

МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОПАСНЫХ И ОСОБО ОПАСНЫХ ИНФЕКЦИОННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ, ОСНОВАННЫЕ НА АНАЛИЗЕ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Я.А. Кибирев, С.Е. Бурлачук, А.С. Грудцына,

Д.О. Ситяков, С.Г. Исупов, В.И. Дробков

Филиал федерального государственного бюджетного учреждения
«48 Центральный научно-исследовательский институт»
Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров), 610000,
Российская Федерация, г. Киров, Октябрьский проспект, д. 119

Поступила 17.07.2018 г. Принята к публикации 15.10.2018 г.

Одной из основных задач войск радиационной, химической и биологической защиты при установлении факта биологического заражения является точная и быстрая идентификация вызвавшего заражение возбудителя инфекционной болезни. Среди современных способов идентификации опасных и особо опасных патогенных микроорганизмов этим требованиям наиболее полно удовлетворяют способы, основанные на анализе нуклеиновых кислот. Наиболее пригодным из них для индикации с начальной идентификацией считается метод амплификации ДНК посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для регистрации результатов ПЦР используют электрофоретическое разделение продуктов амплификации, а также детекцию флуоресцентного сигнала по конечной точке (вариант FLASH) или в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Рассмотрены другие варианты амплификации фрагментов ДНК, включая лигазную цепную реакцию (ЛЦР) и изотермическую амплификацию. В статье также описаны способы идентификации микроорганизмов, основанные на секвенировании нуклеиновых кислот, такие как метод мультилокусного сиквенс-типирования (МЛСТ), секвенирование отдельных генов, полногеномное секвенирование. Сделан вывод о том, что выбор методов идентификации микроорганизмов необходимо осуществлять, исходя из целей и задач, материальной базы лаборатории, наличия обученного персонала и объемов финансирования. Несмотря на то, что наиболее информативными являются методы, основанные на секвенировании нуклеотидных последовательностей, в силу своих технологических требований пока их реализация в полевых условиях затруднена.

Ключевые слова: изотермическая амплификация; лигазная цепная реакция; методы идентификации микроорганизмов; мультилокусное сиквенс-типирование; мультилокусный анализ переменных тандемных повторов; полимеразная цепная реакция; полногеномное секвенирование; секвенирование отдельных генов; термостат-амплификатор; флуоресцентные зонды.

Библиографическое описание: Кибирев Я.А., Бурлачук С.Е., Грудцына А.С., Ситяков Д.О., Исупов С.Г., Дробков В.И. Методы идентификации возбудителей опасных и особо опасных инфекционных заболеваний, основанные на анализе нуклеиновых кислот // Вестник войск РХБ защиты. 2018. Т. 2. № 4. С. 22–35.

Идентификация возбудителей инфекционных заболеваний бактериальной природы с минимальными затратами времени и сил – одна

из основных задач биологической защиты войск и населения Российской Федерации. Это особенно актуально в связи с усилением угрозы

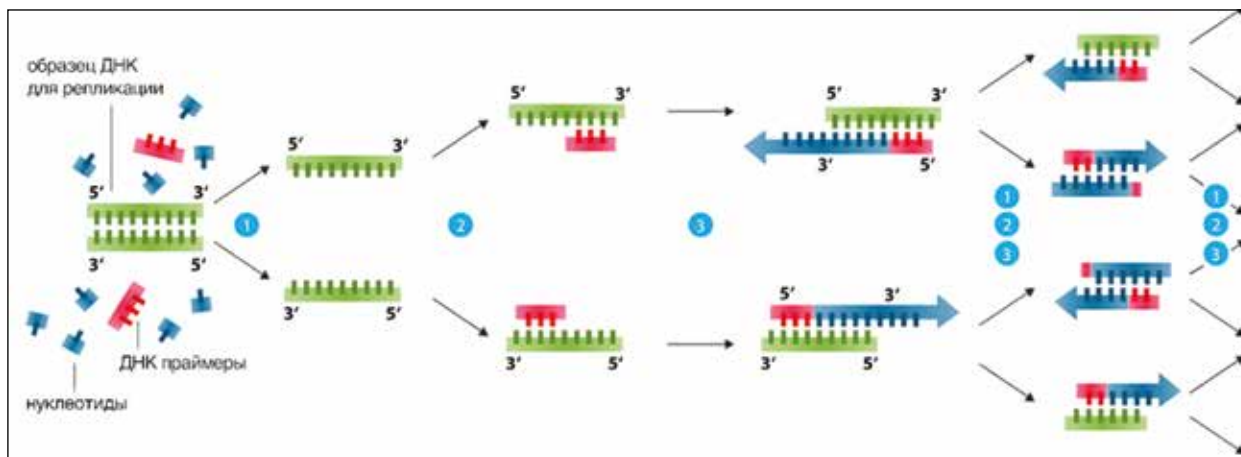


Рисунок 1 – Схема полимеразной цепной реакции

(1 – денатурация при температуре 94–96 °С; 2 – отжиг (гибридизация); 3 – элонгация при 72 °С) [8]

возникновения и распространения опасных и особо опасных инфекций в результате неблагоприятной эпидемической ситуации в мире, наличия природных очагов опасных и особо опасных инфекций на территории Российской Федерации и сопредельных государств, а также функционирования биологически опасных объектов [1–3]. Решение данной задачи непосредственно зависит от наличия эффективных методов идентификации микроорганизмов.

Идентификация микроорганизмов требует использования целого комплекса методов, наиболее информативными из которых являются молекулярно-генетические. Глубина анализа определяется только возможностью и/или целесообразностью привлечения для его проведения дополнительных сил и средств, а также затраченным на всесторонний анализ временем. В процессе идентификации на основании генетических особенностей бактерий устанавливается их видовая и штаммовая принадлежность, наличие или отсутствие генетических детерминант патогенности и т.п. Возможно также установление первоначального источника, из которого произошло заражение, определение эпидемической значимости патогенных бактерий и т.д.

Цель работы – представить методы, основанные на анализе нуклеиновых кислот, которые могут быть использованы для идентификации возбудителей опасных и особо опасных инфекционных заболеваний.

С конца XX века основным молекулярно-генетическим методом, пригодным для целей индикации с начальной идентификацией, является метод амплификации ДНК посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР) [4–7]. Основанная на прямом выявлении специфических нуклеотидных последовательностей в геноме микроорганизмов, не требующая выделения чистой микробной культуры, позволяющая выявлять нежизнеспособные и мертвые, а также феноти-

пически измененные формы микроорганизмов, ПЦР и в настоящее время является одним из основных методов решения задач молекулярной диагностики.

Метод ПЦР с некоторыми отступлениями имитирует естественный процесс копирования ДНК в клетке с участием специального фермента термостабильной ДНК-полимеразы, а также отдельных элементов ДНК – нуклеотидов, необходимых для построения новой ДНК.

При проведении ПЦР копируется не вся ДНК бактерии, а только ее определенная часть, ограниченная находящимися в реакционной смеси праймерами – короткими одноцепочечными синтетическими олигонуклеотидами, комплементарными концевым участкам амплифицируемой области генома микроорганизмов [8]. Схема ПЦР представлена на рисунке 1.

Еще одно отличие от естественного процесса – многократное копирование ДНК в ходе одной реакции. Это обеспечивается благодаря использованию фермента термостабильной ДНК-полимеразы и быстрой циклической сменой температуры реакционной смеси, обеспечиваемой специализированным программируемым термостатом-амплификатором.

С каждым завершенным температурным циклом количество амплифицированных фрагментов ДНК в реакционной смеси увеличивается. В результате к последнему циклу накапливается количество ДНК, достаточное для ее выявления.

Регистрацию результатов ПЦР-анализа в классическом варианте проводят с помощью метода электрофореза в агарозном геле. Реакционная смесь после проведения ПЦР вносится в специальные лунки в агарозном геле. Молекулы ДНК, содержащиеся в реакционной смеси, движутся внутри геля под действием электрического поля со скоростью, зависящей от их размера.

Визуализацию результатов электрофоретического разделения находящихся в реакционной

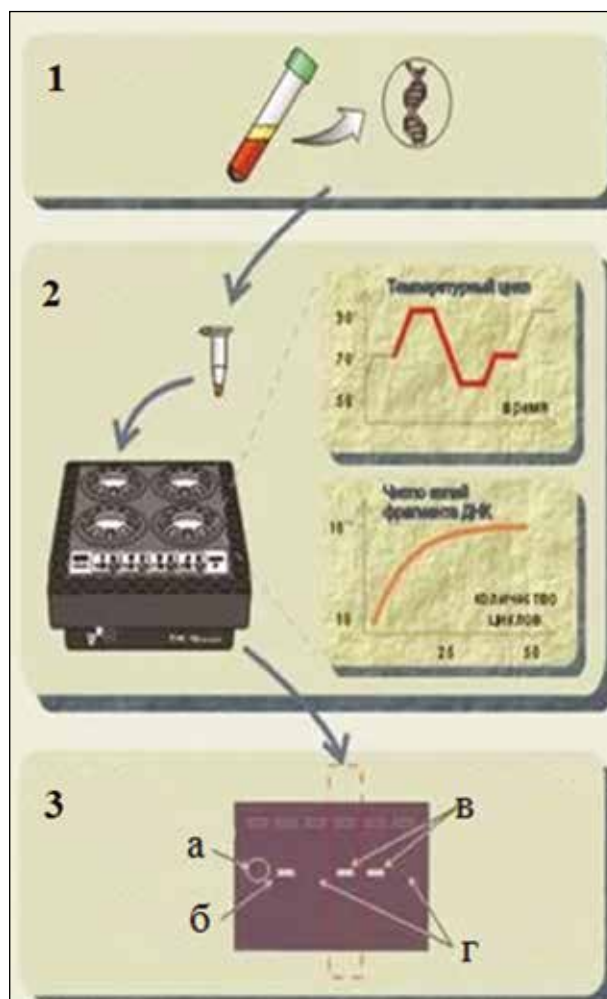


Рисунок 2 – Стадии полимеразной цепной реакции (1 – выделение ДНК; 2 – амплификация; 3 – детекция результатов в агарозном геле, где а – отрицательный контроль, б – положительный контроль, в – положительные образцы, г – отрицательные образцы)¹

¹ URL: <https://studfiles.net/preview/38870-62/page:18>

смеси молекул ДНК осуществляют с использованием специальных флуоресцентных красителей, специфически связывающихся с нуклеиновыми кислотами. При этом определяют наличие амплификата, а также его расчетный размер (по стандартным образцам). Рассмотренные стадии ПЦР представлены на рисунке 2.

Для повышения точности и информативности ПЦР в некоторых случаях могут использоваться различные модификации этого метода [5, 6].

В частности, при подборе соответствующей комбинации олигонуклеотидных праймеров возможно одномоментное, в ходе одной реакции, выявление нескольких генетических детерминант, что позволяет расширить объем получаемой информации, например, определить вид микроорганизма и одновременно оценить его эпидемическую значимость.

При невозможности обеспечить требуемый уровень специфичности возможно проведение так называемой гнездовой ПЦР, в которой последовательно используют две пары праймеров [2]. При этом сначала первой парой праймеров амплифицируется более протяженный участок гена, после чего второй парой праймеров копируется участок гена, расположенный внутри ранее амплифицированной последовательности ДНК.

Еще один метод, используемый для идентификации микроорганизмов и основанный на ПЦР – мультилокусный анализ переменных тандемных повторов (Multilocus variable number tandem repeat analysis – MLVA) [9]. Этот метод использует вариабельность, характерную для участков ДНК, содержащих так называемые тандемные повторы. Участки ДНК, содержащие повторы, часто копируются в бактериальных клетках с ошибками за счет такого явления, как проскальзывание вилок репликации («slipped strand mispairing»). В результате регион удлиняется или укорачивается за счет делеций или инсерций отдельных повторов. Эта изменчивость ДНК может быть легко оценена с помощью ПЦР с фланкирующими праймерами и измерения длины ПЦР-продукта. В случае протяженных повторов для регистрации результатов может быть использован обычный электрофорез в агарозном геле, однако в случае небольших повторов требуется применение более сложных методов (капиллярный электрофорез высокого разрешения или масс-спектрометрия). Количество повторов для каждого из проанализированных локусов преобразуют в цифровой код – своеобразный «генетический шифр», идентифицирующий изучаемую культуру микроорганизма. Выявление отличающихся цифровых кодов у культур бактерий одного вида свидетельствует об их принадлежности к разным штаммам. Совпадение профилей переменных тандемных повторов (VNTR-профили) исследуемых проб с большей долей вероятности указывает на один штамм.

MLVA в настоящее время успешно применяется для типирования самых разных микроорганизмов [9, 10]. В качестве определенного недостатка метода можно указать необходимость подбора локусов переменных тандемных повторов для каждого вида микроорганизмов в отдельности. Они должны соответствовать следующим критериям: вариабельность, но не гипермутабельность; размер от 10 до 100 п.н.; маленькие повторы, локусы с большим количеством повторов и большие повторы нежелательны; также желательно, чтобы они находились в генетически нейтральных областях во избежание искажения картины вследствие эволюционного давления.

На сегодняшний день существует большое количество баз данных, содержащих информацию о VNTR-профилях различных микроорганизмов. Так, база данных «Genomes, Polymorphisms and MiniSatellites» (GPMS) содержит VNTR-профили около 2000 изолятов *Yersinia pestis*, более 500 – *Bacillus anthracis*, до 1500 – *Yersinia pseudotuberculosis* и т.д.

Ограничение данных методов состоит в том, что различие в VNTR-профилях непосредственно не раскрывает природы, локализации и биологического смысла различия. Так, например, «молчащая» мутация, не приводящая к замене аминокислоты и изменению свойств белка, вполне может привести к изменениям, выявляемым этими методами. Кроме того, методы получения паттернов трудно стандартизовать, а степень их различия не всегда пропорциональна реальной степени различия штаммов.

Несмотря на относительную простоту и универсальность метода, наличие отдельного этапа регистрации результатов ПЦР увеличивает общее время анализа и требует большого количества выполняемых оператором действий. Это повышает вероятность ошибки оператора и, что важнее, значительно повышает риск контаминации оборудования и помещения продуктами амплификации из-за необходимости переноса реакционной смеси из пробирок в агарозный гель, что в дальнейшем может привести к появлению ложноположительных результатов.

Эти недостатки классической ПЦР были преодолены за счет использования для регистрации результатов ПЦР флуоресцентной метки [5, 11]. Существуют две основные модификации метода: регистрация флуоресценции по конечной точке (формат FLASH) и регистрация в режиме реального времени (ПЦР-РВ) (рисунок 3).

Наиболее часто используется вариант ПЦР-РВ, при котором в реакционную смесь вводят третий праймер – зонд, к концам которого ковалентно присоединены молекулы флуорофора и гасителя флуоресценции [11].

В обычном состоянии флуорофор и гаситель флуоресценции на концах этого зонда располагаются вблизи друг от друга и флуоресценции не наблюдается. Во время ПЦР праймеры и зонд присоединяются к ДНК, а фермент ДНК-полимераза расщепляет зонд, находящийся на пути синтеза новой цепи ДНК. Молекулы гасителя и источника флуоресценции при этом освобождаются и становится возможной регистрация флуоресцентного сигнала. Упрощенная схема реакции показана на рисунке 4.

С каждым новым циклом ПЦР освобождаются новые молекулы флуорофора, что приводит к усилению свечения реакционной смеси в геометрической прогрессии. Такая модификация



Рисунок 3 – Различные способы детекции результатов при осуществлении полимеразной цепной реакции (1 – выделение нуклеиновых кислот; 1.1 – обратная транскрипция; 2 – постановка классической ПЦР или ПЦР-РВ; 3 – детекция результатов в формате FLASH или методом электрофореза)¹

¹ URL: <http://agrodiagnostica.ru/pcr/aboutpcr/>

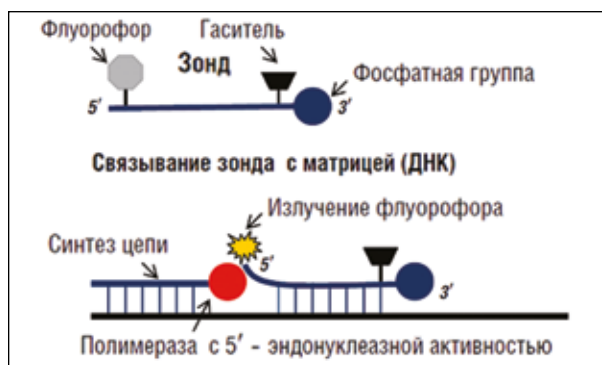


Рисунок 4 – Схема процесса ПЦР-РВ¹

¹ URL: <http://present5.com/sovremennymolekulyarnogeneticheskiye-metody-taraskina-anastasiya-evgenevna-zaveduyushaya-nil/>

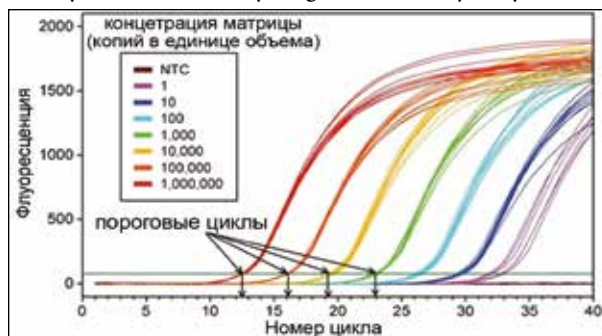


Рисунок 5 – График накопления ДНК в ходе ПЦР-РВ [11]

ПЦР позволяет регистрировать флуоресцентный сигнал непосредственно в пробирке после окончания каждого цикла ПЦР-РВ (рисунок 5) [11].

Единственными условиями для проведения ПЦР-РВ являются наличие специализированных тест-систем и специального прибора – амплификатора, совмещенного с флуориметром. Использование данного прибора для амплификации и регистрации результатов позволяет осуществлять количественный анализ исследуемой пробы, сокращает время анализа, снижает вероятность ошибки оператора и практически исключает риск контаминации оборудования и помещения продуктами амплификации.

Упрощенный вариант ПЦР с детекцией флуоресцентного сигнала – ПЦР в формате Flash [12]. В этом случае амплификация осуществляется на обычном приборе – амплификаторе, а детекция результатов ПЦР производится на специализированном флуоресцентном детекторе. При этом теряется возможность количественного учета результатов ПЦР, однако сокращается по сравнению с электрофоретическим разделением время анализа, снижается вероятность ошибки оператора и риск контаминации оборудования и помещения продуктами амплификации.

Помимо ПЦР, существуют и другие методы, основанные на амплификации ДНК, в частности, лигазная цепная реакция (ЛЦР, LCR – Ligase chain reaction) [13]. Схема ЛЦР представлена на рисунке 6.

Метод ЛЦР основан на последовательных циклах лигирования (соединения) олигонуклеотидных зондов в присутствии фермента ДНК-лигазы. Зонды – короткие цепи ДНК, синтезированные искусственно, подбираются таким образом, чтобы они могли присоединяться к одной и той же цепи ДНК-матрицы встык друг с другом. Любое нарушение гомологии (сродства) зондов с матричной цепью ДНК в области их соединения сразу же предотвращает лигирование.

Существуют различные модификации ЛЦР, в частности, ЛЦР с заполнением бреши, в ходе которой праймеры гибридизуются (соединяются) с ДНК-матрицей на некотором расстоянии друг от друга. Образующаяся брешь застраивается с помощью фермента ДНК-полимеразы, а затем фермент ДНК-лигаза осуществляет лигирование полученных цепочек ДНК в месте стыка.

Особый интерес представляют реакции амплификации ДНК, протекающие в изотермических условиях: амплификация с вытеснением цепи, кольцевая амплификация, амплификация с множественным вытеснением, кросс-праймерная амплификация, полимеразная спиральная реакция, петлевая амплификация и другие [14–26].

Общей особенностью методов изотермической амплификации является то, что при их проведении не требуется циклическая смена температур. Это позволяет отказаться от использования амплификаторов, заменив их простыми термостатами.

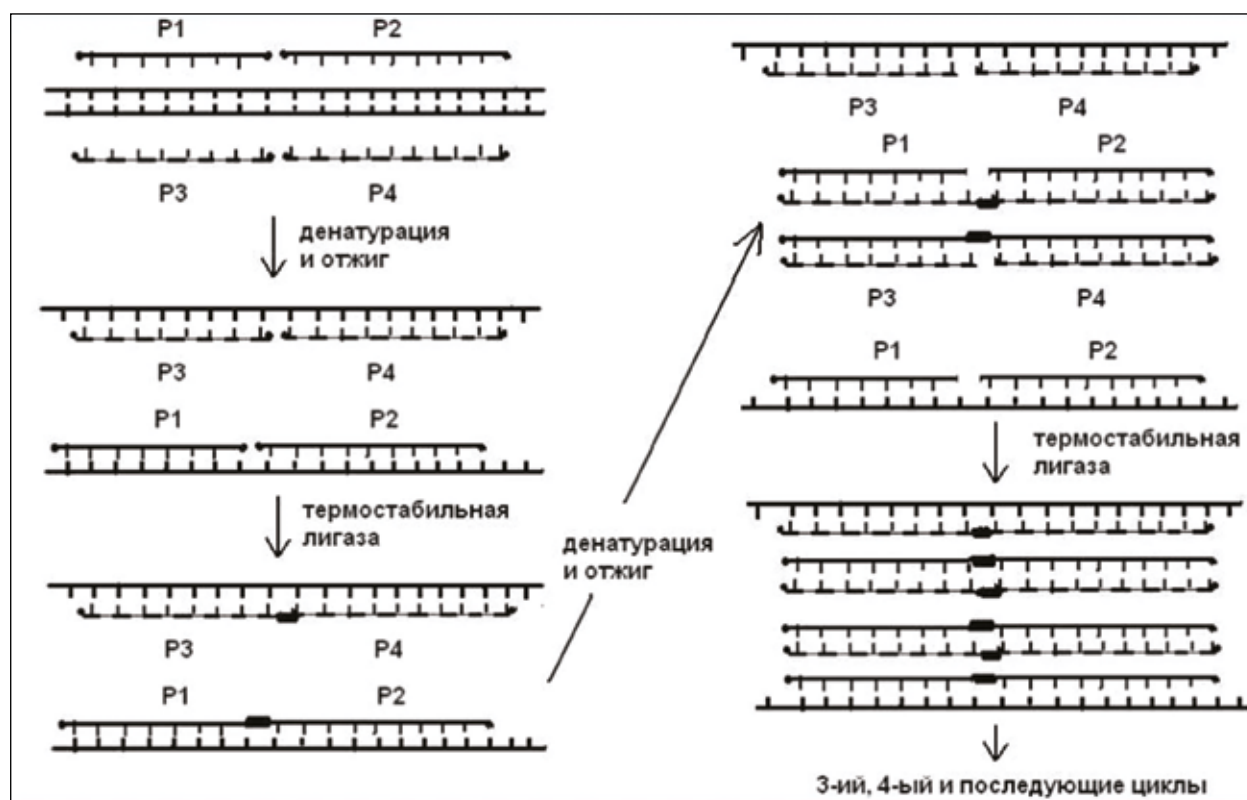


Рисунок 6 – Схема лигазной цепной реакции (P1, P2, P3, P4 – олигонуклеотидные зонды) [13]

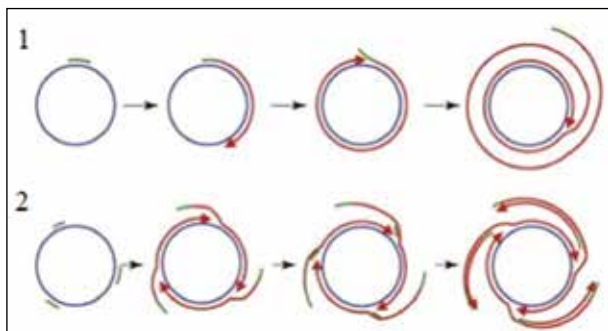


Рисунок 7 – Схема кольцевой амплификации
(1 – с одного праймера; 2 – с нескольких праймеров)
(одноцепочечная ДНК-матрица выделена синим,
праймер – зеленым, вновь синтезированная цепь
ДНК – красным) [18, 19]

Кольцевая амплификация используется для молекулярной диагностики различных инфекционных заболеваний, при поиске нуклеотидных полиморфизмов, применяется для анализа экспрессии генов, амплификации целых геномов и приготовления матрицы для секвенирования [18, 19]. Схема кольцевой амплификации представлена на рисунке 7.

На первом этапе амплификации происходит гибридизация одного или нескольких праймеров на кольцевую матрицу и элонгация с этих праймеров. При этом ДНК-полимераза, полностью амплифицировав матрицу, начинает вытеснять *de novo* синтезированную цепь. Со вновь синтезированной цепью могут снова гибридизироваться праймеры, с которых также идет элонгация.

Другой разновидностью изотермической амплификации является амплификация с множественным вытеснением цепи [16, 20] (рисунок 8).

На первом этапе амплификации происходит гибридизация одного или нескольких праймеров с матричной цепью ДНК и элонгация этих праймеров. При этом ДНК-полимераза, дойдя до 5'-конца следующего праймера, начинает его вытеснять вместе с *de novo* синтезированной цепью. С вновь синтезированной цепью могут гибридизироваться праймеры, которые элонгируются, и так далее.

Несмотря на очевидные преимущества метода, изотермическая амплификация до недавнего времени не нашла широкого распространения на практике, что связано с ее меньшей чувствительностью и большей частотой неспецифических результатов по сравнению с ПЦР. Тем не менее совершенствование методов изотермической амплификации продолжается. В последние несколько лет появились системы цифровой изотермической амплификации [27–30]. Цифровая амплификация, основана на многократном разведении ДНК-матрицы и ее амплификации с единичной молекулы ДНК в каждом реакционном объеме, что позволяет получать результаты, сопоставимые с ПЦР.

Помимо методов, основанных на амплификации ДНК, существуют подходы, позволяющие

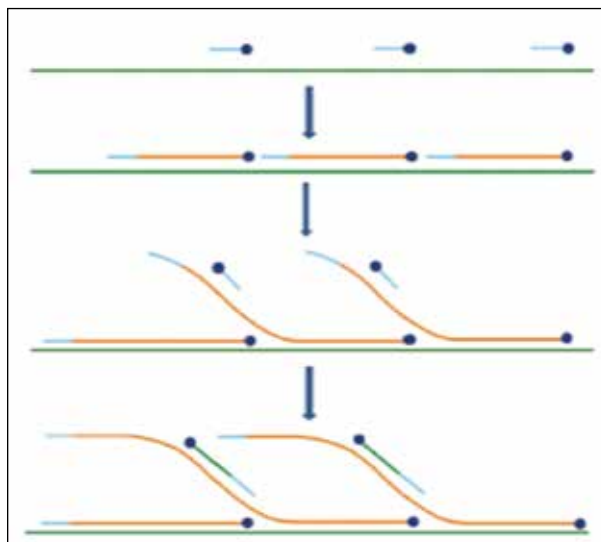


Рисунок 8 – Схема амплификации с множественным вытеснением цепи
(матричная цепь ДНК обозначена зеленым,
праймеры – голубым, ДНК-полимераза – синим, вновь
синтезированная цепь ДНК – оранжевым) [16, 20]

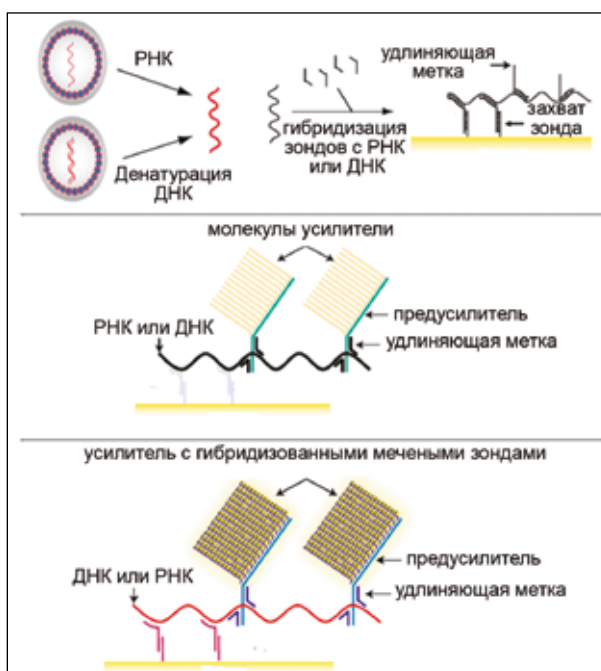


Рисунок 9 – Метод гибридизации с использованием разветвленных зондов [35]

выявлять в пробе специфические фрагменты нуклеиновых кислот без предварительного этапа копирования. К их числу относятся, в частности, метод гибридизации с использованием разветвленных зондов (bDNA, branched DNA), который основан на амплификации получаемого сигнала [31–35] (рисунок 9).

Сам целевой ген, в отличие от ПЦР, не копируется, однако в результате ряда манипуляций к целевому гену патогенной бактерии присоединя-

Рисунок 10 – Биологические микрочипы¹

¹URL: <http://develop.ars-longa.biz/fo-ra.ru/news.php%3Fid=25.html>

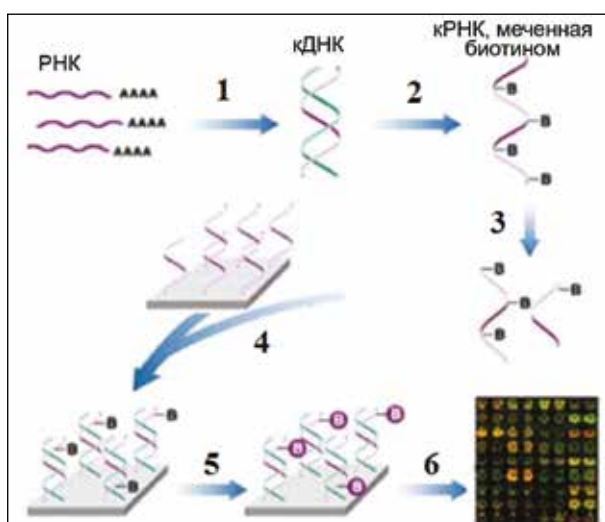


Рисунок 11 – Этапы гибридизации на биочипе
(1 – обратная транскрипция; 2 – транскрипция в условиях *in vitro*; 3 – разделение кРНК на фрагменты; 4 – гибридизация меченых биотином фрагментов кРНК с иммобилизованными на биочипе последовательностями; 5 – окраска и отмывка; 6 – детекция результатов)¹

¹URL: <https://www.studyblue.com/notes/note/n/chapter-9-intro-to-taxonomy/deck/8288135>

ется зонд, с которым ковалентно сшиты несколько флуоресцентных или ферментативных меток. В результате на каждую молекулу целевого бактериального гена приходится по несколько молекул метки, что обеспечивает многократное усиление сигнала, регистрируемого тем или иным способом в ходе исследования

Аналогичная методика используется при разработке биочипов, в основе действия которых – гибридизация (связывание) неизвестной ДНК или РНК с расположенными в определенном порядке зондами, фиксированными на поверхности стекла или кремния [36–38] (рисунок 10).

Результат детектируется по флуоресценции зонда, предварительно меченого флуорофором и

гибридизованного с одной из иммобилизованных проб (рисунок 11).

Наиболее точными и информативными методами идентификации микроорганизмов являются методы, основанные на секвенировании нуклеиновых кислот [39]. Такие методы обеспечивают возможность унификации данных, получаемых с их помощью, в лабораториях, расположенных в различных странах. К настоящему времени созданы и постоянно пополняются общедоступные базы данных, содержащие нуклеотидные последовательности геномов различных микроорганизмов. Сравнение получаемых данных позволяет сделать выводы об особенностях выявленных патогенных бактерий. У данных методов есть ограничение – для проведения анализа бактерий в исследуемой пробе должен присутствовать только один вид бактерий, то есть требуется выделение чистых культур микроорганизмов.

До недавнего времени фактически единственным методом установления нуклеотидной последовательности было секвенирование по Сэнгеру [39, 40]. Данный метод, реализованный в большом количестве автоматических секвенаторов ДНК капиллярного типа, позволяет расшифровывать последовательности ДНК относительно небольшого (до 400–700 нуклеотидов) размера (рисунок 12).

При идентификации микроорганизмов методом секвенирования анализируют консервативные участки генома. Например, это может быть ген 16S рРНК, 23S рРНК или спейсер между ними [36, 41]. После секвенирования полученная нуклеотидная последовательность сравнивается с базами данных, например, GenBank. Метод характеризуется высокой воспроизводимостью, хорошей разрешающей способностью и занимает, как правило, не более двух суток. Однако в некоторых случаях секвенирования одного гена бывает недостаточно для идентификации близкородственных видов.

Дальнейшим развитием идентификации микроорганизмов с помощью секвенирования стало

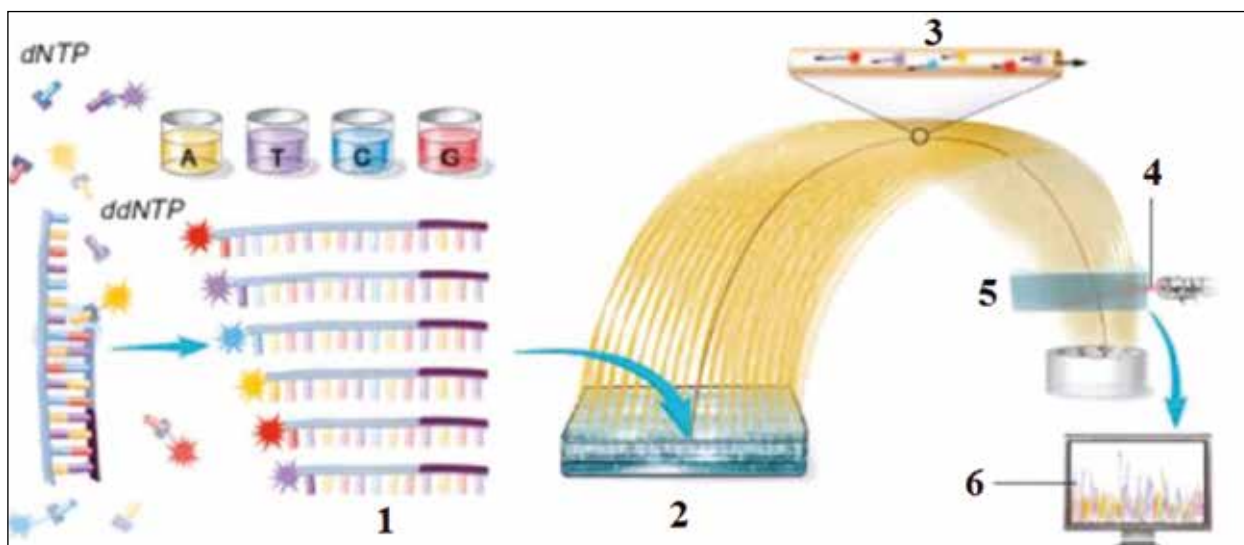


Рисунок 12 – Метод секвенирования по Сэнгеру

(1 – набор фрагментов разной длины; 2 – фрагменты, распределенные по лункам в планшете; 3 – капиллярный электрофорез; 4 – лазерный луч; 5 – окно детектора; 6 – детекция флуоресцентного сигнала)¹

¹ URL: <http://present5.com/problemey-medicinskoj-genetiki-primerno-5/>

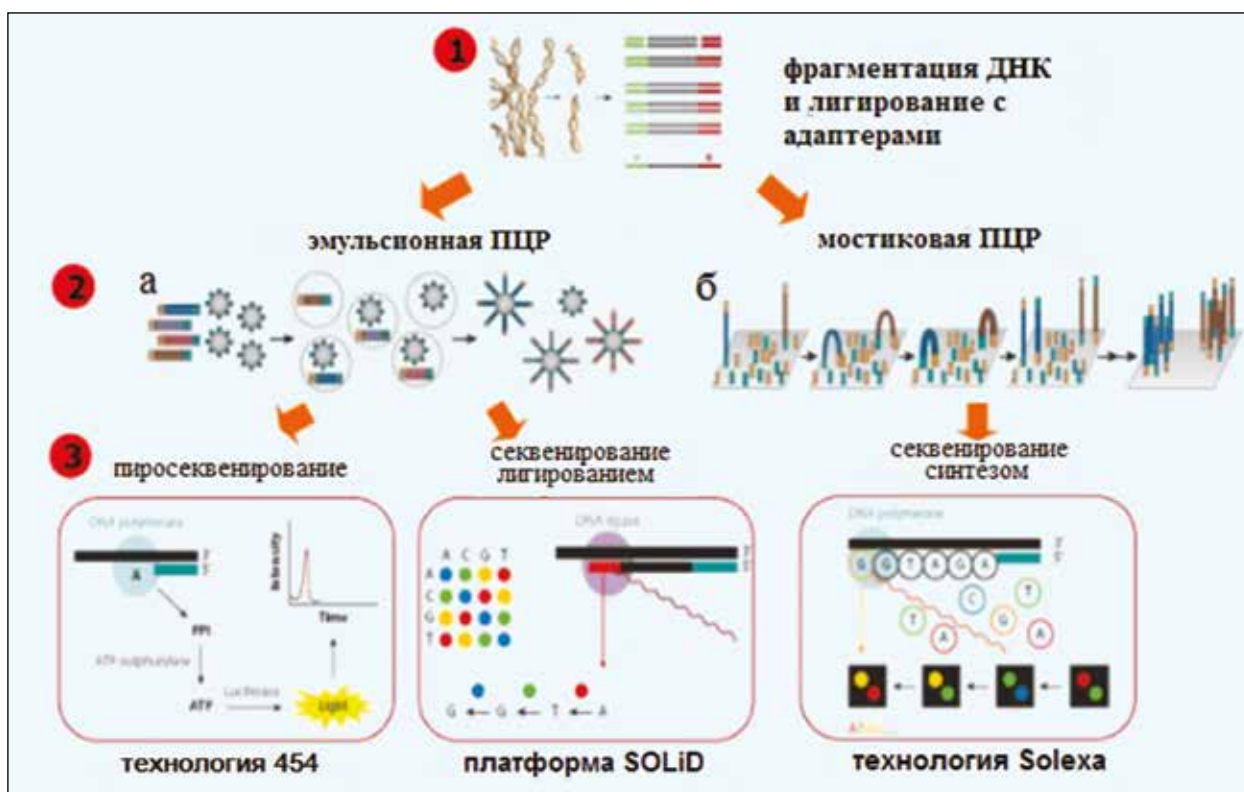


Рисунок 13 – Этапы высокопроизводительного секвенирования

(1 – фрагментация геномной ДНК и присоединение адаптеров; 2 – амплификация каждого фрагмента методом эмульсионной или мостиковой ПЦР; 3 – регистрация акта присоединения нуклеотида)¹

¹ URL: <http://www.coffeetablescience.com/2016/03/-apple-vs-samsung-like-patent-war-in.html>

появление метода мультилокусного сиквенс-типирования (МЛСТ) [42], основанного на прямом установлении нуклеотидной последовательности фрагментов

нескольких определенных генов. Метод включает в себя этапы амплификации выбранных фрагментов генов методом ПЦР, их секвенирование и анализ по-

лученных данных с помощью специализированного программного обеспечения. В настоящее время существуют общедоступные базы данных, содержащие информацию об известных уникальных последовательностях и соответствующих им сиквенс-типах, в частности, PubMLST (более 500 сиквенс-типов *Vibrio cholerae*, 170 сиквенс-типов рода *Yersinia*, в том числе 60 *Yersinia pseudotuberculosis* и др.).

В последние годы были разработаны новые способы секвенирования (пиросеквенирование, секвенирование лигированием, секвенирование синтезом, полупроводниковое секвенирование), производительность которых сделала реальным проведение полногеномного анализа (рисунок 13).

Пиросеквенирование – это метод секвенирования ДНК, основанный на принципе синтеза комплементарной цепочки, при этом регистрируется присоединение каждого нуклеотида. Матрица ДНК иммобилизована, растворы нуклеотидов А, С, G и Т добавляются и отмываются последовательно после каждой реакции. Присоединение каждого комплементарного нуклеотида сопровождается образованием пирофосфата, который детектируется каскадом последовательных химических реакций, заканчивающихся хемилюминесцентным сигналом, что позволяет определить последовательность матрицы. На принципе пиросеквенирования основана технология «454 Life Sciences» компании «Roche» (США) [42, 43].

Секвенирование лигированием основано на использовании набора коротких (8–10 нуклеотидов) флуоресцентно-меченых (с помощью четырех красителей) «вырожденных» праймеров, так что каждому флуорофору соответствует определенный нуклеотид в определенной позиции. Метод секвенирования лигированием используется в коммерческих технологиях «Polonator» компании «Dover/Harvard» (США) и «SOLiD» компании «Life Technologies Thermo Fisher Scientific» (США) [44].

Метод секвенирования синтезом заключается в регистрации факта присоединения очередного флуоресцентно-меченого нуклеотида не по побочным продуктам реакции, а непосредственно по сигналу присоединенного основания. После каждого присоединения нуклеотида и детекции флуоресценции метка химически удаляется из синтезированной цепи. При этом за один цикл реакции может быть добавлен только один нуклеотид. Метод секвенирования синтезом реализован в коммерче-

ских технологиях компаний «Illumia» (США) и «Pacific Biosciences» (США) [45].

Метод полупроводникового секвенирования основан на регистрации акта присоединения нуклеотида по образующимся ионам водорода. Важным отличием данного метода от рассмотренных выше методов высокопроизводительного секвенирования является отсутствие оптического детектора сигнала, что значительно упрощает и удешевляет конструкцию прибора. Детекция образования протона, вызывающего локальное изменение pH раствора, осуществляется специальным сенсором. На принципе полупроводникового секвенирования основана коммерческая технология «Ion Torrent» от компании «Life Technologies Thermo Fisher Scientific» (США) [39].

Необходимым элементом при идентификации возбудителей инфекционных заболеваний методом полногеномного секвенирования является формирование общедоступной базы нуклеотидных последовательностей геномов различных бактерий и установление функций основных генов, определяющих их патогенные свойства.

Подводя итог, необходимо отметить, что материалы данной статьи лишь в небольшой степени раскрывают возможности молекулярной генетики в вопросах выявления и исследования бактериальных патогенов.

Выбор методов идентификации микроорганизмов необходимо осуществлять, исходя из целей и задач, материальной базы лаборатории, наличия обученного персонала и объемов финансирования. Очевидно, что наиболее информативными являются методы, основанные на секвенировании нуклеотидных последовательностей, однако в силу своих технологических требований пока их реализация в полевых условиях достаточно затруднена.

Необходимо также отметить, что молекулярно-генетические методы постоянно развиваются, совершенствуется техническая составляющая исследований, повышается уровень автоматизации, отмечается тенденция к миниатюризации оборудования, а также проведению нескольких анализов в ходе одного исследования. Кроме того, по мере изучения бактерий формируются более полные базы данных, позволяющие как унифицировать проведение анализа, так и идентифицировать все большее число видов и штаммов возбудителей опасных и особо опасных инфекционных заболеваний.

Информация о конфликте интересов

Авторы заявляют, что исследования проводились при отсутствии любых коммерческих или финансовых отношений, которые могли бы быть истолкованы как потенциальный конфликт интересов.

Сведения о рецензировании

Статья прошла открытое рецензирование двумя рецензентами, специалистами в данной области. Рецензии находятся в редакции журнала.

Список источников

1. Павлов Д.Л., Онучина Н.В., Кузнецовский А.В. и др. Результаты исследования биологических свойств сибиреязвенных изолятов эпизоотии 2016 года в Ямало-Ненецком автономном округе // Вестник войск РХБ защиты. 2017. Т. 1. № 1. С. 23–32.
2. Глухов А.И., Гордеев С.А., Альтшулер М.Л. и др. Применение гнездовой ПЦР в детекции возбудителя чумы // Клиническая лабораторная диагностика. 2003. № 7. С. 47–50.
3. Arnold T., Neubauer H., Nikolaou K. et al. Identification of *Yersinia enterocolitica* in minced meat: a comparative analysis of API 20E, *Yersinia* identification kit and a 16S rRNA-based PCR method // J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health. 2004. V. 51. № 1. P. 23–27.
4. Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences // Biotechnology. 1992. V. 10. № 4. P. 413–417.
5. Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions // Biotechnology. 1993. V. 11. № 9. P. 1026–1030.
6. Dang C., Jayasena S.D. Oligonucleotide inhibitors of Taq DNA polymerase facilitate detection of low copy number targets by PCR // J. Mol. Biol. 1996. V. 264. P. 268–278.
7. Horton R.M., Hoppe B.L., Conti-Tronconi B.M. AmpliGreas: «hot start» PCR using petroleum jelly // Biotechniques. 1994. V. 16. P. 42–43.
8. Kleppe K., Ohtsuka E., Kleppe R. et al. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases // J. Mol. Biol. 1971. V. 56. № 2. P. 341–361.
9. Her M., Kang S.I., Kim J.W. et al. A genetic comparison of *Brucella abortus* isolates from animals and humans by using an MLVA assay // J. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 20. № 12. P. 1750–1755.
10. Kingston J.J., Tuteja U., Kapil M. et al. Genotyping of Indian *Yersinia pestis* strains by MLVA and repetitive DNA sequence based PCRs // Antonie van Leeuwenhoek. 2009. V. 96. № 3. P. 303–313.
11. Ребриков Д.В., Саматов Г.А., Трофимов Д.Ю. и др. ПЦР в реальном времени / Под ред. Ребрикова Д.В. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2011. 223 с.
12. Khatami F., Heidari M., Khatami M. Rapid detection of *Escherichia coli* O157: H7 by fluorescent amplification-based specific hybridization (Flash) PCR // Iranian Red Crescent Med. J. 2012. V. 14. № 9. P. 594–598.
13. Gibril A.A., Adel O. Advances in ligase chain reaction and ligation-based amplifications for genotyping assay: detection and applications // Mutation Research/ Reviews in Mutation Research. 2017. V. 773. P. 66–90.
14. Vincent M., Xu Y., Kong H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification // EMBO Reports. 2004. V. 5. № 8. P. 795–800.
15. Walker G.T., Fraiser M.S., Schram J.L. et al. Strand displacement amplification – an isothermal, in vitro DNA amplification technique // Nucleic Acids Res. 1992. V. 20, № 7. P. 1691–1696.
16. Dean F.B., Hosono S., Fang L. et al. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. № 8. P. 5261–5266.
17. Schweitzer B., Kingsmore S. Combining nucleic acid amplification and detection // Curr. Opin. Biotechnol. 2001. V. 12. № 1. P. 21–27.
18. Wu L., Liu Q., Wu Z., Lu Z. Detection of HIV cDNA point mutations with rolling-circle amplification arrays // Molecules. 2010. V. 15. № 2. P. 619–626. doi: 10.3390/molecules15020619.
19. Maciejewska A., Jakubowska J., Pawlowski R. Whole genome amplification of degraded and nondegraded DNA for forensic purposes // International Journal of Legal Medicine. 2013. V. 127. № 2. P. 309–319.
20. Zong C., Lu S., Chapman A.R., Xie X.S. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell // Science. 2012. V. 338. № 6114. P. 1622–1626. doi: 10.1126/science.1229164.
21. Fang R., Li X., Hu L. et al. Cross-priming amplification for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens // J. Clin. Microbiol. 2009. V. 47. № 3. P. 845–847. doi: 10.1128/JCM.01528-08.
22. Liu W., Dong D., Yang Z. et al. Polymerase Spiral Reaction (PSR). A novel isothermal nucleic acid amplification method // Sci. Rep. 2015. V. 29. № 5. P. 12723. doi: 10.1038/srep12723.
23. Fischbach J., Frohme M., Glokler J. Hinge-initiated Primer-dependent Amplification of nucleic acids (HIP) – a new versatile isothermal amplification method // Sci. Rep. 2017 V. 7. № 1. P. 7683.
24. Aonuma H., Badolo A., Okado K., Kanuka H. Detection of mutation by allele-specific loop-mediated isothermal amplification (AS-LAMP) // Methods Mol. Biol. 2013. V. 1039. P. 121–127. doi: 10.1007/978-1-62703-535-4_10.
25. Fukuta S., Mizukami Y., Ishida A., Kanbe M. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based SNP markers for shelf-life in melon (*Cucumis melo* L.) // J. Appl. Genet. 2006. V. 47. № 4. P. 303–308.
26. Itonaga M., Matsuzaki I., Warigaya K. Novel methodology for rapid detection of KRAS mutation using PNA-LNA mediated loop-mediated isothermal amplification // PLoS One. 2016. V. 11. № 3. P. e0151654. doi: 10.1371/journal.pone.0151654.
27. Zhu Q., Gao Y., Yu B. et al. Self-priming compartmentalization digital LAMP for point-of-care // Lab Chip. 2012. V. 12. № 22. P. 4755–4763.
28. Blainey P.C., Quake S.R. Digital MDA for enumeration of total nucleic acid contamination // Nucleic Acids Res. 2011. V. 39. № 4. P. e19.
29. Sidore A.M., Lan F., Lim S.W., Abate A.R. Enhanced sequencing coverage with digital droplet multiple displacement amplification // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. № 7. P. e66. doi: 10.1093/nar/gkv1493.
30. Khorosheva E.M., Karymov M.A., Selck D.A., Ismagilov R.F. Lack of correlation between reaction speed and analytical sensitivity in isothermal amplification

reveals the value of digital methods for optimization: validation using digital real-time RT-LAMP // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44, № 2. P. e10. doi: 10.1093/nar/gkv877.

31. Player A.N., Shen L.P., Kenny D. et al. Single-copy gene detection using branched DNA (bDNA) in situ hybridization // *J. Histochem. Cytochem.* 2001. V. 49. № 5. P. 603–612.

32. Hendricks D.A., Stowe B.J., Hoo B.S. et al. Quantitation of HBV DNA in human serum using a branched DNA (bDNA) signal amplification assay // *Am. J. Clin. Pathol.* 1995. V. 104. № 5. P. 537–546.

33. Collins M.L., Irvine B., Tyner D. et al. A branched DNA signal amplification assay for quantification of nucleic acid targets below 100 molecules/ml // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. № 15. P. 2979–2984.

34. Horn T., Chang C., Urdea M.S. Chemical synthesis and characterization of branched oligodeoxyribonucleotides (bDNA) for use as signal amplifiers in nucleic acid quantification assays // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 4842–4849.

35. Tsongalis G.J. Branched DNA technology in molecular diagnostics // *Am. Soc. Clin. Pathol.* 2006. V. 126. P. 448–453.

36. Jünemann S., Prior K., Szczepanowski R. et al. Bacterial community shift in treated periodontitis patients revealed by ion torrent 16S rRNA gene amplicon sequencing // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 8. P. e41606.

37. Kunin V., Engelbrektson A., Ochman H., Hugenholtz P. Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates // *Environ. Microbiol.* 2010. V. 12. № 1. P. 118–123. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02051.x.

38. Пудова Е.А., Чеканова Т.А., Маркелов М.Л. и др. Разработка и апробация ДНК-чипа для индикации возбудителей особо опасных инфекций // *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.* 2014. № 3. С. 13–19.

39. Ребриков Д.В., Коростин Д.О., Шубина Е.С., Ильинский В.В. NGS: высокопроизводительное секвенирование / Под ред. Ребрикова Д.В. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. 232 с.

40. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1977. V. 74. № 12. P. 5463–5467.

41. Nossa C.W. Design of 16S rRNA gene primers for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome // *World J. Gastroenterol.* 2010. V. 16. № 33. P. 4135–4144.

42. Maiden M.C., Bygraves J.A., Feil E. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 6. P. 3140–3145.

43. Abbai N.S., Govender A., Shaik R., Pillay B. Pyrosequence analysis of unamplified and whole genome amplified DNA from hydrocarbon-contaminated groundwater // *Mol. Biotechnol.* 2012. V. 50. № 1. P. 39–40. doi: 10.1007/s12033-011-9412-8.

44. Zhou D., Rao M.S., Walker R. et al. Massively parallel signature sequencing // *Methods Mol. Biol.* 2006. № 331. P. 285–311.

45. Benthley D.R., Balasubramanian S., Swerdlow H.P. et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry // *Nature.* 2008. V. 456. № 7218. P. 53–59. doi: 10.1038/nature07517.

Об авторах

Филиал федерального государственного бюджетного учреждения «48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации (г. Киров), 610000, Российская Федерация, г. Киров, Октябрьский проспект, д. 119.

Киби́рев Я́рослав Алекса́ндрович. Начальник научно-исследовательского отдела, канд. биол. наук.

Бурлачу́к Серге́й Генна́дьевич. Научный сотрудник научно-исследовательского отдела.

Грудцы́на Анна Станисла́вовна. Научный сотрудник научно-исследовательского отдела, канд. биол. наук.

Ситяко́в Дми́трий Оле́гович. Младший научный сотрудник научно-исследовательского отдела.

Ису́тов Серге́й Генна́дьевич. Заместитель начальника научно-исследовательского отдела – начальник группы, канд. мед. наук.

Дробко́в Влади́мир Ива́нович. Научный сотрудник научно-исследовательского отдела, канд. мед. наук.

Контактная информация для всех авторов: 23527@mil.ru

Контактное лицо: Киби́рев Я́рослав Алекса́ндрович; 23527@mil.ru

METHODS FOR IDENTIFICATION OF CAUSATIVE AGENTS OF DANGEROUS AND PARTICULARLY DANGEROUS INFECTIONS BASED ON THE ANALYSIS OF NUCLEIC ACIDS

Y.A. Kibirev, S.E. Burlachuk, A.S. Grudcina,

D.O. Sityakov, S.G. Isupov, V.I. Drobkov

*Branch Office of the Federal State Budgetary Establishment
«48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of the Russian
Federation (Kirov), Oktyabrsky Avenue 119, Kirov 610000, Russian Federation*

One of the main tasks of the NBC Protection Troops is accurate and rapid identification of infectious disease causative agents in case of establishing the fact of biological contamination. Different methods based on the analysis of nucleic acids are most preferred for this purpose. Most of them are based on DNA amplification by polymerase chain reaction (PCR). The result is detected by electrophoretic separation of amplification products, as well as by registration of endpoint fluorescent signal (FLASH modification) or in real time (PCR-RT). Other methods of DNA amplification, such as ligase chain reaction (LCR) and isothermal amplification, are also applicable in practice. The article also describes some identification methods based on nucleic acid sequencing: multilocus sequence typing (MLST) method, sequencing of individual genes and complete genome sequencing. It is concluded that the choice of identification method should be based on the goals and objectives, laboratory facilities, availability of trained personnel and funding levels. Despite the fact that the most informative are methods based on sequencing nucleotide sequences, their implementation in the field is difficult so far due to technological requirements.

Keywords: *isothermal amplification; ligase chain reaction; methods of indication of microorganisms; multilocus sequence typing; multilocus variable-number tandem repeat (VNTR) analysis (MLVA); polymerase chain reaction; whole-genome sequencing; sequencing of individual genes; thermostat amplifier; fluorescent probes.*

For citation: *Kibirev Y.A., Burlachuk S.E., Grudcina A.S., Sityakov D.O., Isupov S.G., Drobkov V.I. Methods for identification of causative agents of dangerous and particularly dangerous infections based on the analysis of nucleic acids // Journal of NBC Protection Corps. 2018. V. 2 № 4. P. 22–35.*

Conflict of interest statement

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationship that could be construed as a potential conflict of interest.

Peer review information

The article has been peer reviewed by two experts in the respective field. Peer reviews are available from the Editorial Board.

References

1. Pavlov D.L., Onuchina N.V., Kuznetsovskiy A.V., Fomenkov O.O., Tumanov A.S. The results of the research of biological and genetic properties of the anthrax strains isolates during the epizootic 2016 in Yamal-Nenets autonomous district // Journal of NBC Protection Corps. 2017. V 1. № 1. P. 23–32 (in Russian).
2. Gluhov A.I., Gordeyev S.A., Altshuler M.L., Zikov I.E. et al. Using of nest PCR for plague causative agent detection // Clinical laboratory diagnostic. 2003. № 7. P. 47–50 (in Russian).
3. Arnold T., Neubauer H., Nikolaou K. et al. Identification of *Yersinia enterocolitica* in minced meat: a comparative analysis of API 20E, *Yersinia identification* kit and a 16S rRNA-based PCR method // J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health. 2004. V. 51. № 1. P. 23–27.
4. Higuchi R., Dollinger G., Walsh P.S., Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences // Biotechnology. 1992. V. 10. № 4. P. 413–417.
5. Higuchi R., Fockler C., Dollinger G., Watson R. Kinetic PCR analysis: real time monitoring of DNA amplification reactions // Biotechnology. 1993. V. 11. № 9. P. 1026–1030.
6. Dang C., Jayasena S.D. Oligonucleotide inhibitors of Taq DNA polymerase facilitate detection of low copy number targets by PCR // J. Mol. Biol. 1996. V. 264. P. 268–278.
7. Horton R.M., Hoppe B.L., Conti-Tronconi B.M. AmpliGrease: «hot start» PCR using petroleum jelly // Biotechniques. 1994. V. 16. P. 42–43.
8. Kleppe K., Ohtsuka E., Kleppe R. et al. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases // J. Mol. Biol. 1971. V. 56. № 2. P. 341–361.
9. Her M., Kang S.I., Kim J.W. et al. A genetic comparison of *Brucella abortus* isolates from animals and humans by using an MLVA assay // J. Microbiol. Biotechnol. 2010. V. 20. № 12. P. 1750–1755.
10. Kingston J.J., Tuteja U., Kapil M. et al. Genotyping of Indian *Yersinia pestis* strains by MLVA and repetitive DNA sequence based PCRs // Antonie van Leeuwenhoek. 2009. V. 96. № 3. P. 303–313.
11. Rebrikov D.V., Samatov G.A., Trofimov D.U. et al. Real-time PCR. Moscow: BINOM. Knowledge Lab, 2011. 223 p. (in Russian).
12. Khatami F., Heidari M., Khatami M. Rapid detection of *Escherichia coli* O157: H7 by fluorescent amplification-based specific hybridization (Flash) PCR // Iranian Red Crescent Med. J. 2012. V. 14. № 9. P. 594–598.
13. Gibriel A.A., Adel O. Advances in ligase chain reaction and ligation-based amplifications for genotyping assay: detection and applications // Mutation Research/ Reviews in Mutation Research. 2017. V. 773. P. 66–90.
14. Vincent M., Xu Y., Kong H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification // EMBO Reports. 2004. V. 5. № 8. P. 795–800.
15. Walker G.T., Fraiser M.S., Schram J.L. et al. Strand displacement amplification – an isothermal, in vitro DNA amplification technique // Nucleic Acids Res. 1992. V. 20, № 7. P. 1691–1696.
16. Dean F.B., Hosono S., Fang L. et al. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2002. V. 99. № 8. P. 5261–5266.
17. Schweitzer B., Kingsmore S. Combining nucleic acid amplification and detection // Curr. Opin. Biotechnol. 2001. V. 12. № 1. P. 21–27.
18. Wu L., Liu Q., Wu Z., Lu Z. Detection of HIV cDNA point mutations with rolling-circle amplification arrays // Molecules. 2010. V. 15. № 2. P. 619–626. doi: 10.3390/molecules15020619.
19. Maciejewska A., Jakubowska J., Pawlowski R. Whole genome amplification of degraded and nondegraded DNA for forensic purposes // International Journal of Legal Medicine. 2013. V. 127. № 2. P. 309–319.
20. Zong C., Lu S., Chapman A.R., Xie X.S. Genome-wide detection of single-nucleotide and copy-number variations of a single human cell // Science. 2012. V. 338. № 6114. P. 1622–1626. doi: 10.1126/science.1229164.
21. Fang R., Li X., Hu L. et al. Cross-priming amplification for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* in sputum specimens // J. Clin. Microbiol. 2009. V. 47. № 3. P. 845–847. doi: 10.1128/JCM.01528-08.
22. Liu W., Dong D., Yang Z. et al. Polymerase Spiral Reaction (PSR). A novel isothermal nucleic acid amplification method // Sci. Rep. 2015. V. 29. № 5. P. 12723. doi: 10.1038/srep12723.
23. Fischbach J., Frohme M., Glokler J. Hinge-initiated Primer-dependent Amplification of nucleic acids (HIP) – a new versatile isothermal amplification method // Sci. Rep. 2017 V. 7. № 1. P. 7683.
24. Aonuma H., Badolo A., Okado K., Kanuka H. Detection of mutation by allele-specific loop-mediated isothermal amplification (AS-LAMP) // Methods Mol. Biol. 2013. V. 1039. P. 121–127. doi: 10.1007/978-1-62703-535-4_10.
25. Fukuta S., Mizukami Y., Ishida A., Kanbe M. Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP)-based SNP markers for shelf-life in melon (*Cucumis melo* L.) // J. Appl. Genet. 2006. V. 47. № 4. P. 303–308.
26. Itonaga M., Matsuzaki I., Warigaya K. Novel methodology for rapid detection of KRAS mutation using PNA-LNA mediated loop-mediated isothermal amplification / et al. // PLoS One. 2016. V. 11. № 3. P. e0151654. doi: 10.1371/journal.pone.0151654.
27. Zhu Q., Gao Y., Yu B. et al. Self-priming compartmentalization digital LAMP for point-of-care // Lab Chip. 2012. V. 12. № 22. P. 4755–4763.
28. Blainey P.C., Quake S.R. Digital MDA for enumeration of total nucleic acid contamination // Nucleic Acids Res. 2011. V. 39. № 4. P. e19.
29. Sidore A.M., Lan F., Lim S.W., Abate A.R. Enhanced sequencing coverage with digital droplet multiple displacement amplification // Nucleic Acids Res. 2016. V. 44. № 7. P. e66. doi: 10.1093/nar/gkv1493.
30. Khorosheva E.M., Karymov M.A., Selck D.A.,

- Ismagilov R.F. Lack of correlation between reaction speed and analytical sensitivity in isothermal amplification reveals the value of digital methods for optimization: validation using digital real-time RT-LAMP // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44, № 2. P. e10. doi: 10.1093/nar/gkv877.
31. Player A.N., Shen L.P., Kenny D. et al. Single-copy gene detection using branched DNA (bDNA) in situ hybridization // *J. Histochem. Cytochem.* 2001. V. 49. № 5. P. 603–612.
32. Hendricks D.A., Stowe B.J., Hoo B.S. et al. Quantitation of HBV DNA in human serum using a branched DNA (bDNA) signal amplification assay // *Am. J. Clin. Pathol.* 1995. V. 104. № 5. P. 537–546.
33. Collins M.L., Irvine B., Tyner D. et al. A branched DNA signal amplification assay for quantification of nucleic acid targets below 100 molecules/ml // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. № 15. P. 2979–2984.
34. Horn T., Chang C., Urdea M.S. Chemical synthesis and characterization of branched oligodeoxyribonucleotides (bDNA) for use as signal amplifiers in nucleic acid quantification assays // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. P. 4842–4849.
35. Tsongalis G.J. Branched DNA technology in molecular diagnostics // *Am. Soc. Clin. Pathol.* 2006. V. 126. P. 448–453.
36. Jünemann S., Prior K., Szczepanowski R. et al. Bacterial community shift in treated periodontitis patients revealed by ion torrent 16S rRNA gene amplicon sequencing // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 8. P. e41606.
37. Kunin V., Engelbrektson A., Ochman H., Hugenholtz P. Wrinkles in the rare biosphere: pyrosequencing errors can lead to artificial inflation of diversity estimates // *Environ. Microbiol.* 2010. V. 12. № 1. P. 118–123. doi: 10.1111/j.1462-2920.2009.02051.x.
38. Pudova E.A., Chekanova T.A., Markelov M.L., Dedkov V.G. et al. Development and testing of a DNA microarray for identification of particularly dangerous infectious pathogens // *Epidemiology and infectious diseases. Actual issues.* 2014. № 3. P. 13–19 (in Russian).
39. Rebrikov D.V., Korostin D.O., Shubina E.S., Ilyinsky V.V. NGS: high-throughput sequencing. Moscow: BINOM. Knowledge Lab, 2015. 232 p. (in Russian).
40. Sanger F., Nicklen S., Coulson A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1977. V. 74. № 12. P. 5463–5467.
41. Nossa C.W. Design of 16S rRNA gene primers for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome // *World J. Gastroenterol.* 2010. V. 16. № 33. P. 4135–4144.
42. Maiden M.C., Bygraves J.A., Feil E. et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms // *Proc. Natl Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. № 6. P. 3140–3145.
43. Abbai N.S., Govender A., Shaik R., Pillay B. Pyrosequence analysis of unamplified and whole genome amplified DNA from hydrocarbon-contaminated groundwater // *Mol. Biotechnol.* 2012. V. 50. № 1. P. 39–40. doi: 10.1007/s12033-011-9412-8.
44. Zhou D., Rao M.S., Walker R. et al. Massively parallel signature sequencing // *Methods Mol. Biol.* 2006. № 331. P. 285–311.
45. Benthley D.R., Balasubramanian S., Swerdlow H.P. et al. Accurate whole human genome sequencing using reversible terminator chemistry // *Nature.* 2008. V. 456. № 7218. P. 53–59. doi: 10.1038/nature07517.

Authors

Branch Office of the Federal State Budgetary Establishment «48 Central Scientific Research Institute» of the Ministry of Defence of the Russian Federation (Kirov), Oktyabrsky Avenue 119, Kirov 610000, Russian Federation

Kibirev Yaroslav Aleksandrovich. Chief of the Scientific and Research Department. Candidate of Biological Sciences.

Burlachuk Sergey Gennadyevich. Researcher of the Scientific and Research Department.

Grudcina Anna Stanislavovna. Researcher of the Scientific and Research Department. Candidate of Biological Sciences.

Sityakov Dmitry Olegovich. Junior researcher of the Scientific and Research Department.

Isupov Sergey Gennadyevich. Deputy Chief of the Scientific and Research Department. Candidate of Medical Sciences.

Drobkov Vladimir Ivanovich. Researcher of the Scientific and Research Department. Candidate of Medical Sciences.

Contact information for all authors: 23527@mil.ru

Contact person: Kibirev Yaroslav Aleksandrovich; 23527@mil.ru