

РАЗРАБОТКА ДНК-БИОЧИПА ДЛЯ ПАРАЛЛЕЛЬНОЙ ДЕТЕКЦИИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ

DOI: 10.17691/stm2024.16.2.02

УДК 616.24–002:577.21

Поступила 20.12.2023 г.

**Н.А. Сахарнов**, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии¹;**Е.Н. Филатова**, к.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии¹;**М.И. Попкова**, к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии¹;**С.Л. Славин**, студент²;**О.В. Уткин**, к.б.н., зав. лабораторией молекулярной биологии и биотехнологии¹¹Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии

им. академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, ул. Малая Ямская, 71, Н. Новгород, 603950;

²Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского,

пр. Гагарина, 23, Н. Новгород, 603022

Цель исследования — разработка экспериментального варианта ДНК-биочипа для параллельной детекции бактериальных возбудителей внебольничной пневмонии.

Материалы и методы. Исследовали образцы мазков слизистой оболочки глотки детей 1–15 лет с рентгенологически подтвержденным диагнозом «пневмония». Селекцию ДНК-зондов для специфической детекции возбудителей внебольничной пневмонии (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* и *L. pneumophila*) и разработку дизайна биочипа выполняли с помощью предложенной ранее программы disprose, нуклеотидные последовательности патогенов были получены из базы данных NCBI Nucleotide. В работе использованы биочипы ф. CustomArray (США). Для пулированного образца, содержащего ДНК *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, проводили последовательный отбор наилучших сочетаний параметров гибридизации: размер фрагмента ДНК, количество ДНК, температура гибридизации. Критериями отбора служили процент эффективных зондов со стандартизированным сигналом гибридизации (ССГ) ≥ 3 и превышение уровней ССГ эффективных специфических зондов по сравнению с ССГ эффективных неспецифических зондов. Был проведен отбор зондов для детекции *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, характеризующихся эффективным сигналом гибридизации в оптимальных условиях. Разработанный биочип в подобранных условиях протестирован на клинических образцах, содержащих ДНК *S. pneumoniae* или *H. influenzae*. С применением ROC-анализа установлены пороговые значения сигналов специфических зондов в точках оптимальной чувствительности и специфичности теста, превышение которых трактовали как свидетельство присутствия патогена в образце.

Результаты. Спроектирован дизайн биочипа, включающий 142 ДНК-зонда для детекции 5 основных видов возбудителей внебольничной пневмонии, которые были синтезированы на слайды. На примере клинических образцов, содержащих ДНК *S. pneumoniae* и/или *H. influenzae*, подобраны оптимальные параметры гибридизации ДНК на биочипы, позволяющие выявлять бактериальных возбудителей внебольничной пневмонии с достаточной эффективностью, специфичностью и воспроизводимостью: количество гибридизуемой ДНК — 2 мкг, размер фрагмента ДНК — 300 н.о., температура гибридизации — 47°C. Отобран перечень зондов для специфической детекции *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, характеризующихся эффективным сигналом гибридизации в выявленных условиях. Определены пороговые значения стандартизированных сигналов зондов для специфической детекции *S. pneumoniae* (4,5 Z) и *H. influenzae* (4,9 Z) в клинических образцах.

Заключение. Разработан и синтезирован ДНК-биочип для параллельной индикации бактериальных возбудителей внебольничной пневмонии. Подобраны оптимальные параметры гибридизации ДНК на биочип для выявления бактериальных возбудителей внебольничной пневмонии *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, определены пороговые значения значимых сигналов зондов для их специфической детекции. Интерпретация результатов гибридизации биочипа соответствует результатам, полученным методом ПЦР. Данный биочип может использоваться для совершенствования лабораторной диагностики возбудителей внебольничной пневмонии.

Ключевые слова: ДНК-биочип; детекция бактериальных возбудителей; внебольничная пневмония; *S. pneumoniae*; *H. influenzae*.

Как цитировать: Sakharnov N.A., Filatova E.N., Popkova M.I., Slavin S.L., Utkin O.V. Development of DNA microarray for parallel detection of community-acquired pneumonia bacterial pathogens. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2024; 16(2): 16, <https://doi.org/10.17691/stm2024.16.2.02>

Для контактов: Сахарнов Николай Александрович, e-mail: saharnov@nniim.ru

English

Development of DNA Microarray for Parallel Detection of Community-Acquired Pneumonia Bacterial Pathogens

N.A. Sakharnov, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology¹;
E.N. Filatova, PhD, Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology¹;
M.I. Popkova, MD, PhD, Leading Researcher, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology¹;
S.L. Slavin, Student²;
O.V. Utkin, PhD, Head of the Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology¹

¹Academician I.N. Blokhina Nizhny Novgorod Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology of Rospotrebnadzor (Russian Federal Consumer Rights Protection and Human Health Control Service), 71 Malaya Yamskaya St., Nizhny Novgorod, 603950, Russia;

²National Research Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russia

The aim of the study was to develop an experimental version of a DNA microarray for parallel detection of community-acquired pneumonia bacterial pathogens.

Materials and Methods. We studied the samples of the pharyngeal mucosa smears taken from children aged 1–15 years with X-ray confirmed pneumonia. The selection of DNA probes for specific detection of community-acquired pneumonia pathogens (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, and *L. pneumophila*) and development of the microarray design were carried out using the Disperse program. The nucleotide sequences of pathogens were obtained from NCBI Nucleotide database. In the research we used CustomArray microarrays (USA). For a pooled sample containing *S. pneumoniae* and *H. influenzae* DNA, we performed a sequential selection of the best combinations of hybridization parameters: DNA fragment size, DNA amount, hybridization temperature. The selection criteria were: the percentage of effective probes with a standardized hybridization signal (SHS) $\geq 3 Z$, and the excess of SHS levels of effective specific probes compared to SHS of effective nonspecific probes. We selected the probes to detect of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* characterized by an effective hybridization signal under optimal conditions. The developed microarray was tested under the selected conditions on clinical samples containing *S. pneumoniae* or *H. influenzae* DNA. Using ROC analysis there were established threshold values for the signals of specific probes at optimal sensitivity points and the test specificity, the excess of which was interpreted as the evidence of pathogen presence in a sample.

Results. A microarray design included 142 DNA probes to detect *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, and *L. pneumophila*, the probes being synthesized onto slides. Using the example of clinical samples containing *S. pneumoniae* and/or *H. influenzae* DNA, we selected optimal parameters for DNA hybridization on microarrays, which enabled to identify bacterial pathogens of community-acquired pneumonia with sufficient efficiency, specificity and reproducibility: the amount of hybridized DNA was 2 μg , the DNA fragment size: 300 nt, hybridization temperature: 47°C. There was selected a list of probes for specific detection of *S. pneumoniae* and *H. influenzae* characterized by an effective hybridization signal under the identified conditions. We determined the threshold values of standardized probe signals for specific detection of *S. pneumoniae* (4.5 Z) and *H. influenzae* (4.9 Z) in clinical samples.

Conclusion. A DNA microarray was developed and synthesized for parallel indication of bacterial pathogens of community-acquired pneumonia. There were selected the optimal parameters for DNA hybridization on a microarray to identify bacterial pathogens — *S. pneumoniae* and *H. influenzae*, and determined the threshold values of significant probe signals for their specific detection. The interpretation of the microarray hybridization results corresponds to those obtained by PCR. The microarray can be used to improve laboratory diagnostics of community-acquired pneumonia pathogens.

Key words: DNA microarray; detection of bacterial pathogens; community-acquired pneumonia; *S. pneumoniae*; *H. influenzae*.

Введение

Внебольничная пневмония (ВП) — острый инфекционный воспалительный процесс легочной ткани, возникший во внебольничных условиях (вне стационара) или диагностированный в первые 48 ч с момента госпитализации, сопровождающийся симптомами инфекции нижних отделов дыхательных путей и рентгенологическими признаками [1].

Внебольничная пневмония является одной из самых распространенных инфекционных патологий в мире. По данным Европейского респираторного об-

щества, в странах Евросоюза общее число пациентов с ВП ежегодно превышает 3 млн человек. В США ежегодно диагностируется 5–6 млн случаев ВП, из которых более 1 млн требуют госпитализации [2]. Заболеваемость ВП в Европе и Северной Америке составляет 5–10 случаев на 1 тыс. населения [3]. По данным ВОЗ, в 2019 г. смертность от ВП составила 2,6 млн случаев, что явилось четвертой ведущей причиной смертности в мире [4].

В России ВП также вносит существенный вклад в структуру инфекционной заболеваемости. При среднемноголетнем показателе 391,82 случая на 100 тыс.

населения в 2022 г. заболеваемость ВП составила 407,29 случая на 100 тыс. населения [5]. Смертность от ВП в России составляет 17–18 случаев на 100 тыс. населения и зависит от степени тяжести заболевания и индивидуальных особенностей пациентов (возраст, сопутствующие заболевания, состояние иммунной системы) [6].

К возбудителям ВП относят многие бактериальные патогены, основным из которых является *Streptococcus pneumoniae*, вызывающий до 30–50% случаев заболевания. *Haemophilus influenzae* в амбулаторной практике встречается примерно в 10% случаев как в мире, так и в России. Известно, что 8–30% случаев нетяжелой ВП обусловлены *Chlamydomphila pneumoniae* и *Mycoplasma pneumoniae* [6].

Несмотря на широкое внедрение в лабораторную практику молекулярно-генетических и других современных методов, доля установления ВП данной этиологии достигает только 40–60% [7].

Своевременная идентификация возбудителя ВП важна для верного выбора тактики ведения пациентов и определения характера проводимых противоэпидемических мероприятий [8–13]. Однако симптомы ВП отличаются вариабельностью и неспецифичностью, в связи с чем разработка новых способов детекции этиологических агентов ВП с помощью современных технологий остается актуальной задачей.

Для решения данной задачи хорошей перспективой может служить разработка ДНК-биочипов, позволяющих проводить параллельную детекцию широкого спектра возбудителей ВП. Многие из разработанных на сегодняшний день ДНК-биочипов предназначены для типирования патогенов, ассоциированных с заболеваниями органов дыхания. Так, сотрудниками Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН разработаны гелевые ДНК-биочипы низкой плотности для типирования штаммов *Mycobacterium tuberculosis* и определения генетических детерминантов лекарственной устойчивости [14]. Кроме того, в сотрудничестве с Институтом вирусологии им. Д.И. Ивановского ими был разработан ДНК-биочип для типирования вируса гриппа А, используемого с целью эпидемиологического мониторинга циркуляции возбудителя [15]. Разработка ДНК-биочипов, предназначенных для детекции широкого спектра возбудителей заболеваний органов дыхательной системы, в России ранее не проводилась.

За рубежом в 2019 г. на основе платформы Agilent (США) был разработан ДНК-биочип для серотипирования *S. pneumoniae*, точность которого была сопоставима с методом ПЦР [16].

Большое распространение получили биочипы компаний Affymetrix (США) [17] и Genomica (Испания) [18], позволяющие определять широкий спектр бактериальных патогенов. Одной из последних разработок является ДНК-биочип низкой плотности, описанный в работе Х. Ма с соавт. [19], который предназначен для определения 15 видов бактерий, ассоциированных с развитием ВП.

Однако широкий спектр патогенов, которые определяются биочипами, описанными выше, обуславливает высокую стоимость и сложность пробоподготовки, поскольку для выполнения анализа требуется значительное количество специфических праймеров, что затрудняет применение биочипов в лабораторной практике. Другим недостатком этих биочипов является невозможность различения носительства и патоген-обусловленной инфекции [19]. В такой ситуации актуальна разработка ДНК-биочипов, характеризующихся оптимальным соотношением стоимости исследования, производительности и точности результатов. Данная задача может быть решена с применением ДНК-биочипов высокой плотности, позволяющих использовать в процессе пробоподготовки рандомные праймеры с сохранением чувствительности и специфичности анализа. При этом качество получаемых результатов также в значительной степени будет зависеть от использования оптимальных протоколов пробоподготовки и оптимального соотношения параметров гибридизации материала [20]. В число этих параметров входят размер фрагментов и количество гибридизуемой ДНК, температура гибридизации и другие.

Целью работы явилась разработка экспериментального варианта ДНК-биочипа для параллельной детекции бактериальных возбудителей внебольничной пневмонии.

Материалы и методы

Разработка дизайна ДНК-биочипа и его синтез.

Алгоритм селекции ДНК-зондов для специфичной детекции возбудителей ВП был предложен нами ранее и реализован в виде программы для ЭВМ *disprose* (DIScrimination PRObe SElection), написанной на языке программирования R [21]. С применением данного алгоритма разработан дизайн ДНК-биочипа, предназначенного для идентификации основных бактериальных возбудителей ВП, циркулирующих в мире: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydomphila pneumoniae*, *Legionella pneumophila*. Сборку целевой и неспецифической баз нуклеотидных последовательностей, использованных при отборе ДНК-зондов с помощью такого алгоритма, формировали из базы данных NCBI Nucleotide [22]. Схему распределения зондов на поверхности слайда составили с использованием приложения *Layout Designer* (CustomArray, США). Синтез зондов проводили на слайды *CustomArray Blank Slide 12K* (CustomArray, США). На слайды были синтезированы целевые зонды, зонды отрицательного контроля (negative control, NC — специфичные к геному бактерии *Rhizobium rubi*, подобранные с применением указанного алгоритма) и зонды контроля качества синтеза (quality control, QC), не специфичные к последовательностям исследуемых патогенов, которые были установлены производителем платформы

(CustomArray, США). Синтез зондов осуществляли с помощью модифицированного амидофосфитного метода на аппарате V3 Synthesizer (CustomArray, США) в соответствии с протоколом производителя [23, 24] и с использованием комплекта реагентов (Sigma-Aldrich, США, Германия, Франция; Panreac, Испания; Merck Sharp & Dohme, США; «Биохим», Россия).

Материалы исследования. Материалом для исследования служили образцы мазков слизистой оболочки глотки детей 1–15 лет с рентгенологически подтвержденным диагнозом «пневмония», находившихся на стационарном лечении в медицинских организациях Нижнего Новгорода.

От всех лиц, представляющих несовершеннолетних пациентов, врачами медицинских организаций получено добровольное информированное согласие в соответствии с положениями Хельсинкской декларации (2013).

Отбор образцов для исследования. Наличие ДНК возбудителей ВП подтверждали методом ПЦР с помощью набора GenPak DNA PCR test (ООО «Галарт-Диагностикум», Россия) для детекции *S. pneumoniae*, *H. influenzae* и *L. pneumophila* и набора «АмплиСенс Mycoplasma pneumoniae/Chlamydomphila pneumoniae-FL» (Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) для детекции ДНК *M. pneumoniae* и *S. pneumoniae*. С целью подбора параметров гибридизации ДНК на биочип и оценки воспроизводимости результатов пулировали 18 образцов, содержащих ДНК *S. pneumoniae* (18/18, 100% образцов) и/или *H. influenzae* (9/18, 50% образцов). Для тестирования выявляемости *S. pneumoniae* и *H. influenzae* в клинических образцах использовали по три клинических образца, содержащих исключительно *S. pneumoniae* или *H. influenzae*. В качестве отрицательного образца использовали пул из шести образцов мазков слизистой оболочки глотки здоровых доноров, не содержащих ДНК бактериальных возбудителей ВП.

Пробоподготовка ДНК и ее гибридизация на биочип. Выделение ДНК из образцов проводили с помощью набора реактивов «РИБО-преп» (Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Выполняли дополнительную очистку ДНК с помощью 3 М ацетата натрия (pH=7,0) и изопропанола («Биохим», Россия). ДНК в количестве 2–3 мкг фрагментировали набором реактивов NEBNext dsDNA Fragmentase (New England Biolabs, Великобритания). Концентрацию ДНК измеряли на спектрофотометре Eppendorf Bio Photometer Plus (Германия). Фрагментированную ДНК концентрировали изопропаноном в присутствии 3 М ацетата натрия (pH=7,0). Амплификацию ДНК в количестве 1,2 мкг проводили с помощью набора реактивов Encyclo Plus PCR kit («Евроген», Россия) и случайных декануклеотидных праймеров Random (dN)10-primer («Евроген», Россия) с использованием амплификатора MaxyGene Gradient (Ахуген, США), Температурный профиль реакции: денатурация при 95°C — 1 мин, 30 циклов

(95°C — 15 с, 30°C — 1 мин, 72°C — 45 с), финальная элонгация — 8 мин. Полученную ДНК концентрировали охлажденным изопропаноном в присутствии 3 М ацетата натрия (pH=7,0). ДНК в количестве до 4 мкг использовали в качестве матрицы для *in vitro* репликации набором реагентов «ДНК-полимераза I E. coli (фрагмент Кленова)» (SibEnzyme, Россия) и случайных декануклеотидных праймеров Random (dN)10-primer («Евроген», Россия). В состав синтезируемой ДНК вводили биотиновую метку путем замены половины количества дезоксиуридинтрифосфата (dUTP) на его биотинилированный аналог Bio-12-dUTP («ДНК-синтез», Россия). Полученную биотинмеченую ДНК концентрировали охлажденным изопропаноном в присутствии 3 М ацетата натрия (pH=7,0). Итоговое количество биотинмеченой ДНК варьировало в пределах 2,0–3,5 мкг, что достаточно для гибридизации на биочип. Гибридизацию целевых биотинмеченых ДНК на биочип и их последующую отмывку (для повторного использования биочипа) проводили согласно инструкции производителя (CustomArray, США). Определяли оптимальное сочетание трех параметров гибридизации: размера фрагмента целевой ДНК (200, 300, 400 н.о.), количества гибридизуемой ДНК (1, 2 и 3 мкг) и температуры гибридизации (40, 42, 45, 47 и 50°C).

Математическая обработка и анализ сигналов гибридизации. Сигналы гибридизации в виде файлов в формате ECD экспортировали в формат CSV с помощью программы Electra Sense Analysis v. 3.4.2 (CustomArray, США). Расчеты проводили в свободно распространяемой среде программирования R v. 3.6.1 [25].

Первичные сигналы гибридизации подвергали процедуре стандартизации и получали стандартизованный сигнал гибридизации (ССГ), выраженный в Z-единицах по формуле

$$Z = (X - M_{NC}) / SD_{NC},$$

где X — первичный сигнал гибридизации анализируемого зонда, M_{NC} — среднее арифметическое значение сигналов зондов отрицательного контроля, SD_{NC} — стандартное отклонение сигналов зондов отрицательного контроля.

Зонды с ССГ более 10 Z оценивали как зонды с неспецифическим/частичным связыванием и исключали из дальнейшего анализа. Уровень сигнала выше 3 Z оценивали как эффективный [26], выше 4 Z — высокий, выше 5 Z — очень высокий.

Для каждой комбинации параметров гибридизации определяли показатели качества гибридизации: эффективность, специфичность — соотношение уровней специфических и неспецифических сигналов — и соотношение параметров чувствительности и специфичности. Тестировали каждую из комбинаций параметров, последовательно отбирая наилучшие варианты.

Эффективность гибридизации оценивали как процент эффективных зондов от всей совокупности тестовых зондов. Для оценки влияния параметров

гибридизации на соотношение уровней специфических и неспецифических сигналов рассчитывали отношение медиан ССГ эффективных специфических и неспецифических зондов. В качестве специфических зондов использовали зонды, предназначенные для идентификации *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, в качестве неспецифических — зонды для идентификации *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, *L. pneumophila*. Соотношение чувствительности и специфичности определяли с помощью ROC-анализа.

ROC-анализ. При выполнении ROC-анализа рассчитывали чувствительность и специфичность биочипа при наборе порогов значимого сигнала (ПЗС). Под ПЗС понимали такой уровень ССГ зонда, превышение которого позволяло трактовать результат гибридизации как свидетельство присутствия в образце ДНК возбудителя. При расчетах учитывали только эффективные зонды. Чувствительность и специфичность рассчитывали для каждого из тестируемых ПЗС по следующим формулам:

$$\begin{aligned} \text{чувствительность} &= \text{ИП} / (\text{ИП} + \text{ЛО}); \\ \text{специфичность} &= \text{ИО} / (\text{ИО} + \text{ЛП}), \end{aligned}$$

где ИП — количество истинно-положительных зондов (зондов, предназначенных для детекции *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, стандартизированный сигнал которых выше тестируемого порогового значения); ЛП — количество ложноположительных зондов (зондов, предназначенных для детекции *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* и *L. pneumophila*, стандартизированный сигнал которых выше тестируемого порогового значения); ИО — количество истинно-отрицательных зондов (зондов, предназначенных для детекции *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* и *L. pneumophila*, стандартизированный сигнал которых ниже или равен тестируемому пороговому значению); ЛО — количество ложноотрицательных зондов (зондов, предназначенных для детекции *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, стандартизированный сигнал которых ниже или равен тестируемому пороговому значению).

На основании полученных значений строили ROC-кривую, рассчитывали площадь под кривой AUC (area under curve) и определяли ПЗС, соответствующий максимальному значению индекса Юдена (оптимальному соотношению чувствительности и специфичности), и ПЗС, соответствующий максимальной специфичности теста.

Оценка воспроизводимости результатов. Гибридизацию пулированного образца ДНК выполняли на трех разных слайдах после однократной гибридизации и последующей отмывки, а также три раза на одном слайде с последующими отмывками. Рассчитывали коэффициент корреляции Спирмена r между электрохимическими сигналами гибридизации слайдов, а также рассчитывали коэффициент вариации (Cv) каждого зонда на разных слайдах по формуле

$$Cv = (SD/M) \cdot 100\%,$$

где SD — стандартное отклонение ССГ зонда, M — среднее арифметическое значение ССГ зонда на всех протестированных слайдах.

Отбор эффективных зондов для детекции *S. pneumoniae* и *H. influenzae*. Последовательности специфических зондов, предназначенных для детекции *S. pneumoniae* и *H. influenzae* и продемонстрировавших эффективную гибридизацию при подобранных параметрах гибридизации пулированного образца, выравнивали относительно референсной последовательности генома соответствующего патогена. В качестве референса для *S. pneumoniae* использовали последовательность «*Streptococcus pneumoniae* R6, complete sequence» (номер в базе данных NCBI Nucleotide — NC_003098), для *H. influenzae* — последовательность «*Haemophilus influenzae* strain Hi375 chromosome, complete genome» (номер в базе данных NCBI Nucleotide — NZ_CP009610).

Локальное выравнивание нуклеотидных последовательностей осуществляли с применением программы BLASTN пакета программ BLAST+ v. 2.10.0 [27]. Определяли участки референсного генома, на которые отобраны зонды выравнивали с идентичностью 100% при отсутствии точечных несовпадений и пропусков нуклеотидов. Для аннотации выявленных участков референсных геномов использовали данные базы NCBI Nucleotide [22]. Затем с целью расширения панели используемых зондов выбирали все зонды (составляющие дизайн биочипа и специфичные к выявленным участкам), которые были предназначены для детекции *S. pneumoniae* или *H. influenzae*.

Тестирование биочипа. Для разработанного ДНК-биочипа проводили тестирование возможности выявления возбудителей ВП *S. pneumoniae* и *H. influenzae* в клинических образцах. В качестве специфического сигнала рассматривали эффективный сигнал пула специфических зондов, выбранных на предыдущем этапе. Далее с помощью ROC-анализа определяли ПЗС, соответствующий максимальной специфичности теста. Для *S. pneumoniae* и *H. influenzae* ПЗС определяли отдельно.

Статистическая обработка данных. Анализ данных проводили в свободно распространяемой среде программирования R v. 3.6.1. Использовали методы статистики с определением среднеарифметической величины (M), стандартного отклонения (SD), медианы (Me), первого и третьего квартилей ($Q1$ и $Q3$), коэффициента корреляции Спирмена r , коэффициента вариации (Cv), с построением ROC-кривой, определением показателей AUC и индекса Юдена.

Результаты

Выбор последовательностей зондов для детекции ДНК возбудителей внебольничной пневмонии. С помощью программы disprove выбраны зонды для специфической детекции пяти бактериальных возбудителей ВП: *S. pneumoniae*, *H. influenzae*,

M. pneumoniae, *S. pneumoniae*, *L. pneumophila*. Пул кандидатных зондов формировали путем разделения последовательностей референсных геномов на участки установленной длины. Проводили отбор кандидатных зондов по физико-химическим параметрам: длина зонда (24–32 н.о.), процентное содержание нуклеотидов гуанина и цитозина (40–60%), количество гомоповторов (менее пяти одинаковых нуклеотидов подряд), минимальная энергия фолдинга (≥ 0 ккал/моль), температура плавления (55–60°C). Для тестирования способности кандидатных зондов гибридизоваться с целевыми последовательностями выравнивали их алгоритмом BLAST с целевой и неспецифической базами последовательностей. Затем с помощью программы disprove отбирали максимально специфичные зонды по следующим параметрам: идентичность целевым последовательностям (покрытие — 100%, отсутствие точечных несовпадений и пробелов) и отсутствие перекрестной гибридизации с нецелевыми последовательностями (покрытие — менее 50%). В результате было отобрано по 30 зондов для детекции *S. pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *S. pneumoniae*, *L. pneumophila* и 22 зонда — для детекции *H. influenzae* (см. приложение). Отобранные зонды были успешно синтезированы на слайды Blank

Slide 12K (CustomArray, США). Каждый слайд состоял из 4 идентичных секторов, на каждом из которых содержалось 142 целевых зонда, 90 зондов отрицательного контроля и 90 зондов контроля качества синтеза.

Влияние параметров гибридизации на показатели ее качества. Нами проведен последовательный отбор наилучших сочетаний параметров гибридизации: размер фрагмента ДНК (200, 300, 400 н.о.), количество ДНК (1, 2 и 3 мкг) и температура гибридизации (40, 42, 45, 47 и 50°C) — для пулированного образца, содержащего ДНК *S. pneumoniae* и *H. influenzae*. На всех протестированных параметрах при гибридизации отрицательного образца не детектировано сигналов эффективных зондов.

Наибольшая эффективность гибридизации выявлена в диапазоне температур 42–47°C. Эффективность гибридизации снижалась при уменьшении количества ДНК с 2 до 1 мкг, а также при повышении их количества до 3 мкг. Не установлено зависимости эффективности гибридизации от длины фрагментов ДНК (рис. 1).

Анализ специфичности гибридизации показал, что наибольшее количество эффективных специфических зондов (для детекции *S. pneumoniae* и *H. influenzae*) и наивысший сигнал специфической гибридизации наблюдались при следующих комбинациях параметров:

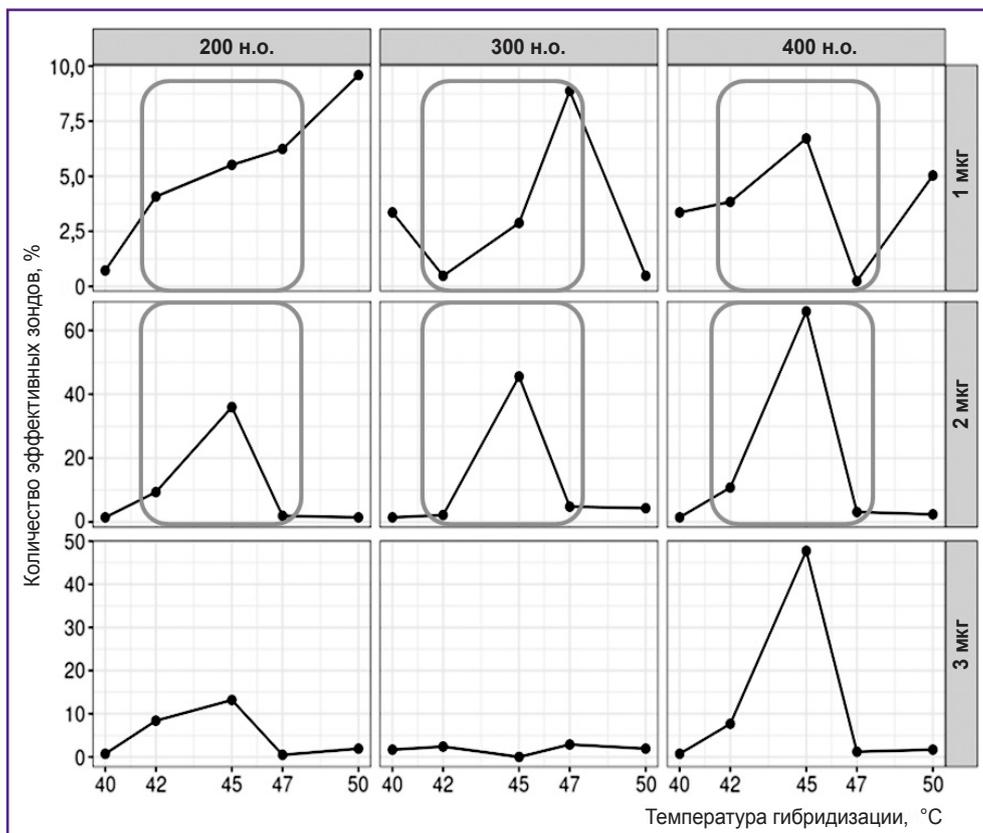


Рис. 1. Зависимость эффективности гибридизации зондов от ее параметров
200, 300, 400 н.о. — длина гибридизируемых фрагментов ДНК; 1, 2, 3 мкг — количество гибридизируемой ДНК; рамками отмечены параметры, отобранные для дальнейшей оптимизации

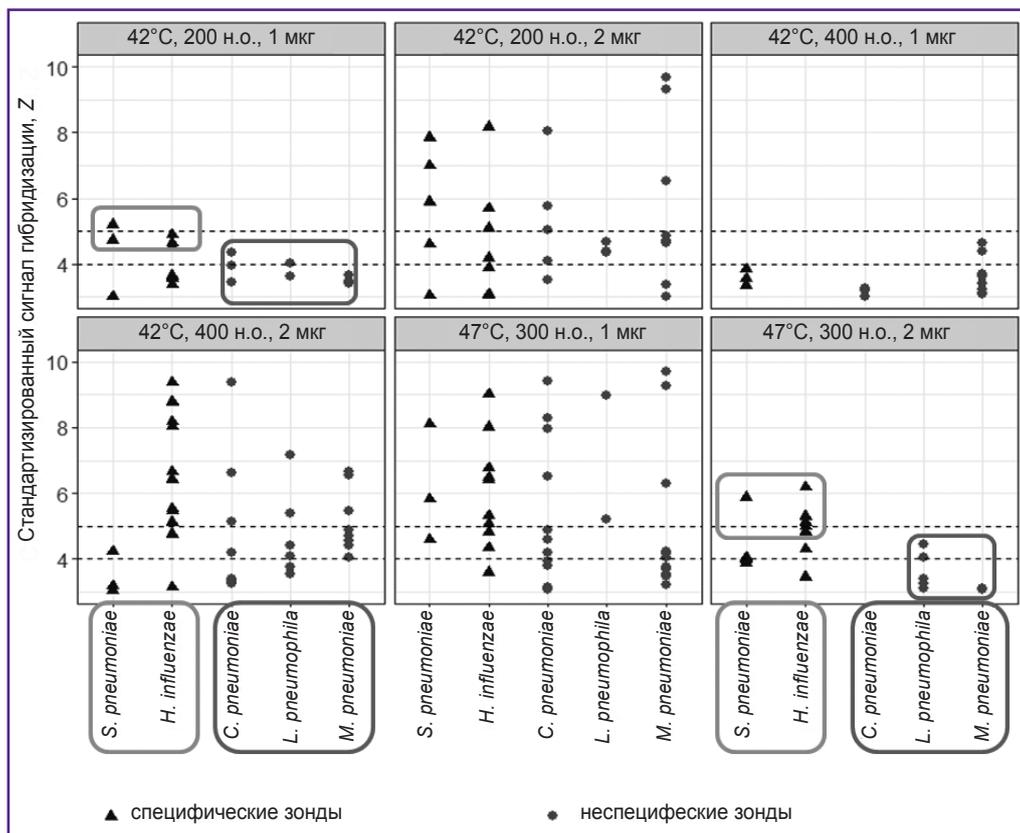


Рис. 2. Величины стандартизованного сигнала гибридизации эффективных специфических и неспецифических зондов при различных параметрах гибридизации
 42, 47°C — температура гибридизации; 200, 300, 400 н.о. — длина гибридизируемых фрагментов ДНК; 1–2 мкг — количество гибридизируемой ДНК. Пунктирными линиями обозначены границы сигнала высокого уровня 4 Z и очень высокого уровня — 5 Z. Рамками отмечены параметры, отобранные для дальнейшей оптимизации

1) 1 и 2 мкг ДНК, 200 и 400 н.о., 42°C; 2) 1 и 2 мкг ДНК, 300 н.о., 47°C. Однако при этом также выявлялись сигналы эффективных неспецифических зондов (для *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* и *L. pneumophila*) (рис. 2).

В результате отбора выявлены две комбинации параметров гибридизации, при которых обеспечивалось максимальное количество эффективных специфических зондов. Медианы их уровней превышали медианы уровней эффективных сигналов неспецифических зондов:

1 мкг ДНК, 200 н.о., 42°C — 9 специфических зондов с ССГ=4,5 [3,6; 4,7] Z и 9 неспецифических зондов с ССГ=3,6 [3,5; 3,9] Z, превышение в 1,3 раза;

2 мкг ДНК, 300 н.о., 47°C — 13 специфических зондов с ССГ=4,3 [4,0; 5,1] Z и 8 неспецифических зондов с ССГ=3,2 [3,1; 3,6] Z, превышение в 1,3 раза (см. рис. 2).

Результаты проведенного ROC-анализа показали, что для первого варианта комбинации параметров гибридизации (1 мкг ДНК, 200 н.о., 42°C) значение AUC ROC-кривой составило 0,57, а для второго варианта (2 мкг ДНК, 300 н.о., 47°C) — 0,89. В качестве

оптимальных параметров гибридизации был выбран второй вариант, для которого точка максимального значения индекса Юдена соответствовала ПЗС=3,5 Z (специфичность — 0,75; чувствительность — 0,85), а максимальной специфичности соответствовала точка ПЗС=4,5 Z (специфичность — 1,00; чувствительность — 0,46).

Таким образом, оптимальными параметрами гибридизации являются 2 мкг ДНК, 300 н.о., 47°C.

Оценка воспроизводимости. При гибридизации в выбранных условиях биочипы характеризовались высокой воспроизводимостью сигналов, полученных на разных слайдах и последовательно на одном слайде. Коэффициент корреляции r составил 0,93 [0,92; 0,94], а коэффициент вариации C_v — 9,3 [7,2; 11,3] %.

Характеристика зондов, специфично детектирующих *S. pneumoniae* и *H. influenzae*. На основании данных о гибридизации пулированного образца при оптимальных параметрах гибридизации из представленных в дизайне биочипа для дальнейшего применения были отобраны наиболее эффективные зонды для детекции *S. pneumoniae* и *H. influenzae* (табл. 1). Для детекции *S. pneumoniae*

Таблица 1

Характеристика зондов, специфично детектирующих *S. pneumoniae* и *H. influenzae*

Номер зонда	Длина, н.о.	Последовательность зонда	Координаты области генома*, комплементарной последовательности зонда, н.о.	Характеристика области генома	
str_1436936	28	agagttcctcctcataagtctatcc	218389–218416	Неаннотированная область генома	
str_836861	26	gacattataggacgtactgagcatac	224989–225014	Кодирующая область гена <i>pflF</i> , продукт гена — белок формиат ацетилтрансфераза 3 (AAK99036, NCBI Protein)	
str_1768809	30	gcaacaagcaagtagactagacagaaca	1363254–1363283	Область генома, комплементарная кодирующей, продукт гена — белок ABC-транспортёр (AAL00185, NCBI Protein)	
str_1768807	30	aagcaacaagcaagtagactagacagaac	1363252–1363281		
str_344828	24	gtctcctgtaacgccaagacatt	1828896–1828919	Область генома, комплементарная кодирующей области гена <i>ackA</i> , продукт гена — белок ацетат киназа (AAL00657, NCBI Protein)	
str_166887	24	ctgtttaaacccgaagaaggagtt	896865–896888	Кодирующая область гена <i>phtE</i> , продукт гена — прекурсор белка пневмококковой гистидиновой триады E (AAK99712, NCBI Protein)	
hi_100185	24	catcaatgaaatgaagccctgtcg	591988–592016	Неаннотированная область генома	
hi_100186	24	atcaatgaaatgaagccctgtcga	591989–592017		
hi_100187	24	tcaatgaaatgaagccctgtcgat	591990–592018		
hi_100188	24	caatgaaatgaagccctgtcgatt	591991–592019		
hi_416136	25	acatcaatgaaatgaagccctgtcg	591987–592016		
hi_416137	25	catcaatgaaatgaagccctgtcga	591988–592017		
hi_416138	25	atcaatgaaatgaagccctgtcgat	591989–592018		
hi_416139	25	tcaatgaaatgaagccctgtcgatt	591990–592019		
hi_711905	26	aacatcaatgaaatgaagccctgtcg	591991–592016		
hi_711906	26	acatcaatgaaatgaagccctgtcga	591992–592017		
hi_711907	26	catcaatgaaatgaagccctgtcgat	591992–592018		
hi_924234	27	aacatcaatgaaatgaagccctgtcga	59991–592017		
hi_924235	27	acatcaatgaaatgaagccctgtcgat	591992–592018		
hi_924236	27	catcaatgaaatgaagccctgtcgatt	591993–592019		
hi_458134	25	acaagttcgtttctgggattatg	818127–818151		Лocus NF38_04170 — область, гипотетически кодирующая протеин (AIT67430, NCBI Protein)
hi_458135	25	caagttcgtttctgggattatgt	818128–818152		
hi_699475	26	aggatcaatactgttatcagagtcgc	487919–487944		Лocus NF38_02410 — область, гипотетически кодирующая белок сигма-фактор РНК-полимеразы RpoD (AIT67106, NCBI Protein)
hi_699476	26	ggatcaatactgttatcagagtcgct	487920–487945		
hi_911551	27	caggatcaatactgttatcagagtcgc	487918–487944		
hi_911552	27	aggatcaatactgttatcagagtcgct	487919–487945		
hi_911553	27	ggatcaatactgttatcagagtcgctt	487920–487946		
hi_911554	27	gatcaatactgttatcagagtcgcttg	487921–487947		

* для подбора зондов использованы геномные последовательности базы данных NCBI Nucleotide: NC_003098 *Streptococcus pneumoniae* R6, complete sequence (дата обращения: 01.10.2022 г.); NZ_CP009610 *Haemophilus influenzae* strain Hi375 chromosome, complete genome (дата обращения: 03.05.2023 г.).

отобрали 6 из 30 присутствовавших на чипе специфических зондов, 5 из 6 зондов были специфичны к областям генома *S. pneumoniae*, кодирующим или комплементарным кодирующим белки, и 1 зонд был специфичен к неаннотированному участку генома.

Для детекции *H. influenzae* отобрали все 22 из 22 присутствовавших на чипе специфических зондов. Из них 14 были комплементарны к неаннотированной области генома *H. influenzae* и 8 — к двум участкам, кодирующим белки.

Таблица 2

Основные характеристики гибридизации клинических образцов, содержащих *S. pneumoniae* и *H. influenzae*

Характеристики	Номер слайда_ количество отмывок		
	Гибридизация образца, содержащего <i>S. pneumoniae</i>		
	Слайд 81559_04	Слайд 81562_02*	Слайд 81562_03
Количество эффективных зондов (ССГ ≥ 3)	16	22	14
Количество эффективных зондов, специфичных к <i>S. pneumoniae</i>	5	6	5
Значение AUC	1	0,59	0,74
ПЗС точки максимального значения индекса Юдена*	4,30 (se=1,00; sp=1,00)	3,90 (se=0,83; sp=0,63)	3,90 (se=0,83; sp=0,94)
Минимальный ПЗС в точке максимальной специфичности*	4,30 (se=1,00; sp=1,00)	4,50 (se=0,33; sp=1,00)	4,40 (se=0,67; sp=1,00)
Значения эффективного ССГ специфических зондов (Me [Q1; Q3]):			
<i>S. pneumoniae</i>	4,91 [4,68; 5,20]	4,33 [4,03; 5,04]	4,82 [4,63; 5,76]
<i>H. influenzae</i>	3,24 [3,17; 3,71]	3,83 [3,76; 3,97]	3,15 (1 зонд)
<i>M. pneumoniae</i>	4,20 [4,01; 4,20]	3,69 [3,48; 4,12]	3,87 [3,48; 4,09]
<i>C. pneumoniae</i>	3,29 [3,16; 3,34]	3,77 [3,46; 3,79]	3,53 (1 зонд)
<i>L. pneumophila</i>	3,56 (1 зонд)	4,13 [4,04; 4,27]	3,53 [3,35; 3,62]
Гибридизация образца, содержащего <i>H. influenzae</i>			
	Слайд 81562_04	Слайд 81563_01	Слайд 81563_02
Количество эффективных зондов (ССГ ≥ 3)	15	15	12
Количество эффективных зондов, специфичных к <i>H. influenzae</i>	6	5	6
Значение AUC	0,93	0,88	0,93
ПЗС точки максимального значения индекса Юдена*	4,90 (se=0,83; sp=1,00)	4,70 (se=0,83; sp=1,00)	4,00 (se=0,83; sp=0,90)
Минимальное ПЗС в точке максимальной специфичности*	5,00 (se=0,83; sp=1,00)	4,70 (se=0,83; sp=1,00)	4,80 (se=0,33; sp=1,00)
Значения эффективного ССГ специфических зондов (Me [Q1; Q3]):			
<i>S. pneumoniae</i>	3,78 (1 зонд)	3,44 (1 зонд)	Нет зондов
<i>H. influenzae</i>	5,11 [5,04; 5,13]	5,20 [5,12; 5,63]	4,12 [4,04; 4,88]
<i>M. pneumoniae</i>	4,49 [4,24; 4,72]	4,04 [3,99; 4,09]	3,87 [3,61; 4,20]
<i>C. pneumoniae</i>	3,83 [3,71; 3,95]	Нет зондов	Нет зондов
<i>L. pneumophila</i>	3,17; 3,68 (2 зонда)	3,53 [3,33; 3,81]	3,91 (1 зонд)

* в скобках указаны значения чувствительности (se) и специфичности (sp). ССГ — стандартизированный сигнал гибридизации, ПЗС — порог значимого сигнала.

Определение *S. pneumoniae* и *H. influenzae* в клинических образцах. При гибридизации генетического материала клинических образцов пациентов с ВП и установленным возбудителем *S. pneumoniae* среди эффективных зондов присутствовали специфичные ко всем пяти исследуемым патогенам (*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* и *L. pneumophila*), но при этом зонды, специфичные к ДНК *S. pneumoniae*, демонстрировали более высокий уровень ССГ (табл. 2).

В связи с тем, что как специфические, так и некоторые неспецифические зонды характеризовались эффективным сигналом гибридизации, в качестве ПЗС была выбрана точка максимальной специфичности, которой достигал только сигнал специфических зондов. Такой ПЗС обеспечивал 100% специфичность, хотя и приводил к возникновению ложноотрицательных сигналов (сигналы эффективных специфиче-

ских зондов, расцененные как отрицательные). Для *S. pneumoniae* ПЗС специфических зондов составил 4,5 Z. Аналогично при гибридизации клинических образцов пациентов с ВП и установленным возбудителем *H. influenzae* среди эффективных зондов присутствовали специфические и неспецифические зонды. При этом зонды, специфичные к ДНК *H. influenzae*, характеризовались более высоким уровнем ССГ. Выбранный ПЗС для зондов, предназначенных для детекции *H. influenzae*, составил 4,9 Z (см. табл. 2).

Обсуждение

С целью разработки ДНК-биочипа для параллельной детекции бактериальных возбудителей ВП с помощью собственной программы *disprose* и базы данных NCBI нами были подобраны последовательности ДНК-зондов, детектирующие *S. pneumoniae*, *H. influenzae*,

M. pneumoniae, *S. pneumoniae* и *L. pneumophila*, которые были успешно синтезированы на биочип. Кроме индивидуальных физико-химических особенностей зондов, которые определялись при разработке дизайна биочипа, важными параметрами, влияющими на эффективность и специфичность связывания зондов с таргетной ДНК, являются температура гибридизации и количество гибридизуемой ДНК. Повышение температуры гибридизации и снижение количества гибридизуемой ДНК приводят к увеличению специфичности связывания, однако это влечет за собой снижение эффективности, и наоборот [20].

С использованием пулированных образцов ДНК *S. pneumoniae* и *H. influenzae* по разработанному нами алгоритму последовательно исследовали различные сочетания параметров гибридизации ДНК на биочип: размера фрагментов ДНК, количества ДНК и температуры гибридизации. Путем последовательного отбора было выбрано оптимальное сочетание параметров гибридизации, при котором выявляется максимальное количество эффективных и специфических сигналов зондов для детекции *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, а именно 2 мкг ДНК, 300 н.о., 47°C.

При данном сочетании параметров гибридизации характеристики воспроизводимости сигналов, полученные как на разных биочипах, так и последовательно на одном биочипе, соответствовали показателям качества, указанным в литературе, — коэффициент корреляции выше 0,90 и коэффициент вариации менее 15% [28]. Тестирование пулированного отрицательного образца показало отсутствие эффективных сигналов зондов.

Результаты нашего исследования демонстрируют невозможность выбора одного «оптимального» зонда и необходимость оценки сигнала гибридизации пула специфических зондов для детекции каждого патогена. Нами проведен отбор синтезированных на биочипе зондов для детекции *S. pneumoniae* и *H. influenzae*, характеризующихся эффективным сигналом гибридизации в оптимальных условиях и специфичностью к выбранным участкам референсных геномов. Из них выбрано 6 зондов для детекции *S. pneumoniae* и 22 — для *H. influenzae* (см. табл. 1). Отметим, что значительное количество зондов для детекции *H. influenzae* было специфично к ограниченным участкам генома. Это объясняется тем, что исходный отбор зондов для детекции *H. influenzae* был осложнен высокой степенью генетического сходства данного патогена с близкородственными возбудителями *H. parainfluenzae* и *H. haemolyticus*, которые могут присутствовать в составе нормофлоры [29, 30]. Для снижения риска перекрестной гибридизации зондов и получения ложноположительных результатов из первоначального пула кандидатных зондов были исключены последовательности, схожие с геномом *H. parainfluenzae* и *H. haemolyticus*. Оставшиеся зонды были комплементарны нескольким уникальным областям генома *H. influenzae*. Зонды для детекции *S. pneumoniae*

выбирали из последовательностей, специфичных к участкам, располагающимся на всей протяженности генома патогена.

При тестировании клинических образцов установлено, что как специфические, так и некоторые неспецифические зонды характеризуются эффективным сигналом гибридизации, но при этом уровни ССГ специфических зондов были значительно выше. Выявление эффективных неспецифических сигналов зондов в ходе анализа клинических образцов с помощью разработанного биочипа может свидетельствовать о возможном носительстве детектируемых возбудителей. По данным литературы [31], бактериальные возбудители ВП могут входить в состав нормофлоры. Так, у здоровых детей 0–6 лет выявлены ДНК *S. pyogenes*, *S. pneumoniae*, *H. influenzae* и *Moraxella catarrhalis*, при этом частота их выявления сопоставима с частотой обнаружения у пациентов с острыми инфекциями верхних дыхательных путей. Количество случаев носительства *M. pneumoniae* у здоровых детей варьировало в разное время года от 3 до 58% [32], а частота асимптомного инфицирования *Chlamydia pneumoniae* у детей и взрослых — в пределах 1–6% [33, 34]. Носительство *Legionella species* остается недоказанным [35].

Для надежной детекции ДНК возбудителей ВП с помощью биочипа при возможном носительстве, а также при возможной неспецифической гибридизации зондов биочипа представляется критически важным тщательный расчет пороговых значений значимого сигнала гибридизации зондов для детекции каждого патогена в клинически значимой концентрации. В работе [36] показано, что не существует прямой зависимости между уровнями сигналов гибридизации разных зондов и концентрацией детектируемых молекул в исследуемом образце и даже зонды, специфичные к одному участку целевой последовательности, отличаются аффинностью, а следовательно, и уровнем сигнала гибридизации. Исходя из этого, необходим расчет ПЗС для каждого из тестируемых возбудителей ВП. В качестве ПЗС нами выбраны точки максимальной специфичности (4,5 Z — для *S. pneumoniae*, 4,9 Z — для *H. influenzae*), что позволило привести интерпретацию результатов гибридизации биочипа в соответствие с результатами, полученными методом ПЦР.

Таким образом, разработанный нами ДНК-биочип при оптимальных параметрах гибридизации и значимых пороговых значениях сигналов зондов обеспечивает параллельную детекцию ДНК возбудителей ВП *S. pneumoniae* и *H. influenzae* с достаточной эффективностью, специфичностью и воспроизводимостью. Биочип не имеет аналогов в России и обладает рядом преимуществ по сравнению с зарубежными разработками. Детекция каждого патогена обеспечивается набором уникальных специфических зондов, что увеличивает вероятность обнаружения патогена в образце. За счет применения рандомных декануклеотидных праймеров обеспечены унификация

пробоподготовки биоматериала, снижение себестоимости анализа и уменьшение трудозатрат. Еще одним важным преимуществом предложенного биочипа является возможность его многократного использования (не менее пяти раз без потери качества получаемых результатов). Предложенный нами алгоритм анализа результатов гибридизации с использованием пороговых значений сигналов позволяет дифференцировать клинически значимую инфекцию и носительство бактериальных возбудителей ВП. Данный алгоритм с использованием нашего ДНК-биочипа может применяться для разработки способов детекции других бактериальных возбудителей ВП, таких как *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* и *L. pneumophila*.

Заключение

Разработан и синтезирован экспериментальный вариант ДНК-биочипа для параллельной индикации бактериальных возбудителей внебольничной пневмонии: *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* и *L. pneumophila*. В ходе настоящего исследования на примере бактериальных возбудителей *S. pneumoniae* и *H. influenzae* подобраны оптимальные условия гибридизации ДНК (количество — 2 мкг, размер фрагмента — 300 н.о., температура гибридизации — 47°C), позволяющие получать сигналы с достаточной чувствительностью, специфичностью и воспроизводимостью. Выявлен пул зондов для специфической детекции *S. pneumoniae* (6 штук) и *H. influenzae* (22 штук), характеризующихся эффективным сигналом гибридизации в выявленных условиях. Определены пороговые значения значимых сигналов зондов для специфической детекции *S. pneumoniae* и *H. influenzae* в клинических образцах, позволяющие интерпретировать результаты гибридизации (4,5 Z — для выявления *S. pneumoniae* и 4,9 Z — для выявления *H. influenzae*).

Разработанный биочип может использоваться для совершенствования лабораторной диагностики и мониторинга бактериальных возбудителей внебольничной пневмонии.

Источники финансирования. Данное исследование профинансировано из средств государственного бюджета в рамках выполнения отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на период 2021–2025 гг. «Научное обеспечение эпидемиологического надзора и санитарной охраны территории Российской Федерации. Создание новых технологий, средств и методов контроля и профилактики инфекционных и паразитарных болезней».

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Чучалин А.Г., Синопальников А.И., Козлов Р.С., Авдеев С.Н., Тюрин И.Е., Руднов В.А., Рачина С.А., Фе-

сенко О.В. Клинические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике тяжелой внебольничной пневмонии у взрослых. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия* 2015; 17(2): 84–126.

Chuchalin A.G., Sinopalnikov A.I., Kozlov R.S., Avdeev S.N., Tyurin I.E., Rudnov V.A., Ratchina S.A., Fesenko O.V. Clinical guidelines on diagnosis, treatment and prophylaxis of severe community-acquired pneumonia in adults. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya himioterapiya* 2015; 17(2): 84–126.

2. Ежлова Е.Б., Демина Ю.В., Ефимов Е.И., Бруснигина Н.Ф., Малеев В.В., Тартаковский И.С., Биличенко Т.Н., Шкарин В.В., Ковалишена О.В., Чубукова О.А., Благоднравова А.С. *Внебольничные пневмонии: классификация, патогенез, этиология, эпидемиология, лабораторная диагностика на современном этапе. Аналитический обзор.* М; 2013.

Ezhlova E.B., Demina Yu.V., Efimov E.I., Brusnigina N.F., Maleev V.V., Tartakovskij I.S., Bilichenko T.N., Shkarin V.V., Kovalishena O.V., Chubukova O.A., Blagonravova A.S. *Vnebol'nichnye pnevmonii: klassifikatsiya, patogenez, etiologiya, epidemiologiya, laboratornaya diagnostika na sovremennom etape. Analiticheskiy obzor* [Community-acquired pneumonia: classification, pathogenesis, etiology, epidemiology, laboratory diagnostics at the present stage. Analytical review]. Moscow; 2013.

3. Rozenbaum M.H., Pechivanoglou P., van der Werf T.S., Lo-Ten-Foe J.R., Postma M.J., Hak E. The role of Streptococcus pneumoniae in community-acquired pneumonia among adults in Europe: a meta-analysis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013; 32(3): 305–316, <https://doi.org/10.1007/s10096-012-1778-4>.

4. World Health Organization. *The top 10 causes of death.* URL: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>.

5. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. *Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2022 году».* 2023. URL: https://www.rospotreb-nadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=25076.

Federal'naya sluzhba po nadzoru v sfere zashchity prav potrebiteley i blagopoluchiya cheloveka. *Gosudarstvennyy doklad "O sostoyanii sanitarno-epidemiologicheskogo blagopoluchiya naseleniya v Rossiyskoy Federatsii v 2022 godu"*. [Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare. State report: "On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2022"]. 2023. URL: https://www.rospotreb-nadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=25076.

6. Зайцев А.А., Синопальников А.И. Практические рекомендации по ведению пациентов с нетяжелой внебольничной пневмонией. *Русский медицинский журнал* 2020; 4: 19–23.

Zajcev A.A., Sinopal'nikov A.I. Practical recommendations for the management of patients with non-severe community-acquired pneumonia. *Russkij medicinskij zhurnal* 2020; 4: 19–23.

7. Зырянов С.К., Ченкуров М.С., Ивжиц М.А., Батченко Ю.А., Иванова Е.Б., Якунина М.А. Исследование структуры сопутствующих заболеваний и этиологии внебольничной пневмонии у пациентов пожилого и старческо-

го возраста. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия* 2020; 22(3): 242–248.

Zyryanov S.K., Chenkurov M.S., Ivzhits M.A., Batechko Yu.A., Ivanova E.B., Yakunina M.A. Etiology of community-acquired pneumonia and prevalence of comorbidities in elderly patient population. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya* 2020; 22(3): 242–248, <https://doi.org/10.36488/cmasc.2020.3.242-248>.

8. Зарипова А.З., Валиева Р.И., Баязитова Л.Т., Целищева М.В. Диагностика пневмококковых инфекций респираторного тракта. *Практическая пульмонология* 2018; 4: 74–80.

Zaripova A.Z., Valieva R.I., Bayazitova L.T., Tselischeva M.V. Diagnosis of pneumococcal infections of the respiratory tract. *Prakticheskaya pul'monologiya* 2018; 4: 74–80.

9. Bonten M.J.M., Huijts S.M., Bolkenbaas M., Webber C., Patterson S., Gault S., van Werkhoven C.H., van Deursen A.M.M., Sanders E.A.M., Verheij T.J.M., Patton M., McDonough A., Moradoghli-Haftvani A., Smith H., Mellelieu T., Pride M.W., Crowther G., Schmoele-Thoma B., Scott D.A., Jansen K.U., Lobatto R., Oosterman B., Visser N., Caspers E., Smorenburg A., Emini E.A., Gruber W.C., Grobbee D.E. Polysaccharide conjugate vaccine against pneumococcal pneumonia in adults. *The N Engl J Med* 2015; 372: 1114–1125, <https://doi.org/10.1056/nejmoa1408544>.

10. Falkenhorst G., Remschmidt C., Harder T., Wichmann O., Glodny S., Hummers-Pradier E., Ledig T., Bogdan C. Background paper to the updated pneumococcal vaccination recommendation for older adults in Germany. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz* 2016; 59(12): 1623–1657, <https://doi.org/10.1007/s00103-016-2466-9>.

11. Харитонов М.А., Журкин М.А., Иванов В.В. Клинико-диагностические особенности внебольничной вирусно-бактериальной пневмонии. *Практическая пульмонология* 2016; 1: 30–35.

Haritonov M.A., Zhurkin M.A., Ivanov V.V. Clinical and diagnostic features of community-acquired viral-bacterial pneumonia. *Prakticheskaya pul'monologiya* 2016; 1: 30–35.

12. Афтаева Л.Н., Мельников В.Л., Кубрина О.Ю., Орешкина А.А. Особенности течения внебольничных пневмоний. *Вестник Пензенского государственного университета* 2019; 25(1): 68–73.

Aftaeva L.N., Melnikov V.L., Kubrina O.Yu., Oreshkina A.A. Features of the course of community-acquired pneumonia. *Vestnik Penzenskogo gosudarstvennogo universiteta* 2019; 25(1): 68–73.

13. Чубукова О.А., Шкарин В.В. Особенности эпидемиологии внебольничных пневмоний с сочетанной этиологией. *Медицинский альманах* 2017; 49(4): 149–156.

Chubukova O.A., Shkarin V.V. Features of the epidemiology of community-acquired pneumonia with combined etiology. *Medicinskij al'manah* 2017; 49(4): 149–156.

14. Zimenkov D.V., Kulagina E.V., Antonova O.V., Zhuravlev V.Y., Gryadunov D.A. Simultaneous drug resistance detection and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* using a low-density hydrogel microarray. *J Antimicrob Chemother* 2016; 71(6): 1520–1531, <https://doi.org/10.1093/jac/dkw015>.

15. Fesenko E.E., Kireyev D.E., Gryadunov D.A., Mikhailovich V.M., Grebennikova T.V., L'vov D.K., Zasedatelev A.S. Oligonucleotide microchip for subtyping of influenza A virus. *Influenza Other Respir Viruses* 2007; 1(3): 121–129, <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2007.00018.x>.

16. Shaik A.H., Govindan V., Nagraj G., Ravikumar K.L. Development of a microarray-based method for simultaneous detection and serotyping of *Streptococcus pneumoniae* from culture negative serum samples. *J Appl Biol Biotech* 2019; 7(5): 15–24, <https://doi.org/10.7324/jabb.2019.70503>.

17. Leski T.A., Lin B., Malanoski A.P., Stenger D.A. Application of resequencing microarrays in microbial detection and characterization. *Future Microbiol* 2012; 7: 625–637, <https://doi.org/10.2217/fmb.12.30>.

18. Tokman H.B., Aslan M., Ortaköylü G., Algingil R.C., Yüksel P., Karakullukçu A., Kalayci F., Saribaş S., Cakan H., Demir T., Kocazeybek B.S. Microorganisms in respiratory tract of patients diagnosed with atypical pneumonia: results of a research based on the use of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) DNA microarray method and enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin Lab* 2014; 60(6): 1027–1034, <https://doi.org/10.7754/clin.lab.2013.130731>.

19. Ma X., Li Y., Liang Y., Liu Y., Yu L., Li C., Liu Q., Chen L. Development of a DNA microarray assay for rapid detection of fifteen bacterial pathogens in pneumonia. *BMC Microbiol* 2020; 20(1): 177, <https://doi.org/10.1186/s12866-020-01842-3>.

20. You Y.H., Wang P., Wang Y.H., Wang H.B., Yu D.Z., Hai R., Zhang J.Z. Assessment of comparative genomic hybridization experiment by an in situ synthesized Combi Matrix microarray with *Yersinia pestis* vaccine strain EV76 DNA. *Biomed Environ Sci* 2010; 23(5): 384–390, [https://doi.org/10.1016/s0895-3988\(10\)60080-3](https://doi.org/10.1016/s0895-3988(10)60080-3).

21. Filatova E.N., Chaikina A.S., Brusnigina N.F., Makhova M.A., Utkin O.V. An algorithm for the selection of probes for specific detection of human disease pathogens using the DNA microarray technology. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2022; 14(1): 6, <https://doi.org/10.17691/stm2022.14.1.01>.

22. National Center for Biotechnology Information. *Nucleotide*. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>.

23. Caruthers M.H. Gene synthesis machines: DNA chemistry and its uses. *Science* 1985; 230(4723): 281–285, <https://doi.org/10.1126/science.3863253>.

24. *CustomArray Inc*. URL: <http://www.customarrayinc.com>.

25. R Core Team. *R: a language and environment for statistical computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing; 2014. URL: <http://www.R-project.org/>.

26. Liu R.H., Dill K., Fuji H.S., McShea A. Integrated microfluidic biochips for DNA microarray analysis. *Expert Rev Mol Diagn* 2006; 6(2): 253–261, <https://doi.org/10.1586/14737159.6.2.253>.

27. Camacho C., Coulouris G., Avagyan V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., Madden Th.L. BLAST+: architecture and applications. *BMC Bioinformatics* 2009; 10: 421, <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>.

28. Raman T., O'Connor T.P., Hackett N.R., Wang W., Harvey B.G., Attiyeh M.A., Dang D.T., Teater M., Crystal R.G. Quality control in microarray assessment of gene expression in human airway epithelium. *BMC Genomics* 2009; 10: 493, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-493>.

29. Kosikowska U., Biemasiuk A., Rybojad P., Łoś R., Malm A. *Haemophilus parainfluenzae* as a marker of the upper respiratory tract microbiota changes under the influence of preoperative prophylaxis with or without postoperative treatment in patients with lung cancer. *BMC Microbiol* 2016; 16: 62, <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0679-6>.

30. Pickering J., Richmond P.C., Kirkham L.A. Molecular tools for differentiation of non-typeable *Haemophilus influenzae*

from *Haemophilus haemolyticus*. *Front Microbiol* 2014; 5: 664, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00664>.

31. Lin B., Wang Z., Vora G.J., Thornton J.A., Schnur J.M., Thach D.C., Blaney K.M., Ligler A.G., Malanoski A.P., Santiago J., Walter E.A., Agan B.K., Metzgar D., Seto D., Daum L.T., Kruzelock R., Rowley R.K., Hanson E.H., Tibbetts C., Stenger D.A. Broad spectrum respiratory tract pathogen identification using resequencing DNA microarrays. *Genome Res* 2006; 16(4): 527–535, <https://doi.org/10.1101/gr.4337206>.

32. Spuesens E.B., Fraaij P.L., Visser E.G., Hoogenboezem T., Hop W.C., van Adrichem L.N., Weber F., Moll H.A., Broekman B., Berger M.Y., van Rijsoort-Vos T., van Belkum A., Schutten M., Pas S.D., Osterhaus A.D., Hartwig N.G., Vink C., van Rossum A.M. Carriage of *Mycoplasma pneumoniae* in the upper respiratory tract of symptomatic and asymptomatic children: an observational study. *PLoS Med* 2013; 10(5): e1001444, <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001444>.

33. Schmidt S.M., Müller C.E., Mahner B., Wiersbitzky S.K. Prevalence, rate of persistence and respiratory tract symptoms

of *Chlamydia pneumoniae* infection in 1211 kindergarten and school age children. *Pediatr Infect Dis J* 2002; 21(8): 758–762, <https://doi.org/10.1097/00006454-200208000-00012>.

34. Miyashita N., Niki Y., Nakajima M., Fukano H., Matsushima T. Prevalence of asymptomatic infection with *Chlamydia pneumoniae* in subjectively healthy adults. *Chest* 2001; 119(5): 1416–1419, <https://doi.org/10.1378/chest.119.5.1416>.

35. Ramirez J.A., Ahkee S., Tolentino A., Miller R.D., Summersgill J.T. Diagnosis of *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, or *Chlamydia pneumoniae* lower respiratory infection using the polymerase chain reaction on a single throat swab specimen. *Diagn Microbiol Infect Dis* 1996; 24(1): 7–14, [https://doi.org/10.1016/0732-8893\(95\)00254-5](https://doi.org/10.1016/0732-8893(95)00254-5).

36. Ghindilis A.L., Smith M.W., Schwarzkopf K.R., Roth K.M., Peyvan K., Munro S.B., Lodes M.J., Stöver A.G., Bernards K., Dill K., McShea A. CombiMatrix oligonucleotide arrays: genotyping and gene expression assays employing electrochemical detection. *Biosens Bioelectron* 2007; 22(9–10): 1853–1860, <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.06.024>.