

ЦИФРОВАЯ ПЦР: ОБЗОР ПРИМЕНЕНИЯ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ДИАГНОСТИЧЕСКОГО ИНСТРУМЕНТА

© 2023 г. К. В. Копылова^а, Э. В. Каспаров^а, И. В. Марченко^а, М. В. Смольникова^а, *

^аНаучно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, Красноярск, 660022 Россия

*e-mail: smarinv@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.12.2022 г.

После доработки 29.03.2023 г.

Принята к публикации 29.03.2023 г.

Цифровая ПЦР (цПЦР) – метод определения абсолютного количества целевой нуклеиновой кислоты в образце – все шире используется в биологии и медицине. К важным преимуществам цПЦР относится возможность количественного определения генетического материала без построения калибровочных кривых, что позволяет выявлять даже единичные молекулы нуклеиновых кислот. В обзоре рассмотрены основные этапы становления метода цПЦР, начиная с технологии микрофлюидных чипов, до современных систем, способных обнаружить одну молекулу ДНК-мишени среди 100000 копий. Проанализирована эффективность выявления различных патогенов с помощью цПЦР, обобщены результаты исследований, иллюстрирующие инновационность данного метода. Рассмотрены возможности мультиплексного цПЦР-анализа и его использования в клинической практике. Также обсуждается роль цПЦР в развитии неинвазивных методов анализа онкологических заболеваний и вероятные пути развития технологии цПЦР, включая использование в качестве систем “point-of-care”.

Ключевые слова: цифровая ПЦР, инфекция, ДНК, онкология, вирусы, COVID-19

DOI: 10.31857/S0026898423050051, **EDN:** XWWKDS

ВВЕДЕНИЕ

Рост числа инфекционных заболеваний, а также распространенность онкологических заболеваний делают необходимой разработку новых методов, позволяющих быстро и с высокой специфичностью определять источник патологии. В начале 1980-х годов был разработан метод ПЦР, который стал незаменимым инструментом анализа нуклеиновых кислот. Амплификация с электрофоретическим выявлением продуктов, а также анализ по конечной точке со временем усовершенствовались: благодаря появлению метода ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) технология ПЦР стала доступной для лабораторной клинической практики [1–3]. Метод количественной ПЦР используется для обнаружения целевых нуклеиновых кислот в сыворотке крови, спинномозговой жидкости и образцах тканей, а также РНК или ДНК патогенов. Однако данные, полученные с использованием количественной ПЦР в разных лабораториях, могут отличаться вследствие различий в качестве матрицы, тест-систем и условий эксперимента. Кроме того, концентрация патогенов в биологических образцах часто коррелирует с тяжестью заболевания, что делает необходимым поиск более чувствительного метода, обеспечи-

вающего точное количественное определение патогенов в образце.

Проведение клинических исследований с использованием цифровой ПЦР (цПЦР) выявило некоторые преимущества этого метода для постановки правильного диагноза и мониторинга эффективности лечения. Более того, разработан метод мультиплексной цПЦР, который позволяет снизить затраты реагентов, времени, образцов и погрешность пипетирования [4, 5]. Уникальная способность цПЦР точно измерять большое количество целевых нуклеиновых кислот за одну реакцию позволяет преодолеть ограничения, связанные с количеством каналов флуоресцентного детектирования при ПЦР-РВ [6, 7]. цПЦР широко применяется для выявления нуклеиновых кислот вирусов и бактерий, а также для анализа опухолевых клеток, что актуально в связи с текущей эпидемиологической ситуацией.

ЦИФРОВАЯ ПЦР: ПРИНЦИП И ПРЕИМУЩЕСТВА

цПЦР – метод количественного определения нуклеиновых кислот, основанный на разделении общей реакционной смеси на большое количество отдельных, более мелких реакций (микроре-

акций, капель), в каждой из которых происходит амплификация со случайно распределенной молекулой ДНК. В отличие от ПЦР-РВ интенсивность сигналов флуоресценции в цПЦР регистрируется по конечной точке каждой реакции [1], а присутствие ампликонов анализируется в каждой микрореакции [8, 9]. Таким образом, термином “цифровая” обозначают присутствие либо отсутствие анализируемых биологических объектов в каждой микрореакции в дискретном количестве, а результаты анализа представляются в двоичной (бинарной) системе [10]. Важным преимуществом цифрового сигнала является снижение нагрузки на датчики обнаружения флуоресцентного сигнала, т.е. различаются только два типа сигналов – с высокой и с низкой интенсивностью. В основе обработки результатов анализа цПЦР лежит определение разницы между положительными и отрицательными реакциями амплификации, что связано с количеством молекул исследуемой нуклеиновой кислоты в образце [10]. Благодаря применению распределения Пуассона долю положительных реакций можно использовать для расчета количества копий целевого гена без построения стандартной кривой [11, 12], что обеспечивает повышенную точность и согласованность результатов, полученных в разных лабораториях [13, 14].

Важным преимуществом цПЦР перед другими методами количественного определения нуклеиновых кислот является его низкая чувствительность к ингибиторам амплификации, поскольку подсчет числа копий происходит в конечной точке, а не в режиме реального времени [2, 9, 15]. Кроме того, цПЦР способна обнаруживать небольшие количества целевой нуклеиновой кислоты на фоне большого количества других мишеней, поскольку разделение реакционной смеси на капли и амплификация по конечной точке делают этот метод менее чувствительным к конкуренции за реагенты между мишенями [16, 17].

При этом цПЦР имеет ограниченный предел обнаружения целевых молекул в связи с малым объемом пробы на реакцию и амплификацией не во всех ячейках [2, 13]. Данная особенность цПЦР критически важна для количественного определения РНК, поскольку стадия обратной транскрипции может быть неполной для некоторых РНК-мишеней, что приводит к неправильному подсчету числа копий [18]. К другой особенности цПЦР по сравнению с качественной ПЦР относится менее точное количественное определение более крупных ампликонов. Кроме того, результаты количественной детекции целевых мишеней с использованием разных платформ цПЦР и разных наборов реагентов могут различаться [19].

ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПЛАТФОРМЫ цПЦР

Термин цПЦР впервые появился в 1999 г. в статье К.В. Kinzler и В. Vogelstein, которые описали количественное определение мутаций в гене *RAS* путем разделения образца на капли с последующим выполнением серии ПЦР на 384-луночных микропланшетах [20]. Однако сама методика была описана гораздо раньше, ее независимо разрабатывали несколько групп ученых. В 1988 г. ученые из Калифорнии, изучавшие праймер-ферментативную амплификацию ДНК термостабильной ДНК-полимеразой, описали метод амплификации гена β -глобина, разведенного образцом того же генома, но без этого гена. Полученные результаты позволили предположить, что даже одна копия гена β -глобина в образце может быть обнаружена и амплифицирована, а сам метод получил название “ПЦР с предельным разведением” [21]. Этот метод обладал более высокой точностью и способностью к количественному обнаружению редких молекул-мишеней, чем используемые на тот момент методы ПЦР [22]. В 1990 и 1991 г. Р. Simmonds и соавт. упоминали данный метод как способ обнаружения отдельных молекул РНК вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) [23]. В 1992 г. группа австралийских ученых под руководством А. Morley детально описала методику и принципы ПЦР с предельным разведением и утвердила ее использование в качестве количественного метода определения нуклеиновых кислот [24]. В 2003 г. К.В. Kinzler и В. Vogelstein продолжили совершенствование цПЦР и создали улучшенный метод “BEAM” (Beads, Emulsion, Amplification, Magnetism), в котором для разделения реакций вместо водного раствора использовали эмульсию, что позволило масштабировать метод до тысяч реакций за один запуск [20].

Разработка метода количественной ПЦР-РВ привела к приостановке развития технологии цПЦР. В 2007 году интерес к данной методике начал постепенно возвращаться, и уже в 2011 г. компанией “Bio-Rad” была зарегистрирована первая система капельной цПЦР (https://www.bio-rad.com/ru-ru/corporate/newsroom/bio-rad-acquires-quantalife-digital-pcr-technology?ID=Bio-Rad-Acquires-Qua_1521570626). По мере совершенствования метода увеличивалось количество и разнообразие платформ для проведения цПЦР, которые отличаются производительностью, количеством одновременно исследуемых образцов и каналами детекции, но неизменно сохраняют общую концепцию цПЦР. На данный момент лидерами в области создания приборов для проведения цПЦР являются американские компании “Bio-Rad”, “StandardBioTools”, “ThermoFisherScientific” и немецкая компания “QIAGEN”.

Первые приборы для проведения цПЦР базировались на технологии микрофлюидных чипов. В 2008 г. появилась платформа для цПЦР BioMark™ HD американской компании “Fluidigm Corporation” (“StandardBioToolsInc”, США), которая позволяла проводить мультиплексный анализ с использованием четырех мишеней на образце, причем разделение, смешивание и реакции термоциклирования образцов проходили непосредственно на чипе. Продукты амплификации визуализировали с помощью системы BioMark. Подобный механизм работы данной платформы позволял снизить возникновение ошибок за счет увеличения автоматизации процесса [25, 26].

Американской компанией “ThermoFisherScientific” создана технология проведения цПЦР путем совмещения систем OpenArray® и QuantStudio® 12K FlexqPCR, также основанных на микрофлюидной технологии. Эта система позволяла анализировать соотношение мутантных генов в каплях объемом 1 пл. Как на платформе BioMark™ HD, так и в данной системе можно проводить мультиплексный анализ образцов, однако при этом возможно использование только двух каналов детекции [27].

Компания “Bio-Rad” запатентовала технологически новую платформу для проведения ПЦР Bio-Rad QX100™ DropletDigital™, в которой не использовались микрочипы. Отличительная особенность анализа в такой системе заключается в соединении нескольких технологий в одной: технологии эмульгирования капель, классической ПЦР и проточной цитометрии. Высокая пропускная способность QX100™ DropletDigital обеспечивает точность и надежность анализа, высокую эффективность обработки образца (<https://www.bio-rad.com/ru-ru/life-science/digital-pcr/qx100-ddpcr-system>). Учитывая высокую эффективность обнаружения целевых молекул нуклеиновых кислот, эту систему усовершенствовали до платформы QX200, которая состоит из двух приборов – генератора капель и считывателя капель. Генератор капель разбивает каждый образец на большое количество капель, объем каждой из которых равен 1 нл, что позволяет в разы увеличить чувствительность и определить 1 копию мишени среди 100000 копий. Считыватель капель анализирует уровень флуоресценции в каждой капле, подсчитывая количество положительных (содержащих мишень) и отрицательных (пустых) капель [28].

Совершенно новая методика цПЦР-мирофлюидного анализа в нанопланшетах разработана компанией “QIAGEN”. В этой методике используется платформа для проведения цПЦР и набор планшетов с лунками, каждая из которых состоит из множества микролунок (микрореакторов), что позволяет значительно повысить повторяемость получаемых результатов по сравнению с

другими системами (<https://www.qiagen.com/ru/product-categories/discovery-and-translational-research/pcr-qpcr-dpcr/dpcr-assays-kits-and-instruments>) [1, 28]. Для предотвращения загрязнения каждый нанопланшет имеет индивидуальную защитную пленку. В приборе компании “QIAGEN QIAcuity” автоматизированы все этапы обработки планшета, а именно, распределение по микролукам, термоциклирование, визуализация результатов и анализ данных. Прибор считывает флуоресценцию одновременно со всех лунок, что сокращает общее время детекции. Разнообразие планшетов (26K 24-well; 8,5K 24-well и 96-well) позволяет проводить различные эксперименты – от анализа экспрессии генов до исследования жидкой биопсии с разным количеством образцов (<https://www.qiagen.com/ru/product-categories/discovery-and-translational-research/pcr-qpcr-dpcr/dpcr-assays-kits-and-instruments>) [28].

Китайской компанией “RainSure Scientific” представлена новая система анализа DropDx-2044HT, состоящая из станции подготовки образцов SG-2000 и картриджного сканера. В основе работы данной системы лежит микрофлюидная технология. Автоматическая регуляция давления и микрофлюидный картридж позволяют быстро и плавно получать однородные капли микроэмульсии (20–30 тыс. за 70 с), а высокая скорость нагрева и охлаждения – осуществлять все циклы амплификации за 45 мин. Показана возможность цифровой системы ПЦР для мультиплексного обнаружения целей, многоканального сбора сигналов флуоресценции за счет наличия в картриджном сканере пяти каналов детекции флуоресценции (<https://www.rainsureglobal.com/Sample-Prep-Station-pd42245300.html>).

В табл. 1 приведены характеристики пяти представленных сегодня на рынке технологических платформ для проведения цПЦР. Анализ доступных источников показывает, что системы различаются по типу, количественным показателям объема реакционной смеси, генерируемых капель, анализируемых образцов и т.д. В целом, в производстве таких систем наблюдаются тенденции к увеличению количества капель и уменьшению времени термоциклирования [12].

В настоящее время наблюдается тенденция к миниатюризации приборов, которая заключается в стремлении превратить существующее оборудование в более компактные системы “point-of-care” (РОС). Строение типичной платформы для цПЦР включает объемные детали для распределения образца по лункам, термоциклирования и анализа данных, некоторые системы дополнительно содержат генератор капель для обеспечения высокопроизводительного количественного определения целевых нуклеиновых кислот. Тем не менее, технологии стремительно развиваются и в будущем мы сможем использовать цПЦР для

Таблица 1. Сравнительная характеристика технологических платформ для проведения цПЦР

| Прибор | BioMark™HD | QuantStudio 3D FlexqPCR | Bio-Rad QX200 | QIAcuity One | DropDX-2044HT |
|---|---|--|--------------------|-------------------|-----------------------|
| Компания | “Fluidigm” | “Life Technologies”, “Thermo Fisher Scientific” | “Bio-Rad” | “QIAGEN” | “RainSure Scientific” |
| Страна-производитель | США | США | США | Германия | Китай |
| Тип технологической платформы | Микрочип | Микрочип | Нанолитровые капли | Нанопластина | Нанолитровые капли |
| Количество капель на реакцию | 2 04–36960 | 20000 | ≤20000 | 8000/26000 | ≤30000 |
| Объем реакционной смеси, мкл | 25–50 | 20 | 20 | 12/40 | 20 |
| Режим детекции нуклеиновых кислот | В режиме реального времени, по конечной точке | По конечной точке | По конечной точке | По конечной точке | По конечной точке |
| Продолжительность термоденатурации ПЦР, мин | 120–180 | 120 | 300 | 120 | 90 |
| Число каналов обнаружения сигнала | 4 | 2 | 2 | 2/5 | 3/4/5 |
| Чувствительность, % | 0.05 | - | 0.001 | 0.01 | 0.01 |
| Погрешность количественного определения, % | ±10 | ±10 | ±10 | ±10 | ±10 |
| Количество анализируемых образцов на один запуск прибора, шт. | 48/ 96/192 | 24 | 96 | 24/96 | 8/16/32 |

применения в системах РОС. Уже описаны примеры эффективных миниатюрных систем для ПЦР-РВ [29]. Развитие технологий Lab-On-Chip способствует реализации этапов молекулярного тестирования (лизис образца, очистка нуклеиновой кислоты, обратная транскрипция РНК (если необходима), амплификация целевой области ДНК и оптическое измерение ее продуктов) на значительном уровне миниатюризации. Например, на основе метода ПЦР-РВ разработано миниатюрное устройство для обнаружения гена гемагглютинина вируса гриппа А/Н1N1, проводящее количественный экспресс-анализ (30 циклов за 15 мин) с высокой чувствительностью и специфичностью [29].

Разработана система “Pathogen Analyzer” для детекции патогенов, сочетающая технологию ПЦР и тестирование антигенов. Принцип работы этой системы частично напоминает работу цПЦР-системы. Тестовый чип содержит капли гидрогеля, каждая из которых представляет собой “биосенсор”. Для экспресс-тестирования, например, на наличие в организме коронавируса SARS-CoV-2, мазок из носоглотки переносят в буферный раствор, а затем наносят на чип. Тестовый чип нагревается, таким образом проходят этапы стандартной ПЦР, но при постоянной температуре (62°C). Каждый биосенсор, как отдельный тест, содержит молекулы, длина волны излучения которых меняется при присоединении к ним целевого патогена. Анализатор определяет количество генетического материала возбудителя и отправляет окончательный результат в специально разработанное приложение для смартфона (<https://www.news-medical.net/news/20221102/New-Pathogen-Analyzer-combines-the-advantages-of-PCR-and-rapid-antigen-testing.aspx>). Это один из ярких примеров миниатюризации прибора для определенной технологии.

МУЛЬТИПЛЕКСНАЯ цПЦР

Мультиплексный анализ имеет ряд преимуществ перед стандартным моноплексным анализом, в число которых входят снижение стоимости реагентов, расхода образца и времени обработки, а также погрешности дозаторов и пипетирования [30]. Мультиплексирование стало возможным и для цПЦР, при этом появляется уникальная возможность точно измерять несколько мишеней за одну реакцию [4].

В зависимости от платформы проведения цПЦР существует возможность определения целевых мишеней, используя от двух до пяти каналов. В присутствии более одного зонда в реакционной смеси маркировка зондов осуществляется разными красителями [6]. При этом даже при наличии только двух каналов существует возможность обнаружения нескольких мишеней за счет

амплитудного “мультиплексирования” – внесение зондов с одинаковым флуорофором в разных концентрациях для каждой мишени. В 2021 году была показана возможность типирования и определения происхождения вируса сезонного гриппа с помощью мультиплексной цПЦР [5].

В клинической практике мультиплексная цПЦР нашла применение в типировании вируса сезонного гриппа и диагностике острого респираторного синдрома, вызванного SARS-CoV-2 [4]. В 2022 г. группой китайских ученых под руководством Xunhua Zhu разработан протокол мультиплексной цПЦР для определения четырех возбудителей вирусных инфекций центральной нервной системы – энтеровируса, парэховируса и двух типов герпесвируса – в ликворе. Мультиплексирование проводили за счет амплитудного разведения зондов для двух каналов детекции. Результаты исследования подтвердили высокую чувствительность такого анализа, использование которого позволило дискриминировать потенциально опасных возбудителей вирусных инфекций центральной нервной системы [4].

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БАКТЕРИЙ, ВИРУСОВ И ПАРАЗИТОВ С ПОМОЩЬЮ цПЦР

Инфекционные заболевания занимают одну из ведущих позиций среди причин смертности на каждом континенте. Патогенные микроорганизмы, включая бактерии, грибы, вирусы и другие, нарушают структуру тканей, что приводит к развитию воспаления в организме хозяина.

Всемирная организация здравоохранения ежегодно сообщает о росте числа новых инфекционных заболеваний во всем мире и увеличении смертности от них, особенно в странах со средним и низким уровнем жизни. Эта тенденция обусловлена увеличением количества возбудителей, обладающих лекарственной устойчивостью (<https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>). Кроме того, высокая контактируемость вирусов, ответственных за возникновение таких современных эпидемий, как например, коронавирусная болезнь 2019 г. (COVID-19), болезни Эбола и Зика, птичий грипп H5N1, усугубляет проблемы общественного здравоохранения, поскольку приводит к огромным человеческим и финансовым потерям [31]. Поэтому именно в медицинской вирусологии цПЦР активно используется как инструмент количественного определения вирусных нуклеиновых кислот.

Благодаря цПЦР появилась возможность детектирования вирусов гепатитов, Т-клеточного лимфотропного вируса типа 1, что не удавалось сделать раньше из-за недостаточного количества материала вируса, служащего положительным контролем [32, 33]. цПЦР широко применяется

для идентификации “наследственного” интегрированного в хромосомы герпесвируса человека типа 6 (ісіННV-6). Для этого рассчитывают точное соотношение вирусных и человеческих геномов в точечной ДНК.

Для выявления и мониторинга первичных инфекций кровотока разработан протокол цПЦР, который позволяет с высокой степенью чувствительности, специфичности и в течение короткого промежутка времени обнаружить ДНК патогена [34]. Так, показана возможность с помощью цПЦР детектировать видоспецифичные гены золотистого стафилококка *Staphylococcus aureus* (*nuc*), *Streptococcus pneumoniae* (*lytA*) и *Escherichia coli* (*uidA*) [9]. В качестве примера можно сравнить результаты обнаружения штаммов *E. coli*, продуцирующих шига-токсин, с помощью официально валидированных методик с результатами, полученными методом цПЦР. Показано, что при сходстве получаемых результатов проведение цПЦР требует меньше времени [35]. Благодаря возможности одновременной идентификации возбудителей нескольких инфекций и динамического мониторинга изменений концентрации патогенных микроорганизмов в крови, цПЦР можно использовать для оценки эффективности лекарственной терапии и прогноза выживаемости пациентов [36–38].

Малярия, вызываемая малярийным плазмодием, представляет серьезную проблему для стран, эндемичных по этому заболеванию [39]. Низкая чувствительность микроскопического метода подсчета паразитов в капле крови приводит к тому, что в некоторых эндемичных по малярии регионах от 50 до 80% населения являются бессимптомными носителями инфекции. В настоящий момент малярию диагностируют с использованием метода ПЦР-РВ, для которого требуются калибраторы с известной концентрацией патогена и четкая кривая флуоресценции при оценке результата анализа, что усложняет процесс идентификации данных [40]. Сравнение результатов количественного определения возбудителей малярии в крови методами цПЦР и ПЦР-РВ показало, что цПЦР обеспечивает гораздо более высокую повторяемость результатов, чем ПЦР-РВ. Так, количество копий ДНК в дубликатах образцов, измеренное с помощью цПЦР, различалось в 1.5 раза, что значительно меньше, чем в случае ПЦР-РВ, где отличие составило 2.5–6 раз [41].

На сегодняшний день цПЦР активно используется для количественной оценки вирусной нагрузки SARS-CoV-2, определения инфекционности и мониторинга течения заболевания, что крайне важно для эпидемиологического надзора [42]. Эталонным методом выявления SARS-CoV-2 в настоящее время считается метод количественной ПЦР с обратной транскрипцией, однако у

этого метода существует ряд ограничений, в том числе наличие ложноотрицательных результатов [43, 44], что способствует развитию новых методов определения генетических особенностей штаммов данного патогена. Ложноотрицательные результаты ПЦР-тестов могут быть обусловлены мутациями в областях, которые служат мишенями, минимальным количеством вирусного материала в образце или влиянием ингибиторов амплификации [45]. цПЦР способна эффективно решить эту проблему, поскольку позволяет обнаружить вирусную РНК даже при низком количестве ее копий, в то время как выявить РНК вируса в таких образцах с помощью ПЦР-РВ не удастся. Так показано, что цПЦР обладает более низким пределом обнаружения (limit of detection, LOD) РНК SARS-CoV-2, чем ПЦР-РВ [46, 47].

Согласно Cassinari и соавт., цПЦР позволяет с большей чувствительностью оценить вирусную нагрузку, чем количественная ПЦР-РВ. Так, эффективность обнаружения вирусной нуклеиновой кислоты методом ПЦР-РВ составила 62% против 85% в случае цПЦР [42, 45]. Кроме того, цПЦР, как метод определения вирусной нагрузки, позволяет прогнозировать ответ пациентов с диагностированным SARS-CoV-2 на лечение, что крайне важно для подбора индивидуальной схемы терапии [48].

ДИАГНОСТИКА ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ цПЦР

цПЦР, применяемую с целью молекулярно-генетической диагностики ряда заболеваний, можно использовать для подбора схемы индивидуальной таргетной терапии. Диагностику онкологических заболеваний на ранних стадиях затрудняет отсутствие видимых клинических проявлений, поэтому большой интерес имеет поиск и обнаружение специфических биомаркеров как диагностических, так и прогностических [49–51]. Перспективным направлением поиска онкомаркеров считается изучение внеклеточной ДНК, присутствующей в биологических жидкостях, поскольку доступ ко многим новообразованиям ограничен и невозможно получить образец опухолевой ткани неинвазивным способом.

Определить стадию развития некоторых опухолей можно с помощью анализа нуклеиновых кислот, циркулирующих в плазме или сыворотке крови. К свободно циркулирующим нуклеиновым кислотам относятся геномная ДНК, мтДНК, вирусные ДНК и РНК, мРНК, а также микроРНК [49, 52, 53], которые попадают в кровь в результате некротических и апоптотических изменений ткани. Для анализа внеклеточной ДНК на ранних стадиях развития злокачественных опухолей, когда ее концентрация в крови крайне

Таблица 2. Чувствительность детекции онкомаркеров с помощью различных методов

| Ген | Функциональные особенности гена | Вид новообразования | Маркер | Метод обнаружения | | | Источник |
|--------------|--|---------------------|-----------------------|--------------------|------------|-----------|----------|
| | | | | количественная ПЦР | ИФА | цПЦР | |
| <i>BRCA1</i> | Опухолевый супрессор | Рак молочной железы | Делеция | 50 нг/мл | – | 10 нг/мкг | [61, 62] |
| <i>BRCA2</i> | | | Изменение числа копий | 57 мкг/мл | – | 20 нг/мкл | [63] |
| <i>HER2</i> | Рецептор эпидермального фактора роста типа 2 | | | | | | |
| <i>ALK</i> | Киназа анапластической лимфомы | Рак легкого | Уровень экспрессии | – | 200 нг/мкл | 10 нг/мкл | [64] |

низка, необходимы высокочувствительные методы. К таким методам относится цПЦР, позволяющая обнаруживать мутации в небольших количествах биологического материала.

На сегодняшний день в качестве онкомаркера рака предстательной железы используется уровень сывороточного простатспецифического антигена (prostate specific antigen, PSA). Потенциальным биомаркером рака предстательной железы может служить длинная некодирующая РНК MYU, способствующая пролиферации и миграции клеток предстательной железы [54]. Кроме этого, распространенным событием при метастатическом резистентном к кастрации раке предстательной железы является амплификация локуса андрогенного рецептора (AR). Показана возможность высокоточного определения числа копий гена *AR* во внеклеточной ДНК с использованием мультиплексной цПЦР [55].

Еще один пример – использование цПЦР для выявления мутаций в генах, ответственных за развитие рака молочной железы. Прогностическим фактором при данном заболевании служит герминальная мутация гена *BRCA15382insC* [56, 57], не выявляемая с помощью обратной транскрипции с последующей ПЦР-РВ. Описан случай, когда обнаружение делеции гена *BRCA1* методом цПЦР позволило назначить адекватное лечение, которое привело к полной морфологической регрессии опухоли [58]. Кроме того, цПЦР применяется для идентификации циркулирующих в крови клеток рака шейки матки [59, 60].

В табл. 2 представлены результаты сравнения чувствительности детекции некоторых онкомаркеров с помощью количественной ПЦР и цПЦР. Показано, что предел обнаружения при использовании цПЦР в несколько раз ниже, чем у количественной ПЦР.

Важно отметить, что присутствие внеклеточной ДНК в биологических жидкостях человека не всегда свидетельствует о развитии опухоли. Так, после трансплантации органов в организме реци-

пиента циркулирует внеклеточная донорная ДНК, что можно использовать для мониторинга маркеров отторжения трансплантата с помощью цПЦР [65].

Внеклеточная ДНК в жидкостях организма имеет неочевидное значение также для диагностики нейроопухолей [66, 67]. Глиомы – первичные опухоли, происходящие из паренхимы головного мозга, в зависимости от типа клеток делятся на астроцитомы, олигодендроглиомы и эпендимомы. Важную роль в диагностике и выборе стратегии лечения глиом играет определение степени злокачественности опухоли. Глиомы низкой степени злокачественности возникают вследствие мутации в гене *BRAF*, который кодирует киназу, отвечающую за формирование внутриклеточных сигналов, направленных на рост клетки [68]. Высокая степень злокачественности глиом обусловлена мутацией K27 в гене *H3F3A*, кодирующего гистон H3 [69]. Разработан протокол обнаружения мутации K27M гена *H3* в спинномозговой жидкости с использованием цПЦР [70]. Этот протокол оптимизирован для обнаружения внеклеточной ДНК в образцах ликвора путем введения процедуры предварительной амплификации целевой области гена *H3* и оптимизации условий проведения цПЦР. Примечательно, что данный протокол прошел апробацию на двух технологически разных платформах цПЦР: QX200 Droplet (“Bio-Rad”) и QIAcuity (“QIAGEN”); эффективность обнаружения статуса глиомы при этом была сопоставимой. В трех из четырех образцов ликвора, взятых у пациентов с K27M-положительным статусом диффузной глиомы, обе платформы позволили обнаружить мутантный аллель.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

цПЦР – это усовершенствованный метод традиционной ПЦР-РВ, позволяющий осуществлять прямой подсчет числа молекул нуклеиновых кислот. цПЦР активно используется для опреде-

ления вариации числа копий генов в генно-модифицированных организмах, при кариотипировании, на различных моделях заболеваний человека, при определении экспрессии генов, а также при осуществлении эпигенетического контроля [9, 71].

Современная технология определения нуклеиновых кислот – цПЦР – наряду с классической ПЦР и ПЦР-РВ уже занимает свою нишу в области молекулярной диагностики. За счет определения единичных целевых молекул при их низкой концентрации в образце и способности обнаружения редких вариантов мишени, обладающей низкоэффективной амплификацией, цПЦР существенно расширяет возможности для научных и клинических исследований, что крайне важно в свете вновь появляющихся патогенов и связанных с этим тяжелых заболеваний.

Авторы выражают искреннюю благодарность Красноярскому региональному центру коллективного пользования ФИЦ КНЦ СО РАН (Krasnoyarsk Regional Center of Research Equipment of Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center SB RAS”) за предоставление в пользование прибора для цифровой ПЦР QIAcuity One, 5plex Instrument (“QIAGEN”, 2021).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с использованием животных в качестве объектов.

Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с содержанием настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lei S. (2021) Digital PCR for accurate quantification of pathogens: principles, applications, challenges and future prospects. *Int. J. Biol. Macromol.* **10**, 750–759.
2. Vynck M., Trypsteen W., Thas O., Vandekerckhove L., De Spiegelaere W. (2016) The future of digital polymerase chain reaction in virology. *Mol. Diagn. Ther.* **20**, 437–447.
3. Huggett J.F., Cowen S., Foy C.A. (2015) Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool. *Clin. Chem.* **61**, 79–88.
4. Zhu X., Liu P., Lu L., Zhong H., Xu M., Jia R., Su L., Cao L., Sun Y., Guo M., Sun J., Xu J. (2022) Development of a multiplex droplet digital PCR assay for detection of enterovirus, parechovirus, herpes simplex virus 1 and 2 simultaneously for diagnosis of viral CNS infections. *Viol. J.* **19**, 70.
5. Leong N.K.C., Chu D.K.W., Chu J.T.S., Tam Y.H., Ip D.K.M., Cowling B.J., Poon L.L.M. (2020) A sixplex droplet digital RT-PCR assay for seasonal influenza virus typing, subtyping, and lineage determination. *Influenza Other Respir. Viruses.* **14**, 720–729.
6. Whale A.S., Huggett J.F., Tzonev S. (2016) Fundamentals of multiplexing with digital PCR. *Biomol. Detect. Quantif.* **10**, 15–23.
7. The dMIQE Group, Huggett J.F. (2020) The digital MIQE guidelines update: minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments for 2020. *Clin. Chem.* **66**, 1012–1029.
8. Mao X., Liu C., Tong H., Chen Y., Liu K. (2019) Principles of digital PCR and its applications in current obstetrical and gynecological diseases. *Am. J. Transl. Res.* **11**, 7209–7222.
9. Chen B. (2021) Droplet digital PCR as an emerging tool in detecting pathogens nucleic acids in infectious diseases. *Clin. Chim. Acta.* **517**, 156–161.
10. Basu A.S. (2017) Digital assays part I: partitioning statistics and digital PCR. *SLAS Technol.* **22**, 369–386.
11. Pinheiro L.B., Coleman V.A., Hindson C.M., Herrmann J., Hindson B.J., Bhat S., Emslie K.R. (2012) Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Anal. Chem.* **84**, 1003–1011.
12. Wang K., Li B., Guo Y., Wu Y., Li Y., Wu W. (2022) An integrated digital PCR system with high universality and low cost for nucleic acid detection. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **10**, 947895.
13. Hall Sedlak R., Jerome K.R. (2014) The potential advantages of digital PCR for clinical virology diagnostics. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* **14**, 501–507.
14. Tang L., Sun Y., Buelow D., Gu Z., Caliendo A.M., Pounds S., Hayden R.T. (2016) Quantitative assessment of commutability for clinical viral load testing using a digital PCR-based reference standard. *J. Clin. Microbiol.* **54**, 1616–1623.
15. Sedlak R.H., Nguyen T., Palileo I., Jerome K.R., Kuypers J. (2017) Superiority of digital reverse transcription-PCR (RT-PCR) over real-time RT-PCR for quantitation of highly divergent human rhinoviruses. *J. Clin. Microbiol.* **55**, 442–449.
16. Sedlak R.H., Jerome K.R. (2013) Viral diagnostics in the era of digital polymerase chain reaction. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **75**, 1–4.
17. Hudecova I. (2015) Digital PCR analysis of circulating nucleic acids. *Clin. Biochem.* **48**, 948–956.
18. Sanders R., Mason D.J., Foy C.A., Huggett J.F. (2013) Evaluation of digital PCR for absolute RNA quantification. *Anal. Chem.* **8**, e75296.
19. Hayden R.T., Gu Z., Sam S.S., Sun Y., Tang L., Pounds S., Caliendo A.M. (2016) Comparative performance of reagents and platforms for quantitation of cytomegalovirus DNA by digital PCR. *J. Clin. Microbiol.* **54**, 2602–2608.
20. Vogelstein B., Kinzler K.W. (1999) Digital PCR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**, 9236–9241.
21. Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* **239**, 487–491.
22. Morley A.A. (2014) Digital PCR: a brief history. *Biomol. Detect. Quantif.* **1**, 1–2.
23. Simmonds P., Balfe P., Peutherer J.F., Ludlam C.A., Bishop J.O., Brown A.J. (1990) Human immunodeficiency virus-infected individuals contain provirus in

- small numbers of peripheral mononuclear cells and at low copy numbers. *J. Virol.* **64**, 864–872.
24. Sykes P.J., Neoh S.H., Brisco M.J., Hughes E., Condon J., Morley A.A. (1992) Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *BioTechniques.* **13**, 444–449.
 25. Sanders R., Huggett J.F., Bushell C.A., Cowen S., Scott D.J., Foy C.A. (2011) Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification. *Anal. Chem.* **83**, 6474–6484.
 26. Qin J., Jones R.C., Ramakrishnan R. (2008) Studying copy number variations using a nanofluidic platform. *Nucl. Acids Res.* **36**, e116.
 27. Pekin D., Skhiri Y., Baret J.-C., Corre D.L., Mazutis L., Salem C.B., Millot F., Harrak A.E., Hutchison J.B., Larson J.W., Link D.R., Laurent-Puig P., Griffiths A.D., Taly V. (2011) Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab. Chip.* **11**, 2156–2166.
 28. Tan L.L., Loganathan N., Agarwalla S., Yang C., Yuan W., Zeng J., Wu R., Wang W., Duraiswamy S. (2022) Current commercial dPCR platforms: technology and market review. *Crit. Rev. Biotechnol.* 1–32.
 29. Garzarelli V., Chiriaco M.S., Cereda M., Autuori I., Ferrara F. (2022) Miniaturized real-time PCR systems for SARS-CoV-2 detection at the Point-of-Care. *Clin. Chim. Acta.* **536**, 104–111.
 30. Cassinari K., Alessandri-Gradt E., Chambon P., Charbonnier F., Gracias S., Beaussire L., Alexandre K., Sarafan-Vasseur N., Houdayer C., Etienne M., Caron F., Plantier J.C., Frebourg T. (2021) Assessment of multiplex digital droplet RT-PCR as a diagnostic tool for SARS-CoV-2 detection in nasopharyngeal swabs and saliva samples. *Clin. Chem.* **67**, 736–741.
 31. Artika I.M., Wiyatno A., Ma'roef C.N. (2020) Pathogenic viruses: molecular detection and characterization. *Infect. Genet. Evol.* **81**, 104215.
 32. Brunetto G.S., Massoud R., Leibovitch E.C., Caruso B., Johnson K., Ohayon J., Fenton K., Cortese I., Jacobson S. (2014) Digital droplet PCR (ddPCR) for the precise quantification of human T-lymphotropic virus 1 proviral loads in peripheral blood and cerebrospinal fluid of HAM/TSP patients and identification of viral mutations. *J. Neurovirol.* **20**, 341–351.
 33. White R.A., Quake S.R., Curr K. (2012) Digital PCR provides absolute quantitation of viral load for an occult RNA virus. *J. Virol. Methods.* **179**, 45–50.
 34. Wouters Y., Dalloyaux D., Christenhusz A., Roelofs H.M.J., Wertheim H.F., Bleeker-Rovers C.P., te Morsche R.H., Wanten G.J.A. (2020) Droplet digital polymerase chain reaction for rapid broad-spectrum detection of bloodstream infections. *Microb. Biotechnol.* **13**, 657–668.
 35. Mancusi A., Fulgione A., Girardi S., Di Maro O., Capuano F., Proroga Y.T.R., Cristiano D. (2022) Droplet digital PCR (ddPCR) analysis for detecting shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC). *Appl. Sci.* **12**, 3654.
 36. Shao Z., Zhu J., Wei Y., Jin J., Zheng Y., Liu J., Zhang R., Sun R., Hu B. (2022) Pathogen load and species monitored by droplet digital PCR in patients with bloodstream infections: a prospective case series study. *BMC Infect. Dis.* **22**, 771.
 37. Merino I., de la Fuente A., Domínguez-Gil M., Eiros J.M., Tedim A.P., Bermejo-Martín J.F. (2022) Digital PCR applications for the diagnosis and management of infection in critical care medicine. *Crit. Care.* **26**, 63.
 38. Hu B., Tao Y., Shao Z., Zheng Y., Zhang R., Yang X., Liu J., Li X., Sun R. (2021) A comparison of blood pathogen detection among droplet digital PCR, metagenomic next-generation sequencing, and blood culture in critically ill patients with suspected bloodstream infections. *Front. Microbiol.* **12**, 641202.
 39. Kondrashin A.V., Morozova L.F., Stepanova E.V., Turbabinina N.A., Maksimova M.S., Morozov E.N. (2018) On the epidemiology of *Plasmodium vivax* malaria: past and present with special reference to the former USSR. *Malar. J.* **17**, 346.
 40. Mangold K.A., Manson R.U., Koay E.S.C., Stephens L., Regner M., Thomson R.B., Peterson L.R., Kaul K.L. (2005) Real-time PCR for detection and identification of *Plasmodium* spp. *J. Clin. Microbiol.* **43**, 2435–2440.
 41. Koepfli C., Nguiragool W., Hofmann N.E., Robinson L.J., Ome-Kaius M., Sattabongkot J., Felger I., Mueller I. (2016) Sensitive and accurate quantification of human malaria parasites using droplet digital PCR (ddPCR). *Sci. Rep.* **6**, 39183.
 42. Gentilini F., Turba M.E., Taddei F., Gritti T., Fantini M., Dirani G., Sambri V. (2021) Modelling RT-qPCR cycle-threshold using digital PCR data for implementing SARS-CoV-2 viral load studies. *PLoS One.* **16**, e0260884.
 43. Li Y., Yao L., Li J., Chen L., Song Y., Cai Z., Yang C. (2020) Stability issues of RT-PCR testing of SARS-CoV-2 for hospitalized patients clinically diagnosed with COVID-19. *J. Med. Virol.* **92**, 903–908.
 44. Wu J., Liu J., Zhao X., Liu C., Wang W., Wang D., Zhang C., Yu J., Jiang B., Cao H., Li L. (2019) Clinical characteristics of imported cases of COVID-19 in Jiangsu province: a multicenter descriptive study. *Clin. Infect. Dis.* **71**, 706–712.
 45. Tahamtan A., Ardebili A. (2020) Real-time RT-PCR in COVID-19 detection: issues affecting the results. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* **20**, 453–454.
 46. Konka A., Lejawa M., Gaździcka J., Bochenek A., Fronczek M., Strzelczyk J.K. (2022) RT-PCR detection of SARS-CoV-2 among individuals from the upper Silesian region – analysis of 108516 tests. *Diagnostics.* **12**, 7.
 47. Suo T., Liu X., Feng J., Guo M., Hu W., Guo D., Ullah H., Yang Y., Zhang Q., Wang X., Sajid M., Huang Z., Deng L., Chen T., Liu F., Xu K., Liu Y., Zhang Q., Liu Y., Xiong Y., Chen G., Lan K., Chen Y. (2020) ddPCR: a more accurate tool for SARS-CoV-2 detection in low viral load specimens. *Emerg. Microbes Infect.* **9**, 1259–1268.
 48. Dong L., Zhou J., Niu C., Wang Q., Pan Y., Sheng S., Wang X., Zhang Y., Yang J., Liu M., Zhao Y., Zhang X., Zhu T., Peng T., Xie J., Gao Y., Wang D., Dai X., Fang X. (2021) Highly accurate and sensitive diagnostic detection of SARS-CoV-2 by digital PCR. *Talanta.* **224**, 121726.

49. Тельшева Е.Н. (2017) Свободно-циркулирующая ДНК плазмы крови. Возможности применения в онкологии. *Вестник РНЦПР*. **17**, 2.
50. Sarhadi V.K., Armengol G. (2022) Molecular biomarkers in cancer. *Biomolecules*. **12**, 1021.
51. Wang S., Zhang K., Tan S., Xin J., Yuan Q., Xu H., Xu X., Liang Q., Christiani D.C., Wang M., Liu L., Du M. (2021) Circular RNAs in body fluids as cancer biomarkers: the new frontier of liquid biopsies. *Mol. Cancer*. **20**, 13.
52. Szilágyi M., Pös O., Márton É., Buglyó G., Soltész B., Keserű J., Penyige A., Szemes T., Nagy B. (2020) Circulating cell-free nucleic acids: main characteristics and clinical application. *Int. J. Mol. Sci*. **21**, 6827.
53. Pös O., Biró O., Szemes T., Nagy B. (2018) Circulating cell-free nucleic acids: characteristics and applications. *Eur. J. Hum. Genet*. **26**, 937–945.
54. Liu D., Yin H., Wang Y., Cao Y., Yin J., Zhang J., Yin H., Zhao X. (2021) Development of a highly sensitive digital PCR assay to quantify long non-coding RNA MYU in urine samples which exhibited great potential as an alternative diagnostic biomarker for prostate cancer. *Transl. Androl. Urol*. **10**, 3815–3825.
55. Du M., Huang C.-C., Tan W., Kohli M., Wang L. (2020) Multiplex digital PCR to detect amplifications of specific androgen receptor loci in cell-free DNA for prognosis of metastatic castration-resistant prostate cancer. *Cancers*. **12**, E2139.
56. Бит-Сава Е.М. (2014) Наследственные характеристики *BRCA1* 5382insC/chek2/blm-ассоциированного рака молочной железы. *Сибирский Онкол. Журн*. **6**, 15–18.
57. Mehta A., Diwan H., Gupta G., Nathany S., Agnihotri S., Dhanda S. (2022) Founder *BRCA1* mutations in Nepalese population. *J. Pathol. Transl. Med*. **56**, 212–216.
58. Цыганов М.М., Тарабановская Н.А., Дерюшева И.В., Ибрагимова М.И., Казанцева П.В., Певзнер А.М., Слонимская Е.М., Литвяков Н.В. (2019) Ответ на неоадьювантную химиотерапию с включением препаратов платины у больной раком молочной железы с делецией гена *BRCA1* в опухоли. *Сибирский Онкол. Журн*. **18**, 103–108.
59. Каюкова Е.В. (2019) Возможности жидкостной биопсии в диагностике и мониторинге цервикального рака. *Сибирский Онкол. Журн*. **18**, 92–101.
60. Tewari K.S., Sill M.W., Monk B.J., Penson R.T., Moore D.H., Lankes H.A., Ramondetta L.M., Landrum L.M., Randall L.M., Oaknin A., Leitao M.M., Eisenhauer E.L., DiSilvestro P., Van Le L., Pearl M.L., Burke J.J., Salani R., Richardson D.L., Michael H.E., Kindelberger D.W., Birrer M.J. (2020) Circulating tumor cells in advanced cervical cancer: NRG oncology-gynecologic oncology group study 240 (NCT 00803062). *Mol. Cancer Ther*. **19**, 2363–2370.
61. Buleje J., Guevara-Fujita M., Acosta O., Huaman F.D.P., Danos P., Murillo A., Pinto J.A., Araujo J.M., Aguilar A., Ponce J., Vigil C., Castaneda C., Calderon G., Gomez H.L., Fujita R. (2017) Mutational analysis of *BRCA1* and *BRCA2* genes in Peruvian families with hereditary breast and ovarian cancer. *Mol. Genet. Genomic Med*. **5**, 481–494.
62. Weigelt B., Comino-Méndez I., de Bruijn I., Tian L., Meisel J.L., García-Murillas I., Fribbens C., Cutts R., Martelotto L.G., Ng C.K., Lim R.S., Selenica P., Piscuoglio S., Aghajanian C., Norton L., Murali R., Hyman D.M., Borsu L., Arcila M.E., Konner J., Reis-Filho J.S., Greenberg R.A., Robson M.E., Turner N.C. (2017) Diverse *BRCA1* and *BRCA2* reversion mutations in circulating cell-free DNA of therapy-resistant breast or ovarian cancer. *Clin. Cancer Res*. **23**, 6708–6720.
63. He H.-J., Almeida J.L., Lund S.P., Steffen C.R., Choquette S., Cole K.D. (2016) Development of NIST standard reference material 2373: genomic DNA standards for HER2 measurements. *Biomol. Detect. Quantif*. **8**, 1–8.
64. Zhou R., Cai Y., Shen S., Sha M., Li Z., Head S.R., Wang Y. (2018) A digital PCR based assay to detect all ALK fusion species. *Front. Lab. Med*. **2**, 49–54.
65. Beck J., Bierau S., Balzer S., Andag R., Kanzow P., Schmitz J., Gaedcke J., Moerer O., Slotta J.E., Walson P., Kollmar O., Oellerich M., Schütz E. (2013) Digital droplet PCR for rapid quantification of donor DNA in the circulation of transplant recipients as a potential universal biomarker of graft injury. *Clin. Chem*. **59**, 1732–1741.
66. Mair R., Mouliere F. (2022) Cell-free DNA technologies for the analysis of brain cancer. *Br. J. Cancer*. **126**, 371–378.
67. McEwen A.E., Leary S.E.S., Lockwood C.M. (2020) Beyond the blood: CSF-derived cfDNA for diagnosis and characterization of CNS tumors. *Front. Cell Dev. Biol*. **8**, 45.
68. Bouchè V., Aldegheri G., Donofrio C.A., Fioravanti A., Roberts-Thomson S., Fox S.B., Schettini F., Generali D. (2021) BRAF signaling inhibition in glioblastoma: which clinical perspectives? *Front. Oncol*. **11**, 772052.
69. Castel D., Philippe C., Calmon R., Le Dret L., Truffaux N., Boddaert N., Pagès M., Taylor K.R., Saulnier P., Lacroix L., Mackay A., Jones C., Sainte-Rose C., Blauwblomme T., Andreuolo F., Puget S., Grill J., Varlet P., Debily M.-A. (2015) Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathol. (Berl.)*. **130**, 815–827.
70. Zaytseva M., Usman N., Salnikova E., Sanakoeva A., Valiakmetova A., Chervova A., Papusha L., Novichkova G., Druy A. (2022) Methodological challenges of digital PCR detection of the histone H3 K27M somatic variant in cerebrospinal fluid. *Pathol. Oncol. Res*. **28**, 1610024.
71. Sahu R., Vishnuraj M.R., Srinivas Ch., Dadimi B., Megha G.K., Pollumahanti N., Malik S.S., Vaithyanathan S., Rawool D.B., Barbuddhe S.B. (2021) Development and comparative evaluation of droplet digital PCR and quantitative PCR for the detection and quantification of *Chlamydia psittaci*. *J. Microbiol. Methods*. **190**, 106318.

Digital PCR as a Highly Sensitive Diagnostic Tool: a Review

K. V. Kopylova¹, Ed. W. Kasparov¹, I. V. Marchenko¹, and M. V. Smolnikova^{1, *}

¹*Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, 660022 Russia*

**e-mail: smarinv@yandex.ru*

Nowadays digital PCR (dPCR) is a nucleic acid quantification method widely used in genetic analysis. One of the most significant advantages of dPCR over other methods is the possibility for absolute quantitative determination of genetic material without construction of calibration curves, which allows one to detect even single molecules of nucleic acids, and, hence, early diagnosis of diseases. A specific characteristic of dPCR is the detection of the analyzed biological object in each microreaction, followed by the presentation of the analysis results in a binary system, thereby giving the method name. The key aspects of developing the dPCR method, i.e. from the first devices based on microfluidic chip technology to modern systems capable of measuring a target at a concentration of up to 1 in 100000 copies were shown in the current work. We analyzed the data on the detection of various pathogens using dPCR, as well as summarized various study results demonstrating the innovativeness of this method “point-of-care”. Both the possibilities of multiplex dPCR analysis and its potential in clinical practice were presented. The review also addresses the issue of the dPCR role in the development of non-invasive methods for oncological diseases to be analyzed. Possible ways of developing dPCR technology were emphasized, including the use as a “point-of-care” systems.

Keywords: digital PCR, dPCR, infection, DNA, oncology, virus, COVID-19