом отсутствует необходимость в предварительном культивировании потенциально опасных объектов. Для ПЦР-диагностики пригодны даже обеззараженные биологические материалы. Молекулярно-генетическая диагностика дает уникальную возможность выявления НК микроорганизмов, не способных размножаться в лабораторных условиях. Наконец, современные форматы ПЦР позволяют одновременно выявлять несколько возбудителей за один сеанс ПЦР с возможностью установления их количественного содержания.

Литература / References:

1. Waller JV, Kaur P, Tucker A, Lin KK, Diaz MJ, Henry TS, Hope M. Diagnostic tools for Coronavirus disease (COVID-19): Comparing CT and RT-PCR viral nucleic acid testing. *AJR Am J Roentgenol.* 2020;215(4):834-838. <https://doi.org/10.2214/AJR.20.23418>
2. Long C, Xu H, Shen Q, Zhang X, Fan B, Wang C, Zeng B, Li Z, Li X, Li H. Diagnosis of the Coronavirus disease (COVID-19): rRT-PCR or CT? *Eur J Radiol.* 2020;126:108961. <https://doi.org/10.1016/j.ejrad.2020.108961>
3. Волков А.Н., Начева Л.В. Молекулярно-генетические методы в практике современных медико-биологических исследований. Часть I: Теоретические основы ПЦР-диагностики. *Фундаментальная и клиническая медицина.* 2020;5(4):133-140 [Volkov AN, Nacheva LV. Molecular genetic techniques in current biomedical research. Part I: Theoretical basis of PCR-diagnostics. *Fundamental and Clinical Medicine.* 2020;5(4):133-140. (In Russ.).] <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-4-133-140>
4. Pardee K, Green AA, Takahashi MK, Braff D, Lambert G, Lee JW, Ferrante T, Ma D, Donghia N, Fan M, Daringer NM, Bosch I, Dudley DM, O'Connor DH, Gehrke L, Collins JJ. Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components. *Cell.* 2016;165(5):1255-1266. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.059>
5. Zhou L, Chandrasekaran AR, Punnoose JA, Bonenfant G, Charles S, Levchenko O, Badu P, Cavaliere C, Pager CT, Halvorsen K. Programmable low-cost DNA-based platform for viral RNA detection. *Sci Adv.* 2020;6(39):eabc6246. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abc6246>
6. Wong Y, Othman S, Lau Y, Radu S, Chee H. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a versatile technique for detection of micro-organisms. *J Appl Microbiol.* 2018;124(3):626-643. <https://doi.org/10.1111/jam.13647>
7. Forbes BA, Hall GS, Miller MB, Novak SM, Rowlinson M-C, Salfinger M, Somoskövi A, Warshauer DM, Wilson ML. Practice guidelines for clinical microbiology laboratories: mycobacteria. *Clin Microbiol Rev.* 2018;31(2):e00038-17. <https://doi.org/10.1128/CMR.00038-17>
8. Mikhecheva NE, Zaychikova MV, Melerzanov AV, Danilenko VN. A nonsynonymous SNP catalog of *Mycobacterium tuberculosis* virulence genes and its use for detecting new potentially virulent sublineages. *Genome Biol Evol.* 2017;9(4):887-899. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx053>
9. Torfs E, Pillar T, Cos P, Cappoen D. Opportunities for overcoming *Mycobacterium tuberculosis* drug resistance: emerging mycobacterial targets and host-directed therapy. *Int J Mol Sci.* 2019;20(12):2868. <https://doi.org/10.3390/ijms20122868>
10. Chae H, Han SJ, Kim S-Y, Ki C-S, Huh HJ, Yong D, Koh W-J, Shin SJ. Development of a one-step multiplex PCR assay for differential detection of major *Mycobacterium* species. *J Clin Microbiol.* 2017;55(9):2736-2751. <https://doi.org/10.1128/JCM.00549-17>
11. Sea-liang N, Sereemasapun A, Patarakul K, Gaywee J, Rodkvamtook W, Srisawat N, Wacharapulsadee S, Hemachudha T. Development of multiplex PCR for neglected infectious diseases. *PLoS Negl Trop Dis.* 2019;13(7):e0007440. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007440>
12. Волков А.Н. Аprobация тест-системы для одновременного ПЦР-анализа пяти пародонтопатогенных микроорганизмов в биологическом образце. *Медицина в Кузбассе.* 2014;13(4):14-18 [Volkov AN. Approbation of test system for simultaneous PCR analysis of five parodontopathogenic microorganisms in biological sample. *Medicine in Kuzbass.* 2014;13(4):14-18. (In Russ.).]
13. Onderdonk AB, Delaney ML, Fichorova RN. The human microbiome during bacterial vaginosis. *Clin Microbiol Rev.* 2016;29(2):223-238. <https://doi.org/10.1128/CMR.00075-15>
14. Pacha-Herrera D, Vasco G, Cruz-Betancourt C, Galarza JM, Barragán V, Machado A. Vaginal microbiota evaluation and Lactobacilli quantification by qPCR in pregnant and non-pregnant women: A pilot study. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:303. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00303>
15. Kralik P, Ricchi M. A Basic guide to Real Time PCR in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. *Front Microbiol.* 2017;8:108. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00108>
16. Zhu H, Zhang H, Xu Y, Laššáková S, Korabečná M, Neužil P. PCR past, present and future. *BioTechniques.* 2020;69(4):317-325. <https://doi.org/10.2144/btn-2020-0057>
17. Нарвская О.В. Вирус папилломы человека. Эпидеми-

- ология, лабораторная диагностика и профилактика папилломавирусной инфекции. *Инфекция и иммунитет*. 2011;1(1):15-22 [Narvskaya OV. Virus of human papilloma. Epidemiology, laboratory diagnostics and prevention of papilloma viral infection. *Infektsiya i immunitet*. (Russian Journal of Infection and Immunity). 2011;1(1):15-22. (In Russ.).]
18. Holl K, Nowakowski AM, Powell N, McCluggage WG, Pirog EC, Collas De Souza S, Tjalma WA, Rosenlund M, Fiander A, Castro Sánchez M, Damaskou V, Joura EA, Kirschner B, Koiss R, O'Leary J, Quint W, Reich O, Torné A, Wells M, Rob L, Kolomiets L, Molijn A, Savicheva A, Shipitsyna E, Rosillon D, Jenkins D. Human papillomavirus prevalence and type-distribution in cervical glandular neoplasias: Results from a European multinational epidemiological study. *Int J Cancer*. 2015;137(12):2858-2868. <https://doi.org/10.1002/ijc.29651>
19. Hu W-S, Hughes SH. HIV-1 reverse transcription. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2(10):a006882. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006882>
20. Casamassimi A, Federico A, Rienzo M, Esposito S, Ciccodicola A. Transcriptome profiling in human diseases: new advances and perspectives. *Int J Mol Sci*. 2017;18(8):1652. <https://doi.org/10.3390/ijms18081652>

Сведения об авторах

Волков Алексей Николаевич, кандидат биологических наук, доцент кафедры биологии с основами генетики и паразитологии; старший научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (650056, г. Кемерово, ул. Ворошилова, д. 22а).

Вклад в статью: написание статьи.

ORCID: 0000-0003-1169-715X

Начева Любовь Васильевна, доктор биологических наук, профессор, заведующая кафедрой биологии с основами генетики и паразитологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (650056, г. Кемерово, ул. Ворошилова, д. 22а).

Вклад в статью: написание статьи.

ORCID: 0000-0002-3148-8788

Захарова Юлия Викторовна, доктор медицинских наук, доцент кафедры микробиологии, иммунологии и вирусологии ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (650056, г. Кемерово, ул. Ворошилова, д. 22а).

Вклад в статью: поиск и анализ литературы, формулирование концепции.

ORCID: 0000-0002-3475-9125

Статья поступила: 03.02.2021 г.

Принята в печать: 27.02.2021 г.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

Authors

Dr. Alexey N. Volkov, PhD, Associate Professor, Department of Biology, Genetics and Parasitology; Senior Researcher, Central Research Laboratory, Kemerovo State Medical University (22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056, Russian Federation).

Contribution: wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0003-1169-715X

Prof. Lyubov V. Nacheva, MD, DSc, Professor, Head of the Department of Biology, Genetics, and Parasitology, Kemerovo State Medical University (22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056, Russian Federation).

Contribution: wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0002-3148-8788

Dr. Yuliya V. Zakharova, MD, DSc, Associate Professor, Department of Microbiology, Immunology and Virology, Kemerovo State Medical University (22a, Voroshilova Street, Kemerovo, 650056, Russian Federation).

Contribution: conceived the lecture; literature search and analysis.

ORCID: 0000-0002-3475-9125

Received: 03.02.2021

Accepted: 27.02.2021

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.