

РАЗРАБОТКА И ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДИКИ НА ОСНОВЕ ПЕТЛЕВОЙ ИЗОТЕРМИЧЕСКОЙ АМПЛИФИКАЦИИ (LAMP) ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ КАМПИЛОБАКТЕРИОЗА

© А.К. Шуряева, Т.В. Малова, А.А. Толоконцева, С.А. Карсека, Е.Е. Давыдова, Г.А. Шипулин

Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью,
Москва, Российская Федерация

Обоснование. Среди бактерий представители *Campylobacter spp.* часто становятся причиной гастроэнтеритов. Для их выявления активно используются различные диагностические методы, в том числе метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), однако для получения результатов требуется не менее 5–6 ч. Разработка быстрых молекулярных диагностических тестов на основе петлевой изотермической амплификации позволит существенно упростить процедуру и сократить время исследования, приблизив их к формату «у постели больного». **Цель исследования** — разработка методики, основанной на петлевой изотермической амплификации (LAMP) с детектирующим флуоресцентным зондом, для диагностики кампилобактериоза. **Методы.** Предварительную пробоподготовку клинических образцов фекалий проводили согласно методическим рекомендациям ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора. Экстрагировали ДНК с помощью набора «АмплиТест РИБО-преп» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Присутствие *Campylobacter spp.* подтверждали методом ПЦР с флуоресцентной детекцией в режиме реального времени с использованием набора «АмплиСенс® ОКИ-скрин-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия). В качестве гена-мишени для выбора LAMP-праймеров использовали ген 16S рРНК. Аналитическую специфичность проверяли на культурах бактерий; аналитическую чувствительность оценивали с помощью рекомбинантной плазмиды, содержащей целевой фрагмент последовательности ДНК кампилобактерий. Изотермическую амплификацию проводили при температуре 65°C в течение 30 мин. **Результаты.** Разработана методика для выявления *Campylobacter spp.* на основе петлевой изотермической амплификации, где время реакции не превышает 30 мин. Аналитическая чувствительность разработанной методики сравнима с показателями ПЦР и равна 10³ ГЭ/мл; аналитическая специфичность составляет 100%. Исследование 127 клинических образцов, предварительно охарактеризованных коммерческим набором «АмплиСенс® ОКИ-скрин-FL», показало высокую диагностическую специфичность и чувствительность разработанной LAMP-методики. Ложноположительных результатов не выявлено, 108 образцов оказались отрицательными по результатам LAMP и ПЦР. ДНК *Campylobacter spp.* была обнаружена методом LAMP в 18 образцах из 19 положительных по результатам ПЦР. Один дискордантный образец, отрицательный по результатам LAMP, может быть объяснен низкой бактериальной нагрузкой *Campylobacter spp.* для данного образца. **Заключение.** Разработана методика быстрого выявления *Campylobacter spp.* на основе изотермической амплификации, и экспериментально показаны ее высокие аналитические и диагностические характеристики.

Ключевые слова: острые кишечные инфекции; ОКИ; быстрые тесты; молекулярная диагностика; петлевая изотермическая амплификация; LAMP; *Campylobacter spp.*

Для цитирования: Шуряева А.К., Малова Т.В., Толоконцева А.А., Карсека С.А., Давыдова Е.Е., Шипулин Г.А. Разработка и применение методики на основе петлевой изотермической амплификации (LAMP) для диагностики кампилобактериоза. *Клиническая практика*. 2021;12(3):30–35. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract78139>

Поступила 16.08.2021

Принята 20.08.2021

Опубликована 02.09.2021

ОБОСНОВАНИЕ

Среди бактерий представители *Campylobacter spp.* наиболее часто становятся причиной гастроэнтеритов в мире [1]. В России, по данным Роспот-

ребнадзора, заболеваемость кампилобактериозом имеет тенденцию умеренного роста: в 2020 году на территории РФ зарегистрировано более 2000 случаев (1,4 на 100 тыс. населения) [2].

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF A LOOP-MEDIATED ISOTHERMAL AMPLIFICATION ASSAY (LAMP) FOR THE DIAGNOSIS OF CAMPYLOBACTERIOSIS

© A.K. Shuryaeva, T.V. Malova, A.A. Tolokonceva, S.A. Karseka, E.E. Davydova, G.A. Shipulin

Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russian Federation

Background: Different species of *Campylobacter* are the most common cause of bacterial gastroenteritis. There are many methods to detect the presence of *Campylobacter*, including PCR, but it takes no less than 5–6 hours. Development of fast molecular diagnostic tests based on a loop-mediated amplification assay will allow simplifying the procedure and reducing the time of detection for a bedside application.

Aims: To develop a loop-mediated isothermal amplification assay (LAMP) with a fluorescent probe for the diagnosis of campylobacteriosis. **Methods:** Stool suspensions were prepared and bacterial fractions were separated as described in the methodological recommendations of the Central Research Institute of Epidemiology. DNA was extracted using AmpliTest RIBO-prep (FSBI SPC FMBA, Russian Federation) according to the manufacturer's instruction and detected with AmpliSens® OKI-screen-FL (FBIS CRIE, Russian Federation). Primers and probes were selected in a 16S rDNA gene region. Analytical specificity was confirmed on bacterial cultures, analytical sensitivity was assessed using a recombinant plasmid containing the target *Campylobacter* DNA sequence fragment. LAMP amplification was performed at 65°C for 30 min. **Results:** An assay for the detection of *Campylobacter* spp. based on loop-mediated isothermal amplification has been developed, the reaction time does not exceed 30 minutes. The analytical sensitivity of the developed technique is comparable to the real-time PCR and is equal to 103 copies/ml, the analytical specificity is 100%. The evaluation of 127 clinical samples, previously characterized by a commercial kit, AmpliSens® OKI-screen-FL (FBIS CRIE, Russian Federation), showed high diagnostic specificity and sensitivity of the developed LAMP-method. No false positive results were found, 108 samples were negative by LAMP and PCR. *Campylobacter* spp. DNA was detected by the LAMP method in 18 out of 19 PCR-positive samples. One discordant LAMP negative sample can be attributed to the low bacterial load of *Campylobacter* spp. for a given sample. **Conclusions:** A method for the rapid detection of *Campylobacter* spp. loop-mediated isothermal amplification has been developed, and its high analytical and diagnostic characteristics have been shown experimentally.

Keywords: gastrointestinal infections; molecular diagnostics; rapid diagnostics; Loop-Mediated Isothermal Amplification; LAMP; *Campylobacter* spp.

For citation: Shuryaeva AK, Malova TV, Tolokonceva AA, Karseka SA, Davydova EE, Shipulin GA. Development and Evaluation of a Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay (LAMP) for the Diagnosis of Campylobacteriosis. *Journal of Clinical Practice*. 2021;12(3):30–35. doi: <https://doi.org/10.17816/clinpract78139>

Submitted 16.08.2021

Revised 20.08.2021

Published 02.09.2021

Своевременная диагностика кишечных инфекций необходима для назначения эффективного лечения. Методы молекулярной диагностики, в частности метод полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяют решить эту проблему. Однако необходимость приобретения дорогостоящего оборудования существенно ограничивает возможность применения молекулярных методов в условиях ограниченных ресурсов. Использование методик на основе изотермической амплификации не требует наличия амплификаторов, так как реакцию можно проводить при постоянной температуре в термостате, что также сокращает время исследования в 2–3 раза [3].

Метод изотермической петлевой амплификации (loop mediated isothermal amplification, LAMP) успешно применяется для выявления широкого круга возбудителей инфекционных болезней. Для детекции можно использовать как визуальные методы (по изменению мутности или цвета раствора), так и метод детекции флуоресценции с использованием гибридационных зондов по аналогии с ПЦР в реальном времени [4].

Цель исследования — разработка методики, основанной на петлевой изотермической амплификации (LAMP) с детектирующим флуоресцентным зондом для диагностики кампилобактериоза.

МЕТОДЫ

Клинические образцы и их пробоподготовка

Для сравнения разработанной методики на основе петлевой изотермической амплификации и диагностического ПЦР-набора «АмплиСенс® ОКИ-скрин-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) случайным образом были отобраны образцы фекалий детей с симптомами острых кишечных инфекций (ОКИ) из Детской городской клинической больницы № 9 имени Г.Н. Сперанского (Москва, Россия).

Для приготовления осветленного экстракта ресуспендировали 0,1 г (0,1 мл) фекалий в 0,8 мл фосфатно-солевого буфера (VWR International, LLC, США). Гомогенную суспензию центрифугировали при 10 000 г на центрифуге MiniSpin (Eppendorf, Германия) в течение 5 мин для удаления крупных твердых частиц и затем отбирали верхнюю бело-желтую часть осадка. Осветленный экстракт хранили при -70°C до испытания.

Экстракция ДНК

Для выделения нуклеинового материала из осветленного экстракта фекалий использовали набор «АмплиТест РИБО-преп» (ФГБУ ЦСП ФМБА, Россия). Экстракция ДНК проводилась в соответствии с инструкцией производителя, в каждый образец добавляли внутренний контрольный образец из набора «АмплиСенс® ОКИ-скрин-FL». Выделенная ДНК хранилась при температуре не выше -70°C до анализа.

Полимеразная цепная реакция

ПЦР с использованием набора «АмплиСенс® ОКИ-скрин-FL» проводили на приборе CFX96 RealTime PCR machines (Bio-Rad, США) в соответствии с инструкцией производителя. Определяли наличие генетического материала *Campylobacter* spp. для всех исследуемых образцов фекалий ($n=127$).

Множественное выравнивание и подбор праймеров для LAMP

Множественное выравнивание последовательностей различных видов *Campylobacter* spp. и ряда близкородственных бактерий (таксоны *Arcobacter*, *Helicobacter* и др.) было сделано в программе MegaX с использованием алгоритма Clustal W.

LAMP-праймеры, нацеленные на ген 16S рПНК, были разработаны с помощью программного обеспечения Primer Explorer V (Fujitsu, Япония), и позволяют амплифицировать фрагмент с 39268-

го по 39581-й нуклеотид относительно последовательности *Campylobacter jejuni* CP077635.1. Длина амплифицируемого фрагмента составляет 313 нуклеотидов.

Для исключения возможных перекрестных реакций на ДНК нецелевых организмов был проведен анализ всех выбранных олигонуклеотидных праймеров с помощью ресурса NCBI BLAST. Полиморфные позиции в областях праймеров, выявленные при множественном BLAST-выравнивании, были учтены вырождением.

Синтез праймеров и зондов с последующей высокоэффективной жидкостной хроматографической очисткой выполнен компанией АО «Гентерра» (Москва, Россия).

LAMP в реальном времени с ассимилирующим зондом

Для детекции LAMP в режиме реального времени использовали ассимилирующий зонд с принципом резонансного переноса энергии флуоресценции (fluorescence resonance energy transfer, FRET) [5].

Анализ LAMP проводили в общем объеме реакционной смеси 25 мкл, содержащей 10 мкл ДНК-пробы; 5х-буфер для LAMP (Гентерра, Россия); 8 ед.а. Bst-полимеразы (Гентерра, Россия); 8 мМ MgSO₄ (New English Biolabs, США); 1,4 мМ смесь дНТФ (Биосан, Россия); FIP и VIP по 1,6 μМ; F3 и B3 по 0,4 μМ; FL 0,5 μМ; BL 0,2 μМ; зонда-праймера BL-prg 0,3 μМ; гасителя BL-Q 0,4 μМ; воду, свободную от нуклеаз, до конечного объема 25 мкл.

Реакцию изотермической амплификации проводили при 65°C в течение 30 мин. Для флуоресцентного детектирования LAMP в реальном времени использовали термоциклер CFX96 RealTime PCR machines (Bio-Rad, США). Детекция специфического сигнала проводилась по каналу для флуорофора FAM.

Получение положительного контрольного образца

Реакционная смесь для получения ПЦР-продукта фрагмента гена 16S рПНК содержала следующие компоненты: 10 мкл ДНК-пробы, выделенной из клинического материала; праймеры B3 и F3 по 0,4 μМ каждого; дНТФ (Биосан, Россия) 0,2 мМ; TaqF полимеразы (Гентерра, Россия) 5 е.а.; трис-НСI-буфер (рН 8,3) с концентрацией трис(оксиметил)аминометана 70 мМ (Sigma-Aldrich, США); магния хлорид 4 мМ (Sigma-Aldrich, США); калия хлорид 80 мМ (Sigma-Aldrich, США); стабилизатор

ферментов 0,2 мг/мл (Гентерра, Россия); вода деионизованная до 25 мкл.

Программа термоциклирования: 95°C в течение 15 мин; 40 циклов: 95°C — 15 сек, 60°C — 30 сек, 72°C — 15 сек. Амплификация проводилась на приборе CFX96 RealTime PCR machines (Bio-Rad, США).

Для клонирования ПЦР-продукта по липким концам T и A был использован плазмидный вектор pAL2-TA (Evrogen, Россия). Последовательность вставки рекомбинантной плазмиды pAL2-Camp была подтверждена секвенированием по Сэнгеру.

Концентрацию плазмидной ДНК pAL2-Camp оценивали с использованием цифровой капельной ПЦР (ddPCR) на системе QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad Laboratories, США). Для постановки использовали смесь ddPCR EvaGreen Supermix (Bio-Rad Laboratories, США) и праймеры F3 и B3 по 0,25 мМ.

Программа термоциклирования: 95°C — 5 мин; 40 циклов: 94°C — 30 сек, 60°C — 60 сек, далее 4°C — 5 мин, 90°C — 5 мин.

Определение чувствительности и специфичности колориметрической LAMP и LAMP в реальном времени с ассимилирующим зондом

Чувствительность LAMP-методик определялась с использованием растворов pAL2-Camp в концентрациях от 5×10^2 ГЭ/мл до 10^6 ГЭ/мл, тестируемых в трех повторах каждый. Пределом детекции считали самую низкую концентрацию положительно-контрольного образца, положительную во всех повторах.

Для проверки специфичности разработанной методики использовали штаммы *Campylobacter jejuni subsp. jejuni*, *Campylobacter fetus*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* из коллекции ФГБУ ЦСП ФМБА; ДНК штаммов *Streptococcus pneumoniae* (№ 131116), *Streptococcus pyogenes* (№ 130001), *Haemophilus influenzae* (№ 151221), *Staphylococcus aureus* (№ 201108), *Klebsiella pneumoniae* (№ 180129) — из Государственной коллекции патогенных микроорганизмов ФГБУ НЦЭСМП Минздрава России, а также ДНК человека. ДНК выделяли с помощью набора «АмплиТест РИБО-преп» (ФГБУ ЦСП ФМБА, Россия).

Статистический анализ данных

Диагностическая эффективность LAMP-теста была рассчитана с помощью интернет-ресурса MEDCALC (https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php) при внесении значений истинных (true

positive, TP) и ложных (false positives, FP) положительных и истинных (true negative, TN) и ложных отрицательных (false negative, FN) результатов.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Мы разработали быстрый и простой в использовании тест для обнаружения *Campylobacter* spp., основанный на петлевой изотермической амплификации с детекцией сигнала в реальном времени с применением ассимилирующего зонда; время реакции — 30 мин. В области гена 16S рРНК генома кампилобактерий выбран консервативный участок, имеющий значимые отличия от последовательностей других бактерий, включая родственные *Helicobacter* и *Arcobacter* семейства *Campylobacteraceae*.

Специфичность системы была подтверждена путем исследования панели ДНК различных видов бактерий, методика продемонстрировала 100% специфичность, перекрестных реакций с другими организмами не выявлено.

Для определения аналитической чувствительности LAMP использовали серийные разведения образца плазмидной ДНК в концентрации от 5×10^2 ГЭ/мл до 10^6 ГЭ/мл. Методика позволяет выявлять до 10^3 ГЭ/мл ДНК *Campylobacter* spp., показывая чувствительность, сравнимую с ПЦР.

Экстрагированная из осветленного экстракта фекалий ДНК была протестирована с помощью ПЦР-набора реагентов «АмплиСенс® ОКИ-скрин-FL». По результатам ПЦР в реальном времени было определено 19 положительных и 108 отрицательных образцов.

Охарактеризованные образцы ДНК из осветленного экстракта фекалий были исследованы с помощью разработанного LAMP-теста. Результаты для 108 отрицательных образцов, не содержащих ДНК *Campylobacter* spp., совпали для обоих методов. Для 9 ПЦР положительных образцов с высокой и средней нагрузкой целевой ДНК (пороговый цикл Ct ПЦР не более 31) не было выявлено расхождений. Для 10 ПЦР положительных образцов с низкой нагрузкой целевой ДНК (пороговый цикл Ct ПЦР более 31) был получен один LAMP отрицательный дискордантный результат. Результаты, полученные при тестировании образцов, приведены в табл. 1.

По результатам анализа были рассчитаны диагностические характеристики разработанной нами методики на основе петлевой изотермической амплификации для выявления ДНК *Campylobacter* spp.: диагностическая чувствительность LAMP с ассимилирующим зондом составила 94,74% (до-

Таблица 1 / Table 1

Результаты, полученные при тестировании клинических образцов методами LAMP и ПЦР /
Results of testing the clinical samples by the LAMP and PCR methods

Результаты «АмплиСенс® ОКИ-скрин-FL» / Results of «AmpliSens OKI-screen-FL»	Результаты разработанной методики на основе LAMP / Results of the developed methodology based on LAMP	
	Число результатов, совпадающих с ПЦР / Number of results matching PCR	Время получения результата, мин / Time to get the result, min
Ct≤31 (9 образцов) / (9 samples)	9 (9)	<18
31<Ct<38 (10 образцов) / (10 samples)	9 (10)	<28
Отрицательные (108 образцов) / Negative (108 samples)	108 (108)	-

верительный интервал при $p=95\%$ 73,97–99,87%), специфичность — 100% (доверительный интервал при $p=95\%$ 96,64–100,00%).

ОБСУЖДЕНИЕ

Детекция сигнала для LAMP с ассимилирующим зондом проводится с помощью специфической комплементарной последовательности зонда, которая позволяет избежать ложных положительных результатов. Время амплификации не превышает 30 мин, что дает возможность увеличить эффективность анализа без изменения приборной базы лаборатории. Аналогичные тесты для выявления ДНК *Campylobacter* spp. на основе LAMP в России в настоящее время не зарегистрированы.

Аналитическая чувствительность разработанной методики сравнима с ПЦР и составила 10^3 ГЭ/мл, была показана 100% аналитическая специфичность. При постановке реакции на 127 клинических образцах фекалий, 19 из которых предварительно были охарактеризованы как содержащие, а 108 — как не содержащие ДНК *Campylobacter* spp., ложноположительных результатов не выявлено. Получен дискордантный результат для одного образца, что, вероятнее всего, связано с низким содержанием ДНК кампилобактерий в нем, так как этот образец имел высокий пороговый цикл Ct при постановке ПЦР.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, были показаны высокие аналитические и диагностические характеристики разработанной методики на основе петлевой изотермической амплификации, при этом время реакции составило до 30 мин, что как минимум в 2–3 раза быстрее, чем при ПЦР. Метод LAMP может быть внедрен в практику для быстрого выявления бактериальных возбудителей кишечных инфекций человека, что было

показано нами на примере выявления ДНК кампилобактерий.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Шуряева А.К., Малова Т.В., Толконцева А.А., Карсека С.А., Давыдова Е.Е. — планирование и контроль экспериментов, обработка данных, написание статьи; Шипулин Г.А. — написание и рецензирование статьи. Авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией).

Author contribution. Shuryaeva A.K., Malova T.V., Tolokontseva A.A., Karseka S.A., Davydova E.E. — planning and control of the experiments, data processing, manuscript writing; Shipulin G.A. — manuscript writing and revision. The authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agreeing to be accountable for all aspects of the work.

Источник финансирования. Исследование выполнено в рамках государственного задания «Разработка экспресс-тестов для диагностики острых кишечных инфекционных заболеваний методом изотермической амплификации».

Funding source. The study was carried out within the framework of the state task “Development of rapid tests for the diagnosis of acute intestinal infectious diseases by the method of isothermal amplification”.

Конфликт интересов. Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. ВОЗ. Кампилобактериоз [электронный ресурс]. [WHO. Campylobacteriosis [electronic resource]. (In Russ.) Режим доступа: <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>. Дата обращения: 12.08.2021.
2. О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2020 году: Государственный доклад. Москва: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2021. [On the state of sanitary and epidemiological welfare of the

population in the Russian Federation in 2020: State report. Moscow: Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Well-being; 2021. (In Russ.)]

3. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*. 2000;28(12):E63. doi: 10.1093/nar/28.12.e63
4. Becherer L, Borst N, Bakheit M, et al. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): review and classification of methods for sequence-specific detection. *Analytical Methods*. 2020;12:717–746. doi: 10.1039/C9AY02246E
5. Yaren O, Alto BW, Gangodkar PV, et al. Point of sampling detection of Zika virus within a multiplexed kit capable of detecting dengue and chikungunya. *BMC Infect Dis*. 2017;17:293. doi: 10.1186/s12879-017-2382-0

ОБ АВТОРАХ

Автор, ответственный за переписку:

Шуряева Анна Константиновна, м.н.с.;
адрес: Российская Федерация, 121552, Москва,
ул. 3-я Черепковская, д. 15А, стр. 54;
е-mail: AShuryaeva@cspmz.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2227-1840>

Соавторы:

Малова Татьяна Владимировна, м.н.с.;
е-mail: TMalova@cspmz.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8546-1444>

Толоконцева Анна Андреевна, биолог;
е-mail: ATolokonцева@cspmz.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8757-081X>

Карсека Софья Антоновна, лаборант;
е-mail: SKarseka@cspmz.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9988-6918>

Давыдова Екатерина Евгеньевна, к.х.н.;
е-mail: EDavydova@cspmz.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2926-0490>

Шипулин Герман Александрович, к.м.н.;
е-mail: shipgerman@gmail.com;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3668-6601>

AUTHORS INFO

The author responsible for the correspondence:

Anna K. Shuryaeva, Junior Research Associate;
address: 15A, building 54, 3rd Cherepkovskaya street,
Moscow, 121552, Russia;
е-mail: AShuryaeva@cspmz.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2227-1840>

Co-authors:

Tatyana V. Malova, Junior Research Associate;
е-mail: TMalova@cspmz.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8546-1444>

Anna A. Tolokonцева, Biologist;
е-mail: ATolokonцева@cspmz.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8757-081X>

Sofia A. Karseka, Laboratory Assistant;
е-mail: SKarseka@cspmz.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9988-6918>

Ekaterina E. Davydova, Cand. Sci. (Chem.);
е-mail: EDavydova@cspmz.ru;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2926-0490>

German A. Shipulin, MD, Cand. Sci. (Med.);
е-mail: shipgerman@gmail.com;
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3668-6601>