

УДК 579.22:57.083.1:575.111

[https://doi.org/10.52058/2786-4952-2024-6\(40\)-1090-1098](https://doi.org/10.52058/2786-4952-2024-6(40)-1090-1098)

Єгорова Світлана Юріївна кандидат біологічних наук, доцент, доцент кафедри мікробіології, вірусології, імунології, епідеміології та медико-біологічної фізики й інформатики, Дніпровський державний медичний університет, вул. Володимира Вернадського, 9, м. Дніпро, 49044, тел.: (068) 871-17-35, <https://orcid.org/0000-0002-2456-4324>

РОЛЬ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНИХ МЕТОДІВ ДОСЛІДЖЕННЯ В ІДЕНТИФІКАЦІЇ ТА ТИПУВАННІ МІКРООРГАНІЗМІВ

Анотація. Молекулярно-генетичні методи широко використовуються для виявлення джерела інфекції та факторів передачі збудника під час епідемічних спалахів. Молекулярно-генетичний моніторинг дозволяє відстежувати популяційну структуру збудників інфекційних хвороб з метою оцінки та прогнозування епідемічної ситуації.

Внутрішньовидове молекулярно-генетичне типування мікроорганізмів проводиться з метою визначення генетичної спільності штамів, виділених від хворих, ймовірного джерела інфекції та факторів передачі інфекції. На основі встановленої генетичної спільності штамів мікроорганізмів верифікують випадки внутрішньолікарняного інфікування, а також ідентифікують госпітальні штами. За допомогою молекулярного моніторингу проводять ідентифікацію епідемічних клонів, виявляють штами мікроорганізмів з незвичайними біологічними властивостями, штами з високою вірулентністю та резистентністю до антимікробних препаратів. Моніторинг за мікроеволюційними змінами, що відбуваються в геномах збудників захворювань, дозволяє оцінити їхнє епідеміологічне значення.

Методи внутрішньовидового типування мікроорганізмів використовують, щоб довести зв'язок між джерелом інфекції, факторами передачі та наступними випадками захворювань. Припускають, що штами збудника, виділені від джерела інфекції, з об'єктів зовнішнього середовища, які є факторами передачі, і від усіх хворих в осередку є ідентичними за своїми біологічними властивостями на відміну від штамів мікроорганізмів, не пов'язаних з епідемічним ланцюжком.

Ідентифікація міжнародних епідемічних клонів збудників здійснюється на підставі зіставлення даних молекулярно-генетичного типування з даними, представленими в міжнародних електронних базах даних генотипів мікроорганізмів. Молекулярно-генетичне типування засноване на виявленні специфічних генетичних особливостей штамів збудника (генетичні маркери, які є ділянками нуклеотидних послідовностей ДНК або РНК мікроорганізму).

Ключові слова: молекулярно-генетичні методи, генетичні методи типування мікроорганізмів, генетичні маркери.

Yehorova Svitlana Yuryivna PhD biological sciences, Associate Professor, Associate Professor of the Department of Microbiology, virology, immunology, epidemiology and Biomedical physics and informatics, Dnipro State Medical University, Volodymyra Vernadskyi St., 9, Dnipro, 49044, tel.: (068) 871-17-35, <https://orcid.org/0000-0002-2456-4324>

THE ROLE OF MOLECULAR AND GENETIC RESEARCH METHODS IN THE IDENTIFICATION AND TYPING OF MICROORGANISMS

Abstract. Molecular genetic methods are widely used to identify the source of infection and the factors of pathogen transmission during epidemic outbreaks. Molecular genetic monitoring allows monitoring the population structure of infectious disease agents for the purpose of assessing and forecasting the epidemic situation.

Intraspecies molecular genetic typing of microorganisms is carried out in order to determine the genetic similarity of strains isolated from patients, the probable source of infection and factors of infection transmission. On the basis of the established genetic commonality of strains of microorganisms, cases of nosocomial infection are verified, and hospital strains are also identified. With the help of molecular monitoring, epidemic clones are identified, strains with unusual biological properties, strains with high virulence and resistance to antimicrobial drugs are detected. Monitoring of microevolutionary changes occurring in the genomes of pathogens allows to assess their epidemiological significance.

Methods of intraspecies typing of microorganisms are used to prove the connection between the source of infection, transmission factors and subsequent cases of diseases. It is assumed that strains of the causative agent isolated from the source of infection, from objects of the external environment that are transmission factors, and from all patients are identical in their biological properties, unlike strains of microorganisms not connected to the epidemic chain.

Identification of international epidemic clones of pathogens is carried out on the basis of comparison of molecular genetic typing data with data presented in international electronic databases of genotypes of microorganisms. Molecular genetic typing of microorganisms is based on the detection of specific genetic features of strains of the pathogen (genetic markers, which are sections of nucleotide sequences of DNA or RNA of the microorganism).

Keywords: molecular genetic methods, genetic methods of microorganism typing, genetic markers.

Постановка проблеми. Сучасна мікробіологія має принципово нові риси порівняно з класичною мікробіологією, що зумовлено новими техноло-

гічними підходами і методичними можливостями. Водночас, спостерігається прискорена еволюція патогенних мікроорганізмів, відбувається активація інфекцій, які раніше вважалися контрольованими.

Молекулярно-генетичні методи дослідження дуже швидко увійшли до арсеналу методів боротьби з інфекційними захворюваннями, ставши важливим доповненням класичної мікробіології. Оскільки ці методи засновані на виявленні РНК або ДНК збудника, їх можна застосовувати для виявлення практично будь-яких мікроорганізмів. Молекулярно-генетичні методи дуже важливі для виявлення мікроорганізмів, які важко або повільно культивуються, а також збудників, яким властива антигенна мінливість.

Досконалий контроль інфекційних хвороб ґрунтується на ранній та специфічній їх діагностиці, і саме молекулярно-генетичні методи дозволяють здійснювати діагностику ще до появи специфічних антитіл, що особливо важливо для літніх людей та для пацієнтів зі зниженою імунологічною реактивністю.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. До методів молекулярно-генетичного типування відносяться методи, що ґрунтуються на ампліфікації нуклеїнових кислот, гібридизації нуклеїнових кислот, рестрикційному аналізу, та ряд методів, заснованих на секвенуванні.

Ампліфікаційні методи засновані на накопиченні (ампліфікації) копій нуклеїнових кислот до таких значень, які можна визначити за допомогою приладів. Найбільше застосування у лабораторній практиці отримала полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР). Автор цієї розробки Кері Малліс отримав Нобелівську премію в 1993 році, і саме цей метод покладений в основу багатьох досліджень. ПЛР вважається золотим стандартом для молекулярної діагностики вірусних інфекцій завдяки високій чутливості та специфічності [1].

Метод молекулярної гібридизації полягає в визначенні нуклеїнових кислот без збільшення їх кількості (це так званий неампліфікаційний метод). Виявлення ДНК (або РНК) збудників відбувається завдяки молекулярному зонду, внаслідок взаємодії комплементарних нуклеотидних послідовностей з денатурованими (розплетеними) нитками ДНК. Молекулярний зонд являє собою комплементарну коротку послідовність ДНК або РНК, мічену радіоактивною або флюоресцентною міткою.

Рестрикційний аналіз базується на накопиченні специфічного продукту за допомогою ПЛР і використанні ендонуклеаз рестрикції (ферментів, що розрізають подвійну спіраль ДНК). У геномі кожної таксономічної одиниці міститься строго визначене число ділянок упізнавання для певної рестриктази. Рестрикційний аналіз дозволяє визначити генетичну споріденість мікроорганізмів, а також виявити ділянки, де відбулися мутації.

Методи, засновані на секвенуванні, відіграють важливу роль у молекулярно-генетичних дослідженнях. Секвенування – це визначення

послідовності нуклеотидів у нуклеїнових кислотах, і на сьогодні виділяють три покоління методів секвенування. До найбільш ранніх (перше покоління) відносять метод Максама-Гілберта, або хімічний метод, розроблений у 1976 році, і метод Сенгера, який ще називають ферментативним методом. Ф. Сенгер у 1977 році винайшов метод визначення нуклеотидної послідовності ДНК методом ферментативного копіювання за допомогою ДНК-полімерази з зупинкою подовження ланцюга. Цей метод до сих пір залишається «золотим стандартом» визначення нуклеотидної послідовності ДНК та широко використовується в науково-дослідних роботах. Визначення нуклеотидної послідовності ДНК за Сенгером є найточнішим методом секвенування, за допомогою цього методу розшифровано геном людини, однак продуктивність методу невелика. Так, проєкт «Геном людини» зайняв 13 років і коштував близько 3 мільярдів доларів. Проте, під час реалізації проєкту були розроблені технічні рішення, що привели до розвитку технологій секвенування наступного покоління. Наприклад, спосіб підготовки ДНК, названий методом «дробовика» («shotgun-sequencing», фрагментація ДНК, клонування отриманих коротких фрагментів), став основою для створення потужного паралельного секвенування, використовуваного в наступних поколіннях секвенування [2].

До другого покоління методів секвенування відносяться більш ефективні методи середини 1990-х років, в основі яких лежить принцип отримання сигналу від великої кількості молекул ДНК. Третє покоління методів секвенування направлено на реєстрацію сигналу від лише однієї молекули ДНК, яка і піддається аналізу. Саме третє покоління в сучасній літературі називають Next Generation Sequencing (NGS), або високопродуктивне секвенування. Серед основних відмінностей між другим і третім поколінням методів секвенування є відсутність етапу ампліфікації. Ця особливість дозволила суттєво прискорити, спростити та здешевити оброблення геномних даних [3, 4, 5].

Таким чином, значна роль у сучасній лабораторній діагностиці інфекційних захворювань відводиться молекулярно-генетичним методам завдяки їх високому рівню специфічності і чутливості, однак вони поза межами досяжності для країн з обмеженими ресурсами через їхню високу вартість, складність приладів і потребу в технічній експертизі.

Мета статті – охарактеризувати основні принципи молекулярно-генетичних методів ідентифікації і типування мікроорганізмів, роль та місце молекулярної діагностики в системі сучасної лабораторної діагностики інфекційних хвороб.

Виклад основного матеріалу. Методи внутрішньовидового типування мікроорганізмів використовують, щоб довести зв'язок між джерелом інфекції, факторами передачі інфекції та наступними випадками захворювань. Припускають, що штами збудника, виділені від джерела інфекції, з об'єктів

зовнішнього середовища, які є факторами передачі, і від усіх хворих в осередку, пов'язаних з джерелом інфекції, є ідентичними за своїми біологічними властивостями на відміну від штамів мікроорганізмів, не пов'язаних з епідемічним ланцюжком, що вивчається. Методи внутрішньовидового типування мікроорганізмів поділяють на фенотипічні та генотипічні (молекулярно-генетичні). Фенотипічні методи включають біотипування (визначення варіанту за ферментативною активністю), серотипування (визначення антигенної структури), фаготипування, антибіотикотипування, бактеріоцинотипування (типуювання за відмінностями в чутливості до бактеріофагів, антибіотиків, бактеріоцинів, відповідно). Проте, фенотипічні ознаки є нестабільними і можуть змінюватись спонтанно або під дією різних чинників. Також до недоліків фенотипічних методів можна віднести трудомісткість та значні витрати часу. Застосування методів молекулярно-генетичного типування дозволяє скоротити час, що витрачається на ідентифікацію госпітальних та епідемічно значущих штамів мікроорганізмів, та своєчасно розпочати протиепідемічні заходи [6].

Молекулярно-генетичне типування мікроорганізмів засноване на виявленні специфічних генетичних особливостей штамів збудника, загальних для штамів, що походять з одного джерела, і різних у штамів, що виділені з різних джерел. Йдеться про генетичні маркери, які є ділянками нуклеотидних послідовностей ДНК або РНК мікроорганізму. Як генетичні маркери використовуються послідовності ДНК, які повторюються (прямі повтори, інвертовані повтори, тандемні повтори і паліндромні послідовності, розташовані групами), сайти впізнавання ендонуклеазами рестрикції, мобільні генетичні елементи (бактеріофаги, транспозони, IS-елементи), точкові мутації в генах «домашнього господарства» (housekeeping genes).

Молекулярно-генетичні методи, які дозволяють типувати мікроорганізми, ґрунтуючись на кількості фрагментів ДНК та їх молекулярній вазі, іноді називають геномною дактилоскопією. Молекулярна вага фрагментів ДНК оцінюється за молекулярною вагою контрольних маркерів і виражається у кількості пар нуклеотидів. Такий індивідуальний набір, що є специфічним для кожного штаму, називається патерном або ДНК-фінгерпринтом (DNA fingerprints, геномний «відбиток пальця» або «геномний дактиловідбиток»).

ДНК-фінгерпринтинг дозволяє аналізувати гіперваріабельні тандемні повтори VNTR (від англ. variable number of tandem repeats - кількість тандемних повторів, яка може бути різною). Зонди на основі послідовності тандемних повторів можуть бути використані для одночасної ідентифікації великої кількості генетичних локусів. Відповідні зонди існують у вигляді рекомбінантних форм векторів, отриманих на основі бактеріофага M13. Ідентифікують VNTR при розрізанні ДНК за допомогою рестриктаз, Саузерн-блотингу із специфічною пробою ДНК (зондом), комплементарною до послідовності, яка повторюється [7].

Швидким методом генотипування мікроорганізмів є ПЛР ампліфікація повторюваних послідовностей міжгенних поліндромів (Repetitive Extragenic Palindromic sequence-based PCR, REP-PCR). Матрицею синтезу маркерних фрагментів при REP-PCR є некодуючі послідовності, що повторюються, які в характерному порядку розподілені по всьому бактеріальному геному. Незважаючи на те, що функції цих елементів ДНК, що повторюються, залишаються невідомими, їх присутність має велике значення для ДНК-фінгерпринтинга. При REP-PCR використовуються праймери, комплементарні безпосередньо до цих повторюваних консенсусних послідовностей, що дозволяють ампліфікувати фрагменти ДНК між елементами, що повторюються. Виділяють три сімейства послідовностей, що повторюються: безпосередньо REP-послідовності, повторювані міжгенні консенсусні послідовності ентеробактерій ERIC (англ. Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus sequences) і BOX-елементи, що є високо консервативними повторюваними послідовностями *Streptococcus pneumoniae*. Використання перелічених елементів як генетичних маркерів лягло в основу відповідних технік ДНК фінгерпринтинга: REP-PCR, ERIC-PCR, BOX-PCR. Метод добре себе зарекомендував для типування мікроорганізмів, включаючи бактерії, що мають епідеміологічне значення, такі як *Acinobacter spp.*, *M. tuberculosis*, *Clostridium difficile*.

До молекулярно-генетичних методів, що використовують фінгерпринти для віднесення культур мікроорганізмів до того чи іншого штаму, відноситься метод електрофорезу ДНК в пульсуючому полі (англ. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), синонім: метод пульс-електрофорезу) – це модифікація електрофорезу в агарозному гелі, за допомогою якого вдається розділяти дуже великі молекули ДНК. Звичайний гель-електрофорез не дозволяє розділити такі молекули через сталість електричного поля, яке надає молекулам змієподібну конфігурацію. Молекули, які володіють такою конфігурацією, рухаються в гелях із постійною швидкістю незалежно від довжини молекул. Якщо ж напрямок електричного поля буде часто змінюватися, швидкість руху молекул буде визначатися їхньою здатністю переорієнтуватися відповідно цих змін. Такий процес у великих молекул займає значно більше часу, внаслідок чого вони будуть відставати. Таким чином, метод пульс-електрофорезу полягає в тому, що хромосомну ДНК ізолятів мікроорганізму розщеплюють рестриктазами, потім проводять електрофорез таким чином, щоб напрямок електричного поля змінювалося з певною частотою, тобто електричний струм подається в імпульсному режимі в різних напрямках. В умовах «пульсуючого» електричного поля, на відміну від традиційного електрофорезу з постійним напрямом електричного струму, великі фрагменти ДНК мігрують через пори гелю, що дозволяє розділити їх по масі. Далі гель забарвлюють бромистим етидієм і оцінюють результат при візуалізації в ультрафіолетовому випромінюванні. Профілі рестрикції (патерни) ізолятів являють собою набори

смуг, що світяться, відповідно отриманим в результаті рестрикції фрагментам ДНК. Пульс-електрофорез визнаний «золотим стандартом» у типуванні багатьох мікроорганізмів, він має високу роздільну здатність. Однак тривалість методики, трудомісткість та необхідність наявності дорогого лабораторного обладнання та реактивів обмежують використання пульс-електрофорезу при розслідуванні спалахів інфекційних захворювань.

Відомо, що госпітальні штами в ході циркуляції в стаціонарах схильні до генетичних змін, всередині домінуючого клону відбувається формування підтипів. Так, наприклад, штами метицилінорезистентних *S.aureus* (MRSA), що зберігають свій патерн PFGE-типування при численних пересіваннях *in vitro*, при циркуляції в умовах стаціонару генерують безліч підтипів, пов'язаних з домінуючим PFGE-типом. Можливо, цей феномен пов'язаний з придбанням великих мобільних генетичних елементів, таких як транспозони. У зв'язку з цим встановлення епідеміологічних зв'язків та віднесення тестованих ізолятів мікроорганізмів до одного штаму (клональної лінії) на підставі молекулярно-генетичного типування має включати філогенетичний аналіз (кількісна оцінка ступеня генетичної спорідненості між ізолятами). Філогенетичний аналіз заснований на оцінці еволюційних дистанцій – кількості генетичних змін у порівнюваних ізолятів (наприклад, кількості нуклеотидних замінів у молекулі ДНК або РНК). Чим менші еволюційні дистанції між порівнюваними ізолятами, тим більше вони споріднені один до одного і тим ймовірніше віднесення їх до одного штаму. Ступінь філогенетичної спорідненості між штамми мікроорганізмів може відображатися графічно у вигляді дендрограми (філогенетичного дерева). Існує низка комп'ютерних програм, що дозволяють побудувати філогенетичні дерева на підставі даних генетичного типування.

Методи, засновані на секвенуванні (мультилокусне або однолокусне секвенування-типування) та електрофорез у пульсуючому електричному полі мають високу роздільну здатність та високу міжлабораторну відтворюваність результатів. Ці методи можуть застосовуватися з метою оцінки циркуляції міжнародних епідемічних клонів мікроорганізмів, стеження за перебігом еволюції тих чи інших генетичних ліній збудників, а в сумнівних випадках – як референтні методи.

Сучасні методи генотипування (особливо ті, що засновані на секвенуванні) дозволяють отримати результати в короткий термін, причому результати можна порівняти з міжнародними базами даних. Молекулярно-генетична характеристика штамів з використанням комплексного підходу, що включає як фенотипічні, так і генетичні методи, дозволяє проводити молекулярно-епідеміологічний моніторинг у системі епідеміологічного нагляду за збудниками інфекційних захворювань.

Видаючи висновок про результати проведених досліджень, лабораторія надає короткий опис використовуваної методики генотипування із зазначе-

нням обладнання та програмного забезпечення, а при використанні методу прямого секвенування – також розмірів і розташування аналізованих ділянок геному.

Нині для спостереження за поширенням міжнародних епідемічних клонів збудників активно застосовуються бази даних, що базуються на використанні методу мультилокусного секвенування – типування (MLST). Ці бази даних дозволяють зіставляти отримані дослідником результати MLST типування з наявними в них даними. Є можливість вибору даних з географії штамів, що зазнали типування, за типом клінічних проявів (наприклад, інвазивні ізоляти), за типом епідеміологічних проявів (наприклад, можна вибрати спорадичні або епідемічні штами). Крім того, можна побудувати за допомогою алгоритму eBURST дендрограму, що відображає філогенетичні взаємини штамів, вибраних за заданим критерієм.

Повногеномне секвенування дозволяє отримати найбільш повну інформацію про генетичні особливості штамів, що вивчаються, включаючи наявність окремих генів і мобільних генетичних елементів, які визначають патогенний потенціал досліджуваного штаму. Методи повногеномного секвенування можуть бути використані при вивченні молекулярної епідеміології госпітальних штамів для верифікації філогенетичних зв'язків між епідемічними штамми, що циркулюють у різних географічних регіонах. Проводять порівняння геномів епідемічних штамів, ідентифікованих у різних географічних регіонах та виявляють кластери, на підставі яких судять про ступінь генетичної спорідненості штамів, що циркулюють на різних територіях [8].

Ідентифікація міжнародних епідемічних клонів збудників здійснюється на підставі зіставлення даних молекулярно-генетичного типування, проведеного в референс-лабораторії з даними, представленими в міжнародних електронних базах даних генотипів мікроорганізмів.

Також, методи молекулярно-генетичного типування мікроорганізмів дають можливість виявити занесення (або завезення) збудника в популяцію ззовні або спонтанний генетичний дрейф збудника, що означає можливість виявлення процесів формування госпітальних штамів та їхнього епідемічного поширення за межі стаціонару [9].

Висновки. Молекулярно-генетичні методи зробили революцію в лабораторній діагностиці завдяки високому рівню специфічності і чутливості. Популяризація напряму молекулярно-генетичних досліджень, розкриття перспектив їх раціонального застосування є елементом вдосконалення системи підготовки профільних спеціалістів.

Література:

1. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus / M. Shen, Y. Zhou, J. Ye et al. // Journal of Pharmaceutical Analysis. – 2020. – N 2. – Vol. 10. – P. 97–101.
2. Nucleic acid sequence based amplification (NASBA)-prospects and applications / M. D. Fakruddin, R. M. Mazumdar, A. Chowdhury, K. S. Bin Mannan // International Journal of Life science and Pharma Research. 2012. – N 1, Vol. 2. – P. 106–121.

3. The use of next generation sequencing in the diagnosis and typing of respiratory infections / F. Thorburn, S. Bennett, S. Modha, et al. // Journal of Clinical Virology. – 2015. – Vol. 69. – P. 96–100.
4. Souf S. Recent advances in diagnostic testing for viral infections / S. Souf // Bioscience Horizons. – 2016. – Vol. 9. – P. 1–11.
5. Schadt E.E. A window into third-generation sequencing / Schadt E.E., Turner S., Kasarskis A. // Human Mol. Genet. – 2010. – Vol. 19. – P. 227–240.
6. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology / van Belkum A., Struelens M., de Alphen L. et al. // Clin Microbiol Rev. – 2001. – N 14(3). – P. 547–560.
7. Tenover F.C. Multiple locus variable number tandem repeat assay analysis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains / F.C. Tenover, R.R.Vaughn, L.K. McDougal // J Clin Microbiol. – 2007. – N. 45(7). – P. 2215–2219.
8. Stone C. B. Molecular detection of bacterial and viral pathogens – Where do we go from here? / C. B. Stone, J. B. Mahony // Clinical Microbiology: Open Access. – 2014. – N 6. – Vol. 3. – P. 175.
9. Molecular and immunological diagnostic techniques of medical viruses / Reta D. H., Tessema T. S., Ashenef A. S. et al. // International Journal of Microbiology. – 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8832728>

References:

1. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus / M. Shen, Y. Zhou, J. Ye et al. // Journal of Pharmaceutical Analysis. – 2020. – N 2. – Vol. 10. – P. 97–101.
2. Nucleic acid sequence based amplification (NASBA)-prospects and applications / M. D. Fakruddin, R. M. Mazumdar, A. Chowdhury, K. S. Bin Mannan // International Journal of Life science and Pharma Research. 2012. – N 1, Vol. 2. – P. 106–121.
3. The use of next generation sequencing in the diagnosis and typing of respiratory infections / F. Thorburn, S. Bennett, S. Modha, et al. // Journal of Clinical Virology. – 2015. – Vol. 69. – P. 96–100.
4. Souf S. Recent advances in diagnostic testing for viral infections / S. Souf // Bioscience Horizons. – 2016. – Vol. 9. – P. 1–11.
5. Schadt E.E. A window into third-generation sequencing / Schadt E.E., Turner S., Kasarskis A. // Human Mol. Genet. – 2010. – Vol. 19. – P. 227–240.
6. Role of genomic typing in taxonomy, evolutionary genetics, and microbial epidemiology / van Belkum A., Struelens M., de Alphen L. et al. // Clin Microbiol Rev. – 2001. – N 14(3). – P. 547–560.
7. Tenover F.C. Multiple locus variable number tandem repeat assay analysis of methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains / F.C. Tenover, R.R.Vaughn, L.K. McDougal // J Clin Microbiol. – 2007. – N. 45(7). – P. 2215–2219.
8. Stone C. B. Molecular detection of bacterial and viral pathogens – Where do we go from here? / C. B. Stone, J. B. Mahony // Clinical Microbiology: Open Access. – 2014. – N 6. – Vol. 3. – P. 175.
9. Molecular and immunological diagnostic techniques of medical viruses / Reta D. H., Tessema T. S., Ashenef A. S. et al. // International Journal of Microbiology. – 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8832728>