
**ХИМИЯ И ТЕХНОЛОГИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ
И БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

**CHEMISTRY AND TECHNOLOGY OF MEDICINAL COMPOUNDS
AND BIOLOGICALLY ACTIVE SUBSTANCES**

ISSN 2410-6593 (Print), ISSN 2686-7575 (Online)

<https://doi.org/10.32362/2410-6593-2021-16-3-225-231>



УДК 57.083.18

НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

**Особенности оптимизации мультипраймерной ПЦР
для выявления возбудителей инфекционной пневмонии
человека**

Е.С. Клочихина[@], В.Е. Шершов, В.Е. Кузнецова, С.А. Лапа, А.В. Чудинов

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук,
Москва, 119991 Россия*

[@]Автор для переписки, e-mail: arctickate@yandex.ru

Аннотация

Цели. Разработка мультипраймерной системы на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР), направленной на одновременное выявление шести основных бактериальных возбудителей пневмонии человека; выявление параметров и закономерностей, имеющих важное значение для оптимизации мультипраймерной системы, в том числе для разработок систем ПЦР в иммобилизованной фазе (на биологическом микрочипе).

Методы. Для определения оптимальных параметров системы использовали методы ПЦР в т.н. «моноплексном» и мультиплексном форматах.

Результаты. Сконструированы праймеры, и оптимизирован температурно-временной профиль проведения ПЦР в объеме для выявления *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Klebsiella pneumoniae* и *Streptococcus pneumoniae*. Выявлены закономерности конструирования праймеров для ПЦР в иммобилизованной фазе.

Выводы. Изученные закономерности особенностей оптимизации мультипраймерных систем позволили разработать прототип системы, способной специфично выявлять шесть клинически значимых возбудителей пневмонии человека. Прототип системы может быть расширен для анализа вирусных и грибковых патогенов и применяться в клинической диагностике. Результаты изучения особенностей мультиплексной ПЦР в иммобилизованной фазе привели к созданию прототипа системы для выявления патогенных агентов на биологическом микрочипе.

Ключевые слова: инфекционная пневмония, мультиплексная ПЦР, биочипы, COVID-19

Для цитирования: Клочихина Е.С., Шершов В.Е., Кузнецова В.Е., Лапа С.А., Чудинов А.В. Особенности оптимизации мультипраймерной ПЦР для выявления возбудителей инфекционной пневмонии человека. *Тонкие химические технологии*. 2021;16(3):225–231. <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2021-16-3-225-231>

RESEARCH ARTICLE

Specificities of multi-primer polymerase chain reaction optimization for the detection of infectious pneumonia agents in human

Ekaterina S. Klochikhina[@], Valeriy E. Shershov, Viktoria E. Kuznetsova, Sergey A. Lapa, Alexander V. Chudinov

Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

[@]Corresponding author, e-mail: arctickate@yandex.ru

Abstract

Objectives. The objectives of this work are the development of a multi-primer system based on the polymerase chain reaction (PCR) aimed at the simultaneous detection of six bacterial pathogens that cause human pneumonia and the determination of the parameters important for the optimization of this multi-primer system, including solid-phase PCR systems (biological microarrays).

Methods. To determine the optimal parameters of the system, PCR methods were used in monoplex and multiplex formats.

Results. Primers for *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Klebsiella pneumoniae*, and *Streptococcus pneumoniae* detection were designed, and the PCR cycling conditions were optimized. The patterns of primer design for solid-phase PCR were revealed.

Conclusions. The developed prototype of a system specifically identifies six clinically significant bacterial pathogens. It could be expanded for the analysis of viral and fungal pathogens and used in clinical diagnostics. A prototype of a system for pathogenic agent detection in the immobilized phase (biological microarray) was created.

Keywords: infectious pneumonia, multiplex PCR, biochips, COVID-19

For citation: Klochikhina E.S., Shershov V.E., Kuznetsova V.E., Lapa S.A., Chudinov A.V. Specificities of multi-primer polymerase chain reaction optimization for the detection of infectious pneumonia agents in human. *Tonk. Khim. Tekhnol. = Fine Chem. Technol.* 2021;16(3):225–231 (Russ., Eng.). <https://doi.org/10.32362/2410-6593-2021-16-3-225-231>

ВВЕДЕНИЕ

Инфекционная пневмония представляет собой спектр различающихся по этиологии и патогенезу заболеваний органов дыхательной системы [1]. Точное и своевременное определение возбудителя, вызвавшего поражения, имеет важное значение в разработке успешных схем лечения [2], а также контроля зараженных, что является актуальной проблемой в условиях пандемии COVID-19, когда помимо вирусного заболевания поступающие в медицинские

учреждения пациенты сталкиваются со вторичными внутрибольничными инфекциями [3].

Для идентификации возбудителей пневмонии, которыми могут выступать вирусы, бактерии или грибки, можно использовать стандартные методики этиологической диагностики, например, посевы, что зачастую неудобно из-за ограничений в работе с биологическими образцами и проведения длительных и трудоемких работ по культивированию, выделению и дальнейшему определению патогенных агентов [4, 5]. По этим причинам часто необходима

более точная и быстрая идентификация для правильного лечения [6].

Сегодня все большее распространение получают молекулярно-генетические методы анализа типа различных вариаций полимеразной цепной реакции (ПЦР). Их применение выгодно отличается относительной легкостью, точностью и чувствительностью результатов, а также быстротой [4], что важно для лечения заболеваний с высокой динамикой развития патологического процесса.

Данная работа посвящена разработке и оптимизации ПЦР для одновременного обнаружения шести бактериальных возбудителей пневмонии человека *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae*, *Legionella pneumophila*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*. В описанном подходе амплифицировали участки маркерных генов возбудителей в одном общем объеме, получаемые продукты разделяли электрофоретическим методом. По длинам обнаруженных амплифицированных фрагментов идентифицировали конкретный возбудитель.

На примере разработанной системы описаны важные особенности оптимизации мультипраймерной ПЦР, в том числе – для применения в иммобилизованной фазе.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы

В работе использована деконтаминированная полногеномная ДНК бактериальных штаммов из коллекции Государственного научного центра прикладной микробиологии и биотехнологии (п. Оболенск, Серпухов, Московская область, Россия). Выделение ДНК из клеточных культур осуществляли СТАВ-методом [7].

Праймеры

Множественное выравнивание последовательностей геномных мишеней проводили с помощью алгоритма ClustalW¹. Конструирование праймеров осуществляли с помощью сетевого ресурса Integrated DNA Technologies², анализ специфичности проводили с помощью алгоритма BLAST³ (*National Institutes of Health*, США). Последовательности, видоспецифичность, генетические мишени и длина ПЦР-продуктов для всех использованных пар праймеров приведены ниже:

¹ Clustal: Multiple Sequence Alignment. URL: www.clustal.org (дата обращения 15.12.2020 [accessed December 15, 2020]).

² Integrated DNA Technologies. URL: www.idtdna.com (дата обращения 15.12.2020 [accessed December 17, 2020]).

³ Basic Local Alignment Search Tool. URL: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (дата обращения 15.12.2020 [accessed December 15, 2020]).

S. aureus, ген *ebpS*, прямой *ebpS-f* (5'-ACTCGACTGAGGATAAAGCGTCT-3'), обратный *ebpS-r* (5'-CCTCCAAATATCGCTAATGCACC-3'), длина продукта – 283 пар оснований (п.о.), вложенные обратные R1 (5'-NH₂-CCTCCAAATATCGCTAATGCACC-3'), R2 (5'-NH₂-GGTAACAATACTTTGGCCATGCCACC-3'), вложенные прямые F1 (5'-CTGCCGCTTCAAAACCACATGCC-3'), F2 (5'-AAAAGGTGGCATGGCCAAAGT-3'), F3 (5'-AGCAAGTAATAGTGCTTCTGCCG-3').

S. pneumoniae, ген *cpsB*, прямой *cpsB-f1* (5'-TTGATGTAGATGACGGTCCCAAG-3'), обратный *cpsB-r1* (5'-TATATCTCTGCGCCATAAGCAAT-3'), длина ПЦР-продукта – 217 п.о., вложенные обратные R3 (5'-NH₂-TATATCTCTGCGCCATAAGCAAT-3'), R4 (5'-NH₂-CGAACCTGAAGAAAGTTTTCTG-3'), R5 (5'-NH₂-GCAATGACTAAATCATCTGCCAC-3'), вложенные прямые F4 (5'-GCGAACCAATGTCTCTACCTCTC-3'), F5 (5'-TCTACCTCTCACCGTCGCAAGGG-3'), F6 (5'-TGGCAGAATCCTACAGGCAGG-3').

L. pneumophila, ген *sidA*, прямой *sidA-f* (5'-TTCCACTGGTGGGTGGGGTTTTG-3'), обратный *sidA-r* (5'-TCATGTTGGAGTTCTATGGCACG-3'), длина ПЦР-продукта – 369 п.о.

H. influenzae, ген *fucK*, прямой *fucK-f* (5'-TGCTCACTCAACGCTTAACTGGT-3'), обратный *fucK-r* (5'-TTCTGGGCTAATGGGTGTACGTAA-3'), длина ПЦР-продукта – 193 п.о.

P. aeruginosa, ген *oprL*, прямой *oprL-f* (5'-GCGTGCGATCACCACCTTCTACT-3'), обратный *oprL-r* (5'-TTCTTCAGCTCGACGCGACGGTT-3'), длина ПЦР-продукта – 321 п.о.

K. pneumoniae, ген *tmpA*, прямой *tmpA-f* (5'-ATCAATAGCAATTAAGCACAAAA-3'), обратный *tmpA-r* (5'-TCATAATCACACCSTTTAGGATA-3'), длина ПЦР-продукта – 177 п.о.

Мультиплексная ПЦР

Реакционная смесь (30 мкл) содержала 1.5 единиц Taq-полимеразы (*Thermo Scientific*, США) в буфере той же фирмы, dNTP в концентрации 200 мкМ каждого, пять пар специфичных праймеров и полногеномную бактериальную матрицу (либо смесь бактериальных ДНК). Реакцию проводили на ДНК-амплификаторе MiniCycler (*MJResearch*, США) при следующих условиях: 95 °С в течение 5 мин (начальная денатурация); 30 циклов по 20 с при 95 °С, 30 с при 66 °С и 30 с при 72 °С; завершающая инкубация в течение 5 мин при 72 °С. Градиентную ПЦР и определение чувствительности системы с помощью ПЦР в режиме реального времени проводили на амплификаторе IQ5 (*Bio-Rad*, США). Продукты ПЦР разделяли в 4% агарозном геле, окрашивали бромистым этидием. Тип анализируемой ДНК определяли по длинам продуктов амплификации в ультрафиолете.

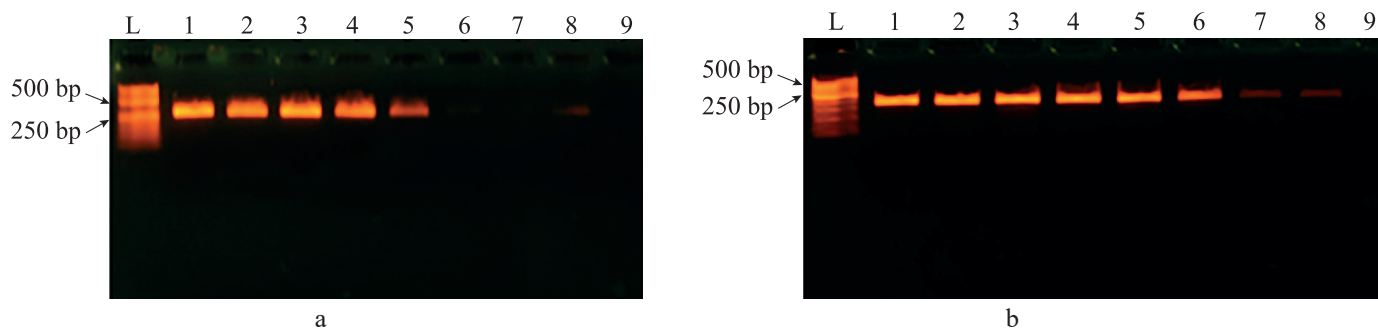


Рис. 1. Электрофореграммы ПЦР-продуктов градиентных ПЦР. L – маркер длин GeneRuler 50bp (*Thermo Scientific*, США). 4% агарозный гель, окрашивание бромистым этидием.

а – *S. aureus*. Температура отжига праймеров, лунка: 1 – 65.0 °С, 2 – 65.6 °С, 3 – 66.5 °С, 4 – 67.7 °С, 5 – 69.5 °С, 6 – 70.8 °С, 7 – 71.7 °С, 8 – 72.0 °С, 9 – отрицательный контроль;

б – *L. pneumophila*. Температура отжига праймеров, лунка: 1 – 57.0 °С, 2 – 58.2 °С, 3 – 60.0 °С, 4 – 62.7 °С, 5 – 66.5 °С, 6 – 69.3 °С, 7 – 71.0 °С, 8 – 72.0 °С, 9 – отрицательный контроль.

Fig. 1. Electropherograms of PCR products of gradient PCR. L – GeneRuler 50bp length marker (*Thermo Scientific*, USA). 4% agarose gel, coloring with ethidium bromide.

(a) *S. aureus*. Primers annealing temperatures: Well 1: 65.0 °С, Well 2: 65.6 °С, Well 3: 66.5 °С, Well 4: 67.7 °С, Well 5: 69.5 °С, Well 6: 70.8 °С, Well 7: 71.7 °С, Well 8: 72.0 °С, Well 9: negative control;

(b) *L. pneumophila*. Primers annealing temperatures: Well 1: 57.0 °С, Well 2: 58.2 °С, Well 3: 60.0 °С, Well 4: 62.7 °С, Well 5: 66.5 °С, Well 6: 69.3 °С, Well 7: 71.0 °С, Well 8: 72.0 °С, Well 9: negative control.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для шести наиболее важных возбудителей пневмонии были выбраны генетические мишени и сконструированы праймеры для осуществления мультиплексной ПЦР [8–16].

При конструировании последовательностей праймеров руководствовались общими требованиями: видовой специфичностью и внутривидовой консервативностью выбранных участков генетических мишеней. Вручную были выбраны участки для отжига праймеров, учитывалась также необходимость получения различных длин ПЦР-продуктов для удобства последующей детекции возбудителей электрофоретическим разделением. Для каждой олигонуклеотидной последовательности определяли физико-химические характеристики, проводили процедуру BLAST-анализа и исследовали на предмет образования димеров, шпилек и других вторичных структур.

В качестве первоначальных условий амплификации для последующей оптимизации были выбраны следующие значения: денатурация при 95 °С и 30 циклов по 20 с при 95 °С, 30 с при 57 °С и 30 с при 72 °С. Для возбудителей *S. aureus* и *L. pneumophila* проводили градиентные «моноплексные» ПЦР, по результатам которых увеличили температуру отжига до 66 °С (рис. 1).

В новом температурно-временном цикле проводили «моноплексные» варианты ПЦР для остальных четырех возбудителей, проверяя работу праймеров и сверяя длины ПЦР-продуктов с теоретическими, после чего в режиме смеси ДНК-матриц (рис. 2)

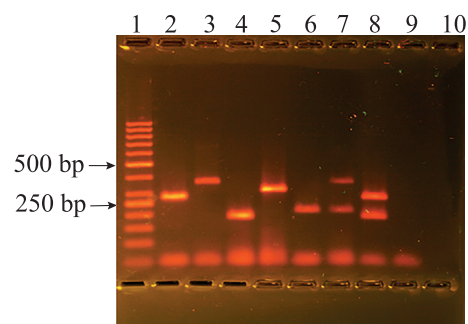


Рис. 2. Электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов мультиплексной ПЦР со смесью праймеров. 1 – маркер длин GeneRuler 50bp (*Thermo Scientific*, США), 2 – *S. aureus*, 3 – *L. pneumophila*, 4 – *H. influenzae*, 5 – *P. aeruginosa*, 6 – *S. pneumoniae*, 7 – *L. pneumophila* + *S. pneumoniae*, 8 – *S. pneumoniae* + *H. Influenzae* + *S. aureus*. 4% агарозный гель, окрашивание бромистым этидием.

Fig. 2. Electrophoretic separation of PCR products by multiplex PCR with a mixture of primers.

(1) GeneRuler 50bp length marker (*Thermo Scientific*, USA), (2) *S. aureus*, (3) *L. pneumophila*, (4) *H. influenzae*, (5) *P. aeruginosa*, (6) *S. pneumoniae*, (7) *L. pneumophila* + *S. pneumoniae*, (8) *S. pneumoniae* + *H. Influenzae* + *S. aureus*.

The PCR products were separated in 4% agarose gel and colored with ethidium bromide.

нескольких возбудителей подтверждали их специфичность и способность выявлять только «свои» возбудители, не давая ложноположительных результатов.

Результат дифференциального обнаружения ДНК возбудителя в образце методом мультиплексной ПЦР показан на рис. 3.

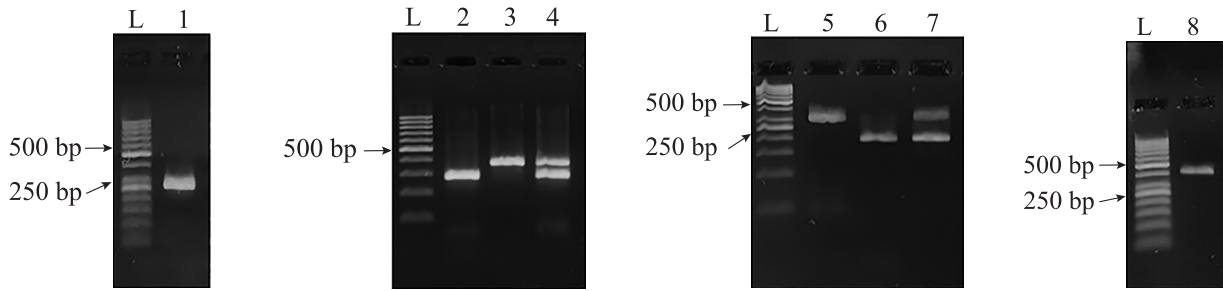


Рис. 3. Определение ДНК возбудителя электрофоретическим разделением ПЦР-продуктов. L – маркер длин GeneRuler 50bp (*Thermo Scientific*, США), 1 – *S. pneumoniae*, 2 – *S. aureus*, 3 – *L. pneumophila*, 4 – *S. aureus* + *L. pneumophila*, 5 – *H. influenzae*, 6 – *P. aeruginosa*, 7 – *H. influenzae* + *P. aeruginosa*, 8 – *K. pneumoniae*. 4% агарозный гель, окрашивание бромистым этидием.

Fig. 3. Determination of the pathogen DNA by electrophoretic separation of PCR products. L – GeneRuler 50bp length marker (*Thermo Scientific*, USA), (1) *S. pneumoniae*, (2) *S. aureus*, (3) *L. pneumophila*, (4) *S. aureus* + *L. pneumophila*, (5) *H. influenzae*, (6) *P. aeruginosa*, (7) *H. influenzae* + *P. aeruginosa*, (8) *K. pneumoniae*. The PCR products were separated in 4% agarose gel and colored with ethidium bromide.

Для *S. aureus* и *S. pneumoniae* были сконструированы специфичные праймеры для последующей иммобилизации на биочипе с включением флуоресцентно-меченных нуклеотидов в иммобилизованную растущую цепь, в разработке также руководствовались вышеописанными принципами. Высокая чувствительность сконструированных для иммобилизации праймеров была подтверждена ПЦР в объеме, проводимой в условиях оптимального температурно-временного профиля, выявленного ранее. Результаты «моноплексных» ПЦР в объеме для *S. aureus* и *S. pneumoniae* представлены на рис. 4 и 5. Из фореграмм видно, что длины ПЦР-продуктов, получаемых с применением различных комбинаций праймеров, хорошо соответствуют теоретическим.

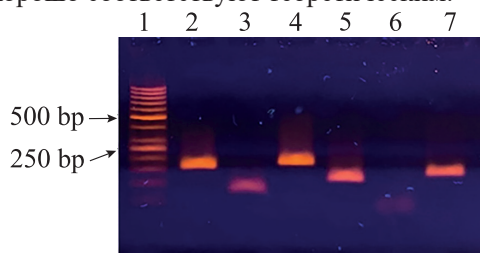


Рис. 4. Электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов *S. aureus*. 1 – маркер длин GeneRuler 50bp (*Thermo Scientific*, США), 2 – R1+F1 (163 пар оснований (п.о.)), 3 – R1+F2 (78 п.о.), 4 – R1+F3 (180 п.о.), 5 – R2+F1 (115 п.о.), 6 – R2+F2 (30 п.о.), 7 – R2+F3 (132 п.о.). Литерами «R» и «F» с цифровым индексом обозначены различные праймеры, в скобках указана теоретическая длина соответствующего ПЦР-продукта.

Fig. 4. Electrophoretic separation of *S. aureus* PCR products. (1) GeneRuler 50bp length marker (*Thermo Scientific*, USA), (2) R1 + F1 (163 base pairs (bp)), (3) R1 + F2 (78 bp), (4) R1 + F3 (180 bp), (5) R2 + F1 (115 bp), (6) R2 + F2 (30 bp), (7) R2 + F3 (132 bp).

The letters “R” and “F” indicate the numerical indexes used to designate various primers. The theoretical length of the corresponding PCR product is indicated in parentheses.

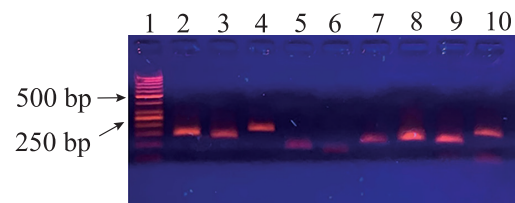


Рис. 5. Электрофоретическое разделение ПЦР-продуктов *S. pneumoniae*. 1 – маркер длин GeneRuler 50bp (*Thermo Scientific*, США); 2 – R3+F4 (144 п.о.); 3 – R3+F5 (131 п.о.); 4 – R3+F6 (169 п.о.); 5 – R4+F4 (87 п.о.); 6 – R4+F5 (74 п.о.); 7 – R4+F6 (112 п.о.); 8 – R5+F4 (126 п.о.); 9 – R5+F5 (113 п.о.); 10 – R5+F6 (151 п.о.). Литерами «R» и «F» с цифровым индексом обозначены различные праймеры, в скобках указана теоретическая длина соответствующего ПЦР-продукта.

Fig. 5. Electrophoretic separation of PCR products of *S. pneumoniae*. (1) GeneRuler 50bp length marker (*Thermo Scientific*, USA); (2) R3 + F4 (144 bp); (3) R3 + F5 (131 bp); (4) R3 + F6 (169 bp); (5) R4 + F4 (87 bp); (6) R4 + F5 (74 bp); (7) R4 + F6 (112 bp); (8) R5 + F4 (126 bp); (9) R5 + F5 (113 bp); (10) R5 + F6 (151 bp). The letters “R” and “F” indicate the numerical indexes used to designate various primers. The theoretical length of the corresponding PCR product is indicated in parentheses.

При анализе фореграмм, праймеры, проявляющие недостаточную чувствительность или специфичность, повторно анализировали на наличие вторичных структур (как внутримолекулярных, так и межмолекулярных). При невозможности внесения коррекции путем «сдвига» праймера по комплементарной цепи либо варьирования его длины или температуры плавления для изменения образуемых структур, праймер заменяли на вновь сконструированный.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана и оптимизирована ПЦР для одновременного обнаружения шести клинически важных бактериальных возбудителей пневмонии человека.

В настоящее время ведется конструирование праймеров для иммобилизации, а также разрабатывается тест-система на основе биочипов, которая в будущем может иметь расширенный спектр диагностируемых патогенных агентов инфекционной пневмонии и применяться в ускоренной клинической диагностике.

Благодарности

Исследование поддержано грантом Российского научного фонда № 20-14-00287.

Acknowledgments

The study was supported by the Russian Science Foundation grant No. 20-14-00287.

Вклад авторов

Е.С. Ключихина – проведение исследований, подготовка рукописи.

В.Е. Шершов – синтез флуоресцентно-меченных дНТФ.

В.Е. Кузнецова – синтез флуоресцентно-меченных дНТФ.

С.А. Лапа – планирование экспериментов, редактирование рукописи.

А.В. Чудинов – научное консультирование.

Authors' contribution

E.S. Klochikhina – research, preparation of the manuscript.

V.E. Shershov – synthesis of fluorescently labeled dNTPs.

V.E. Kuznetsova – synthesis of fluorescently labeled dNTPs.

S.A. Lapa – planning experiments, editing the manuscript.

A.V. Chudinov – academic advising.

Авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

The authors declare no conflicts of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Nair G.B., Niederman M.S. Community-acquired pneumonia: an unfinished battle. *Med. Clin. North Am.* 2011;95(6):1143–1161. <https://doi.org/10.1016/j.mcna.2011.08.007>

2. Harris M., Clark J., Coote N., Fletcher P., Harnden A., McKean M., Thomson A. British Thoracic Society Standards of Care Committee. British Thoracic Society guidelines for the management of community acquired pneumonia in children: update 2011. *Thorax.* 2011;66:ii1–ii23(Suppl. 2). <https://doi.org/10.1136/thoraxjnl-2011-200598>

3. Rawson T.M., Wilson R.C., Holmes A. Understanding the role of bacterial and fungal infection in COVID-19. *Clin. Microbiol. Infect.* 2021;27(1):9–11. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.09.025>

4. Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Козлов Р.С., Авдеев С.Н., Тюрин И.Е., Руднов В.А., Рачина С.А., Фесенко О.В. Российское респираторное общество (РРО) Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ) Клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике тяжелой внебольничной пневмонии у взрослых. *Пульмонология.* 2014;(4):13–48. <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2014-0-4-13-48>

[Chuchalin A.G., Sinopal'nikov A.I., Kozlov R.S., Avdeev S.N., Tyurin I.E., Rudnov V.A., Rachina S.A., Fesenko O.V. Russian Respiratory Society Interregional association on clinical microbiology and antimicrobial chemotherapy Clinical guidelines on diagnosis, treatment and prevention of severe community acquired pneumonia in adults. *PULMONOLOGIYA.* 2014;(4):13–48 (in Russ.). <https://doi.org/10.18093/0869-0189-2014-0-4-13-48>]

5. Тартаковский И.С. Современные подходы к диагностике атипичных пневмоний. *Клинич. Микробиол. и Антимикроб. Химиотер.* 2000;2(1):60–68. URL: <https://cmac-journal.ru/publication/2000/1/cmacc-2000-t02-n1-p060/cmacc-2000-t02-n1-p060.pdf>

[Tartakovskii I.S. Modern approaches to the diagnosis of atypical pneumonia. *Klin. Mikrobiol. Antimikrob. Khimioterap. = Clin. Microbiol. Antimicrob. Chemotherapy.* 2000;2(1):60–68 (in Russ.). Available from URL: <https://cmac-journal.ru/en/publication/2000/1/cmacc-2000-t02-n1-p060/cmacc-2000-t02-n1-p060.pdf>]

6. Бруснигина Н.Ф., Мазепа В.Н., Самохина Л.П. и др. Этиологическая структура внебольничной пневмонии. *Мед. Альманах.* 2009;2(7):118–121.

[Brusnigina N.F., Mazepa V.N., Samokhina L.P., et al. Etiological structure of community-acquired pneumonia. *Med. Almanakh = Med. Alm.* 2009;2(7):118–121 (in Russ.).]

7. Doyle J.J., Doyle J.L. A Rapid DNA Isolation Procedure for Small Quantities of Fresh Leaf Tissue. *Phytochemical Bulletin.* 1987;19(1):11–15.

8. Morona J.K., Morona R., Miller D.C., Paton J.C. *Streptococcus pneumoniae* capsule biosynthesis protein CpsB is a novel manganese-dependent phosphotyrosine-protein phosphatase. *J. Bacteriol.* 2002;184(2):577–583. <https://doi.org/10.1128/JB.184.2.577-583.2002>

9. Liu Y., Cao Y., Wang T., Dong Q., Li J., Niu C. Detection of 12 Common Food-Borne Bacterial Pathogens by TaqMan Real-Time PCR Using a Single Set of Reaction Conditions. *Front Microbiol.* 2019;10:222. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00222>

10. Xirogianni A., Tzanakaki G., Karagianni E., Markoulatos P., Kourea-Kremastinou J. Development of a single-tube polymerase chain reaction assay for the simultaneous detection of *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Streptococcus* spp. directly in clinical samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2009;63(2):121–126. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2008.09.017>

11. Huletsky A., Giroux R., Rossbach V., Gagnon M., Vaillancourt M., Bernier M., Gagnon F., Truchon K., Bastien M., Picard F.J., van Belkum A., Ouellette M., Roy P.H., Bergeron M.G. New real-time PCR assay for rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from specimens containing a mixture of staphylococci. *J. Clin. Microbiol.* 2004;42(5):1875–1884. <https://doi.org/10.1128/JCM.42.5.1875-1884.2004>

12. Morrison K.E., Lake D., Crook J., Carlone G.M., Ades E., Facklam R., Sampson J.S. Confirmation of *psaA* in all 90 serotypes of *Streptococcus pneumoniae* by PCR and potential of this assay for identification and diagnosis. *J. Clin. Microbiol.* 2000;38(1):434–437. <https://doi.org/10.1128/jcm.38.1.434-437.2000>

13. Binks M.J., Temple B., Kirkham L.-A., Wiertsema S.P., Dunne E.M., *et al.* Molecular Surveillance of True Nontypeable *Haemophilus influenzae*: An Evaluation of PCR Screening Assays. *PLoS ONE.* 2012;7(3):e34083. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034083>

14. De Vos D., Lim A.Jr., Pirnay J.P., *et al.* Direct detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* in clinical samples such as skin biopsy specimens and expectorations by multiplex PCR based on two outer membrane lipoprotein genes, *oprI* and *oprL*. *J. Clin. Microbiol.* 1997;35(6):1295–1299. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.6.1295-1299.1997>

15. Tabatabaei M., Hemati Z., Moezzi M.O., Azimzadeh N. Isolation and identification of *Legionella* spp. from different aquatic sources in south-west of Iran by molecular & culture methods. *Mol. Biol. Res. Commun.* 2016;5(4):215–223. <https://dx.doi.org/10.22099/mbr.2016.3858>

16. Turton J.F., Perry C., Elgohari S., Hampton C.V. PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets. *J. Med. Microbiol.* 2010;59(5):541–547. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.015198-0>

Об авторах:

Клочихина Екатерина Сергеевна, лаборант, ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, д. 32). E-mail: arctickate@yandex.ru. <https://orcid.org/0000-0002-9485-3068>

Шершов Валерий Евгеньевич, научный сотрудник, ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, д. 32). E-mail: shershov@list.ru. <https://orcid.org/0000-0003-3308-7133>

Кузнецова Виктория Евгеньевна, к.х.н., научный сотрудник, ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, д. 32). E-mail: kuzneimb@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-8204-4132>

Лапа Сергей Анатольевич, к.б.н., старший научный сотрудник, ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, д. 32). E-mail: lapa@biochip.ru. Scopus Author ID 6603461000, <https://orcid.org/0000-0002-9011-134X>

Чудинов Александр Васильевич, к.х.н., заведующий лабораторией, ФГБУН Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, д. 32). E-mail: chud@eimb.ru. Scopus Author ID 7003833018, <https://orcid.org/0000-0001-5468-4119>

About the authors:

Ekaterina S. Klochikhina, Laboratory Assistant, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences (32, Vavilova ul., Moscow, 119991, Russia). E-mail: arctickate@yandex.ru. <https://orcid.org/0000-0002-9485-3068>

Valeriy E. Shershov, Researcher, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences (32, Vavilova ul., Moscow, 119991, Russia). E-mail: shershov@list.ru. <https://orcid.org/0000-0003-3308-7133>

Viktoria E. Kuznetsova, Cand. Sci. (Chem.), Researcher, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences (32, Vavilova ul., Moscow, 119991, Russia). E-mail: kuzneimb@gmail.com. <https://orcid.org/0000-0002-8204-4132>

Sergey A. Lapa, Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences (32, Vavilova ul., Moscow, 119991, Russia). E-mail: lapa@biochip.ru. Scopus Author ID 6603461000, <https://orcid.org/0000-0002-9011-134X>

Alexander V. Chudinov, Cand. Sci. (Chem.), Head of the Laboratory, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences (32, Vavilova ul., Moscow, 119991, Russia). E-mail: chud@eimb.ru. Scopus Author ID 7003833018, <https://orcid.org/0000-0001-5468-4119>

Поступила: 23.03.2021; получена после доработки: 11.04.2021; принята к опубликованию: 28.05.2021.
The article was submitted: March 23, 2021; approved after reviewing: April 11, 2021; accepted for publication: May 28, 2021.