



Оценка эффективности нового набора реагентов для выявления мутаций, связанных с лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулеза к рифампицину и изониазиду, методом ПЦР по данным клинических испытаний

Ю. Л. МИКУЛОВИЧ¹, Ю. А. САВОЧКИНА¹, А. И. ЗАЙЦЕВА¹, А. Е. ПАНОВА², А. С. ВИНОКУРОВ², Г. А. ШИПУЛИН¹

¹ ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России, Москва, РФ

² ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» МЗ РФ, Москва, РФ

РЕЗЮМЕ

Цель исследования: оценка эффективности использования в клинических испытаниях нового набора реагентов (НР) «АмплиТест® МБТ-Резист-1» на основе ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) в сравнении с аналогичным по назначению, зарегистрированным российским НР, по выявлению генетических маркеров резистентности *M. tuberculosis* complex (МБТ) к рифампицину (RIF) и изониазиду (INH) в образцах биологического материала человека и культурах МБТ.

Материалы и методы. Были исследованы 200 образцов ДНК, полученных из биологического материала (мокроты (N=100), бронхоальвеолярного лаважа (N=50), биоптата (операционного материала; N=50)) от пациентов с туберкулезом легких и содержащих ДНК МБТ в концентрации не менее 1×10^3 ГЭ/мл, и 100 образцов ДНК культур МБТ. Оценка эффективности выявления мутаций, связанных с устойчивостью МБТ к RIF и INH, с помощью нового НР «АмплиТест® МБТ-Резист-1» проводили в сравнении с НР «Амплитуб-МЛУ-РВ» (ООО «Синтол», Россия). В случае получения дискордантных результатов целевые локусы ДНК МБТ секвенировали по Сэнгеру.

Результаты. Получено полное совпадение результатов и, как следствие, высокие показатели эффективности (положительное и отрицательное соответствие результатов – 100% соответственно) нового НР «АмплиТест® МБТ-Резист-1» в сравнении с НР «Амплитуб-МЛУ-РВ» при выявлении мутаций, связанных с устойчивостью МБТ как к RIF, так и к INH, как для образцов биологического материала человека, так и для культур МБТ. В двух пробах ДНК культур МБТ с помощью нового НР обнаружена дополнительная мутация (I572L) в гене *rpoB*, не выявляемая набором сравнения и подтвержденная секвенированием по Сэнгеру.

Ключевые слова: МБТ с лекарственной устойчивостью, генетические маркеры резистентности, рифампицин, изониазид, ПЦР в реальном времени.

Для цитирования: Микулович Ю. Л., Савочкина Ю. А., Зайцева А. И., Панова А. Е., Винокуров А. С., Шипулин Г. А. Оценка эффективности нового набора реагентов для выявления мутаций, связанных с лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулеза к рифампицину и изониазиду, методом ПЦР по данным клинических испытаний // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2023. – Т. 101, № 4. – С. 46–55. <http://doi.org/10.58838/2075-1230-2023-101-4-46-55>

Evaluation of Effectiveness of a New Kit of Reagents for Detection of Mutations Associated with Drug Resistance of Tuberculous Mycobacteria to Rifampicin and Isoniazid, by PCR according to Evidences of Clinical Trials

Yu. L. MIKULOVICH¹, Yu. A. SAVOCHKINA¹, A. I. ZAYTSEVA¹, A. E. PANOVA², A. S. VINOKUROV², G. A. SHIPULIN¹

¹ Center for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Russian Federal Medical Biological Agency, Moscow, Russia

² National Medical Research Center of Phthisiopulmonology and Infectious Diseases, Russian Ministry of Health, Moscow, Russia

ABSTRACT

The objective: to evaluate effectiveness in clinical trials of the new kit of reagents of AmpliTest® MBT-Resist-I based on real-time PCR (RT-PCR) versus similar kits of reagent registered in Russia, to identify genetic markers of *M. tuberculosis* complex (MTB) resistance to rifampicin (RIF) and isoniazid (INH) in human biological samples and MTB cultures.

Subjects and Methods. 200 DNA samples were studied, they had been obtained from biological specimens (sputum (N=100), bronchoalveolar lavage (N=50), biopsy (surgical material; N=50)) of pulmonary tuberculosis patients and containing MTB DNA at a concentration of at least 1×10^3 GE/ml, and from 100 DNA samples of MTB cultures. Efficiency of detecting mutations associated with MTB resistance to RIF and INH using the new kit of reagent of AmpliTest® MBT-Resist-I was evaluated in comparison with HP Amplitube-MDR-RV (ООО Синтол, Russia). In the case of discordant results, the target MTB DNA loci were sequenced by Sanger.

Results. We observed complete agreement of the results and consequently high efficiency rates (positive and negative concordance of results – 100%, respectively) of the new kit of reagents of AmpliTest® MBT-Resist-I in comparison with the kit of reagent of Amplitube-MDR-RV in detection of mutations associated with MTB resistance to both RIF and INH, both for human samples and for MTB cultures. In two DNA samples of MTB cultures, an additional mutation (I572L) in the *rpoB* gene was detected using the new kit of reagents which was not detected by the comparison kit and was confirmed by Sanger sequencing.

Conclusion. Inhalers vary significantly by the patients' ability to use them correctly. Asthma patients master the correct inhalation technique better versus COPD patients. Liquid inhalers were more difficult to be used correctly, and the best results were observed with multi-dose powder inhalers. The patient's training by a healthcare professional is critical to assure the correct use of inhalers.

Key words: COPD, drug resistant MTB, genetic markers of resistance, rifampicin, isoniazid, real-time PCR.

For citations: Mikulovich Yu. L., Savochkina Yu. A., Zaytseva A. I., Panova A. E., Vinokurov A. S., Shipulin G. A. Evaluation of effectiveness of a new kit of reagents for detection of mutations associated with drug resistance of tuberculous mycobacteria to rifampicin and isoniazid, by PCR according to evidences of clinical trials. *Tuberculosis and Lung Diseases*, – 2023. Vol. 101, no. 4, pp. 46–55 (In Russ.) <http://doi.org/10.58838/2075-1230-2023-101-4-46-55>

Для корреспонденции:
Микулович Юлия Львовна
E-mail: YuMikulovich@cspfmba.ru

Correspondence:
Yulia L. Mikulovich
Email: YuMikulovich@cspfmba.ru

Введение

В Российской Федерации (РФ) и мире остается актуальной проблема распространения ТБ с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя (МЛУ-ТБ) [3, 11]. МЛУ-ТБ, как известно, обусловлен устойчивостью *Mycobacterium tuberculosis* complex (МБТ) одновременно как минимум к двум противотуберкулезным препаратам (ПТП) – рифампицину и изониазиду. Традиционными методами определения лекарственной чувствительности (ЛЧ) МБТ являются культуральные методы исследования: посев на плотные и жидкие питательные среды, содержащие ПТП. Однако из-за медленного роста МБТ и необходимости получить культуру МБТ до определения ЛЧ результаты получают в среднем через 30 дней после поступления биологического материала в лабораторию. Это обуславливает назначение эмпирического режима химиотерапии, который может быть неэффективным и привести к формированию МЛУ-ТБ. Во избежание этого, согласно рекомендациям ВОЗ [11] и российским клиническим рекомендациям «Туберкулез у взрослых» [1], при выявлении ТБ у пациента необходимо сразу использовать молекулярно-генетические методы исследования биологического материала, выявляющие генетические маркеры резистентности МБТ к ПТП и позволяющие получать результаты в течение суток. В научной литературе описано, что мутации в гене *rpoB*, кодирующем β -субъединицу ДНК-зависимой РНК-полимеразы, сосредоточены преимущественно в одной области, называемой Rifampicin Resistance Determining Region (RRDR), которая включает кодоны 507–533 (нумерация по *E. coli*) или 426–452 (нумерация по *M. tuberculosis*), связаны с устойчивостью МБТ к рифампицину [17]. Наиболее распространенной является мутация Ser→Leu в кодоне 531 гена *rpoB*, доминирующая как в России [2, 4, 14, 15, 19], так и в других странах [9, 12, 13,

16, 20]. Мутации в гене *katG*, кодирующем каталазу-пероксидазу, и в промоторной области гена *inhA*, кодирующего НАДН-зависимую еноил-редуктазу, связаны с устойчивостью МБТ к изониазиду [17]. При этом наличие мутации только в промоторной области гена *inhA* связано с устойчивостью низкого уровня (low-level resistance) к изониазиду.

В настоящее время в противотуберкулезных учреждениях для клинической лабораторной диагностики используются несколько наборов реагентов отечественного и зарубежного производства для выявления мутаций, связанных с устойчивостью МБТ к рифампицину, изониазиду: «Амплитуб-МЛУ-РВ» (ООО «Синтол», Россия; РУ № ФСР 2010/07636), «ТБ-Биочип-1» (РУ № ФСР 2011/10088) и «ТБ-Тест» (НПФ «ИМБ-Биочип», Россия; РУ № РЗН 2014/1709), «Xpert® MTB/RIF» (РУ № ФСЗ 2009/05723) и «Xpert® MTB/RIF Ultra» (Cepheid, США; РУ № РЗН 2020/9929). У каждого из них есть свои преимущества, но также недостатки и ограничения (одно или несколько): высокий риск контаминации продуктами амплификации, ограниченный спектр выявляемых мутаций, трудоемкость, высокая стоимость, необходимость закупки дополнительного оборудования, сложность в организации потока исследований ввиду одновременного анализа ограниченного числа образцов. Поэтому важно разрабатывать новые усовершенствованные отечественные тест-системы, которые были бы лишены перечисленных выше недостатков и удобны для практического применения.

В ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России был разработан на основе одноэтапной мультиплексной ПЦР-РВ и зарегистрирован в качестве медицинского изделия для диагностики *in vitro* набор реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-1», который позволяет выявлять широкий спектр мутаций в области RRDR и кодоне 572 гена *rpoB*, кодоне 315 гена *katG* и участке про-

моторной области гена *inhA* (а именно регуляторной области *fabG1-inhA*), связанных с устойчивостью МБТ к рифампицину и изониазиду.

Цель исследования

Оценка эффективности использования в клинических испытаниях нового набора реагентов (НР) «АмплиТест® МБТ-Резист-1» на основе ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) в сравнении с аналогичным по назначению, зарегистрированным российским НР, по выявлению генетических маркеров резистентности *M. tuberculosis complex* (МБТ) к рифампицину (RIF) и изониазиду (INH) в образцах биологического материала человека и культурах МБТ.

Материалы и методы

В работе были исследованы 200 образцов ДНК из биологического материала пациентов ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России с туберкулезом легких и содержащих ДНК МБТ в концентрации не менее 1×10^3 ГЭ/мл и 100 образцов ДНК из культур МБТ. Образцы ДНК были выделены из следующих видов биологического материала: мокроты ($n=100$), жидкости бронхоальвеолярного лаважа (жБАЛ; $n=50$), биоптата (операционного материала; $n=50$).

Сбор нативных образцов для клинических испытаний от пациентов с туберкулезом легких осуществляли сотрудники ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России в рамках проведения стандартного диагностического обследования.

Нативные образцы биологического материала подвергали предварительной обработке для деконтаминации и гомогенизации образцов с помощью реагента «BVL Mucoprep Kit» («BD», США; РУ № ФСЗ 2009/04403). Согласно инструкции по применению указанного реагента, проводилось центрифугирование с получением осадков, к которым затем добавляли инактивирующий реагент «Амплитуб-Преп» (ООО «Синтол», Россия; РУ № РЗН 2017/6634) для инактивации МБТ с сохранением целостности их ДНК для безопасной работы в открытой автоматизированной станции Tecan Freedom EVO 150. Образцы культур МБТ обрабатывали только реагентом «Амплитуб-Преп».

Из предобработанных образцов биологического материала или культур МБТ выделяли тотальную ДНК с помощью набора реагентов (НР) для выделения, обнаружения и количественного определения ДНК микобактерий туберкулезного комплекса методом полимеразной цепной реакции в реальном времени «Амплитуб-РВ» (ООО «Синтол», Россия; РУ № ФСЗ 2010/07635) на автоматизированной станции Tecan Freedom EVO 150 («ТЕСАН», Швейцария; РУ № ФСЗ 2008/03047). Обнаружение и определение количества ДНК МБТ в выделенных

пробах ДНК проводили также с помощью НР «Амплитуб-РВ» согласно инструкции. Далее, согласно инструкции к «АмплиТест® МБТ-Резист-1», отбирали для исследования пробы ДНК с концентрацией ДНК МБТ не менее 20 копий/пробе (20 мкл) (по однокопийной мишени *regX*), что соответствовало концентрации не менее 1×10^3 геномных эквивалентов в 1 мл (ГЭ/мл).

Затем с помощью нового набора «АмплиТест® МБТ-Резист-1» и набора сравнения «Амплитуб-МЛУ-РВ» (ООО «Синтол», Россия; РУ № ФСР 2010/07636) параллельно исследовали отобранные пробы ДНК на наличие мутаций в ДНК МБТ, связанных с устойчивостью к рифампицину и изониазиду. В соответствии с принятым алгоритмом проведения клинических испытаний для регистрации нового медицинского изделия требуется использовать для сравнения зарегистрированный набор, близкий по назначению и методу к испытываемому. Ввиду того, что результаты сравнивали с результатами аналогичного по назначению набора реагентов на основе ПЦР, а не с результатами фенотипического (культурально-го) метода определения ЛЧ МБТ, вместо показателей диагностической чувствительности и специфичности нового набора реагентов определяли их аналогии – положительное и отрицательное соответствие результатов (с доверительной вероятностью 95%). Доверительные интервалы рассчитывали по методу Клоппера и Пирсона [8].

Испытуемые пробы для ПЦР были предварительно зашифрованы сотрудниками ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России, не принимающими участия в постановке ПЦР и учете результатов.

ПЦР-исследование с новым набором реагентов проводили с использованием программируемых амплификаторов с системой детекции флуоресцентного сигнала в режиме реального времени: CFX96 («Bio-Rad», США; РУ № ФСЗ 2008/03399); Rotor-Gene 6000 («Corbett Research Pty Ltd.», Австралия; РУ № ФС 2006/1222); ДТ-прайм (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия; РУ № ФСР 2011/10229) с помощью специального программного обеспечения (ПО) для управления приборами для проведения полимеразной цепной реакции в режиме реального времени, а также анализа полученных с приборов данных (РУ № РЗН 2019/8870), так и без него. Работа проводилась согласно инструкции к испытываемому набору «АмплиТест МБТ-Резист-1», руководству пользователя и методическим рекомендациям к специальному ПО.

ПЦР-анализ с помощью набора сравнения проводили согласно инструкции производителя с использованием амплификатора CFX96.

Секвенирование по Сэнгеру целевых локусов в дискордантных пробах ДНК МБТ осуществляли с помощью автоматической системы секвенирования Applied Biosystems 3500 Series Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, США; РУ № ФСЗ 2010/07007).

Принцип тестирования образцов с помощью нового НР основывается на одновременной амплификации участков ДНК МБТ, включающих области расположения анализируемых мутаций, ассоциированных с устойчивостью МБТ к рифампицину и изониазиду и ДНК внутреннего контрольного образца, и детекции целевых участков с помощью флуоресцентно-меченых олигонуклеотидных зондов (гибридизационно-флуоресцентной детекции) в режиме «реального времени».

Выявление мутаций, ассоциированных с устойчивостью МБТ к рифампицину (в гене *rpoB*) и изониазиду (в гене *katG*, промоторной области гена *inhA*), для одного образца проводится в трех пробирках. В первых двух пробирках выявляются мутации в области RRDR гена *rpoB*, в третьей пробирке – мутации в кодоне 315 гена *katG*, участке промоторной области гена *inhA*, кодоне 572 гена *rpoB* и осуществляется детекция ВКО. Результаты амплификации анализируемых фрагментов генов, а также ДНК ВКО для каждой реакционной смеси регистрируются по четырем различным каналам флуоресцентной детекции, схема детекции и анализа результатов согласно инструкции к НР представлена в табл. 1.

Таблица 1. Анализ результатов в соответствии со схемой детекции целевых мишеней по каналам для флуорофоров

Table 1. Analysis of the results in accordance with the scheme for detecting target targets through channels for fluorophores

Канал для флуорофора	FAM	JOE	ROX	Cy5
Наименование ПЦР-смеси-FL	Детектируемая ДНК-мишень (область амплификации)			
МБТ-Р № 1	область RRDR гена <i>rpoB</i> (область кодона 531) (дикого типа)	область RRDR гена <i>rpoB</i> (область кодона 516) (дикого типа)	мутация S531L в области RRDR гена <i>rpoB</i>	область RRDR гена <i>rpoB</i> (область кодона 526) (дикого типа)
МБТ-Р № 2	область RRDR гена <i>rpoB</i> (область кодона 510) (дикого типа)	область RRDR гена <i>rpoB</i> (область кодона 513) (дикого типа)	область RRDR гена <i>rpoB</i> (область кодона 522) (дикого типа)	область RRDR гена <i>rpoB</i> (область кодона 533) (дикого типа)
МБТ-Р № 3	участок гена <i>katG</i> (область кодона 315) (дикого типа)	участок гена <i>rpoB</i> вне RRDR (область кодона 572) (дикого типа)	ДНК ВКО (искусственная синтезированная последовательность)	участок промоторной области гена <i>inhA</i> (дикого типа)

Согласно процедуре, проведение анализа НР «АмплиТест® МБТ-Резист-1» применяется после того, как проведена предобработка (деконтаминация, гомогенизация и инактивация) нативных образцов биологического материала, из них выделена тотальная ДНК, в пробе выявлена ДНК МБТ, проведен отбор образцов с концентрацией ДНК МБТ не менее 1 × 10³ ГЭ/мл (предел детекции данного

НР). Для выделения тотальной ДНК и обнаружения в ней ДНК МБТ рекомендуется использовать любой зарегистрированный на территории РФ набор реагентов для выделения и обнаружения ДНК МБТ, например, «РеалБест ДНК МБТС» (АО «Вектор-Бест», Россия), «Амплитуб-РВ» (ООО «Синтол», Россия) или «АмплиСенс® МТС-FL» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). При проведении данных клинических испытаний был использован НР «Амплитуб-РВ». Критерии пригодности проб ДНК для анализа с помощью нового НР включают либо определение концентрации ДНК МБТ (при использовании НР для количественного определения), либо сравнение значения порогового цикла *Ct* образца по каналу для детекции ДНК МБТ с *Ct* положительного контрольного образца (при использовании НР для качественного определения).

Для выявления мутаций в новом НР используются LNA-модифицированные олигонуклеотидные зонды, комплементарные ДНК МБТ без мутаций (ДНК МБТ «дикого типа»), за исключением одного дополнительного зонда, выявляющего мутацию S531L в гене *rpoB*. При использовании указанного подхода отсутствие нарастания флуоресценции на графике (отсутствие порогового цикла (*Ct*) в таблице результатов) означает наличие мутации на участке гибридизации зонда, комплементарного ДНК МБТ дикого типа. Используемые олигонуклеотидные зонды охватывают всю область RRDR гена *rpoB*, область кодона 572 гена *rpoB*, область кодона 315 гена *katG* и участок промоторной области гена *inhA* (включающий позиции -8 и -15).

Такой подход позволяет выявлять максимальный спектр целевых мутаций, в первую очередь в области RRDR гена *rpoB*, он реализован в тестах «Xpert® МТВ/RIF» и «Xpert® МТВ/RIF Ultra» (Cepheid, США) [10, 7]. В 2021 г. ВОЗ опубликовала каталог мутаций, в котором используется экспертное правило: любую несинонимичную замену в области RRDR гена *rpoB* нужно считать связанной с устойчивостью МБТ к рифампицину [6], поэтому важно выявлять как можно больший спектр мутаций. Ранее (перед проведением клинических испытаний) с использованием панели созданных нами контрольных образцов с различными мутациями, представляющих собой клонированные в плазмидный вектор pGEM-T участки целевых генов, была показана способность нового набора реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-1» эффективно выявлять 40 мутаций, в том числе 32 мутации в гене *rpoB*, 3 мутации в гене *katG* (кодон 315) и 5 мутаций в промоторной области гена *inhA* (данные не опубликованы).

Использование ВКО позволяет контролировать эффективность ПЦР, а именно отсутствие значимого ингибирования реакции амплификации.

Анализ с помощью нового НР «АмплиТест® МБТ-Резист-1» проводится в формате одноэтапной мультиплексной ПЦР-РВ, поэтому риск контаминации

продуктами амплификации для него сведен к минимуму. В дополнение к этому данный набор реагентов содержит систему защиты от контаминации ампликонами за счет применения термолabileного фермента урацил-ДНК-гликозилазы (УДГ, UDG) и дезоксиридинтрифосфата.

Несмотря на отсутствие детекции ВКО в первых двух пробирках, их правильная работа контролируется с помощью алгоритма интерпретации результатов, а именно: если пользователь забыл добавить образец ДНК МБТ в пробирку 1 или (и) 2, то будут отсутствовать флуоресцентные сигналы по всем четырём каналам детекции мишеней для этой пробирки (пробирок) – такие результаты в отношении выявления мутаций, связанных с устойчивостью к RIF, интерпретируются как «Ошибка»; если по какой-то причине плохо прошло выделение ДНК, то есть наблюдается ингибирование ПЦР, то какие-то графики флуоресценции для образца могут пересекать пороговую линию, а другие нет, но при этом имеющиеся значения *Ct* будут выше граничных – такой результат интерпретируется как «Недостаточно ДНК МБТ для анализа». Таким образом, в обоих случаях ложноположительного результата выявления мутаций в анализируемом образце ДНК МБТ быть не может.

При использовании нового НР «АмплиТест® МБТ-Резист-1» и специального ПО происходит автоматический анализ и интерпретация результатов, которые выдаются как в кратком общем виде (рис. 1), так и в более подробном, где для каждого образца в таблице по каждому каналу детекции указаны

значения *Ct* и можно посмотреть графики флуоресценции. Пользователю необходимо только выбрать методику в ПО, серию реагентов, внести названия и расположение образцов в реакционном модуле амплификатора, все остальное делается автоматически. Время анализа образцов от запуска амплификатора до получения результатов с помощью специального ПО составляет около 90 минут. Возможна интерпретация результатов и «вручную», если не используется специальное ПО. В любом случае результаты выявления мутаций, связанных с устойчивостью МБТ к рифампицину и изониазиду, выдаются в формате «Обнаружено» или «Не обнаружено», и только в случае выявления мутации S531L в гене *rpoB* в комментарии в ПО указывается, что выявлена именно эта мутация. Также предусмотрены варианты результатов «Ошибка», «Невалидный» и «Недостаточно ДНК МБТ для анализа».

В основе набора сравнения «Амплитуб-РВ» (ООО «Синтол», Россия) лежит метод двухэтапной мультиконкурентной аллель-специфичной ПЦР-РВ, который позволяет выявлять 17 определенных мутаций: 11 мутаций в гене *rpoB* (кодоны 531, 526, 516, 533), связанных с устойчивостью МБТ к рифампицину; 3 мутации в кодоне 315 гена *katG* и 3 мутации в промоторной области гена *inhA*, ассоциированные с устойчивостью к изониазиду. Один образец анализируется в одном стрипе из 8 пробирок, таким образом, за один запуск на 96-луночном амплификаторе можно проанализировать 10 образцов и положительный контрольный образец.

Идентификатор образца	Методика	Результаты	Статус
97m	АмплиТест МБТ-Резист-1 (GT 96) x 1	Мутации, связанные с устойчивостью к рифампицину Мутации, связанные с устойчивостью к изониазиду	Не обнаружено Не обнаружено
31m	АмплиТест МБТ-Резист-1 (GT 96) x 1	Мутации, связанные с устойчивостью к рифампицину Мутации, связанные с устойчивостью к изониазиду	Обнаружено мутация в гене katG Обнаружена мутация в гене katG
39m	АмплиТест МБТ-Резист-1 (GT 96) x 1	Мутации, связанные с устойчивостью к рифампицину Мутации, связанные с устойчивостью к изониазиду	Обнаружена мутация S531L в гене rpoB Обнаружена мутация в гене katG
67m	АмплиТест МБТ-Резист-1 (GT 96) x 1	Мутации, связанные с устойчивостью к рифампицину Мутации, связанные с устойчивостью к изониазиду	Обнаружена мутация S531L в гене rpoB Обнаружена мутация в гене katG
98m	АмплиТест МБТ-Резист-1 (GT 96) x 1	Мутации, связанные с устойчивостью к рифампицину Мутации, связанные с устойчивостью к изониазиду	Не обнаружено Не обнаружено
32m	АмплиТест МБТ-Резист-1 (GT 96) x 1	Мутации, связанные с устойчивостью к рифампицину Мутации, связанные с устойчивостью к изониазиду	Обнаружена мутация S531L в гене rpoB Обнаружена мутация в гене katG
60m	АмплиТест МБТ-Резист-1 (GT 96) x 1	Мутации, связанные с устойчивостью к рифампицину Мутации, связанные с устойчивостью к изониазиду	Обнаружена мутация S531L в гене rpoB Обнаружены мутации в гене katG и промоторной области гена inhA
91m	АмплиТест МБТ-Резист-1 (GT 96) x 1	Мутации, связанные с устойчивостью к рифампицину Мутации, связанные с устойчивостью к изониазиду	Обнаружено Обнаружена мутация в гене katG
99m	АмплиТест МБТ-Резист-1 (GT 96) x 1	Мутации, связанные с устойчивостью к рифампицину Мутации, связанные с устойчивостью к изониазиду	Не обнаружено Не обнаружено
33m	АмплиТест МБТ-Резист-1 (GT 96) x 1	Мутации, связанные с устойчивостью к рифампицину Мутации, связанные с устойчивостью к изониазиду	Обнаружена мутация S531L в гене rpoB Обнаружена мутация в гене katG
61m	АмплиТест МБТ-Резист-1 (GT 96) x 1	Мутации, связанные с устойчивостью к рифампицину Мутации, связанные с устойчивостью к изониазиду	Обнаружены мутации, ассоциированные с устойчивостью к низкому уровню Обнаружена мутация в промоторной области гена inhA
32m	АмплиТест МБТ-Резист-1 (GT 96) x 1	Мутации, связанные с устойчивостью к рифампицину Мутации, связанные с устойчивостью к изониазиду	Не обнаружено Не обнаружено
100m	АмплиТест МБТ-Резист-1 (GT 96) x 1	Мутации, связанные с устойчивостью к рифампицину Мутации, связанные с устойчивостью к изониазиду	Не обнаружено Не обнаружено
34m	АмплиТест МБТ-Резист-1 (GT 96) x 1	Мутации, связанные с устойчивостью к рифампицину Мутации, связанные с устойчивостью к изониазиду	Обнаружена мутация S531L в гене rpoB Обнаружена мутация в гене katG
62m	АмплиТест МБТ-Резист-1 (GT 96) x 1	Мутации, связанные с устойчивостью к рифампицину Мутации, связанные с устойчивостью к изониазиду	Обнаружена мутация S531L в гене rpoB Обнаружена мутация в гене katG
94m	АмплиТест МБТ-Резист-1 (GT 96) x 1	Мутации, связанные с устойчивостью к рифампицину	Не обнаружено

Рис. 1. Пример выдачи результатов при использовании специального ПО для автоматического учета результатов анализа с помощью набора реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-1»

Fig. 1. The example of output of results when using special software for automatic accounting of analysis results using the set of reagents of AmpliTest® MBT-Resist-1

Таблица 2. Обобщенные результаты тестирования нового набора реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-1» и набора сравнения «Амплитуб-МЛУ-РВ»

Table 2. Generalized test results of the new kit of reagents of AmpliTest® MBT-Resist-I and the comparison kit of Amplitub-MDR-RV

Вид исследуемого материала	Количество исследованных проб	ПТП	Результаты применения набора реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-1»	Результаты применения набора сравнения «Амплитуб-МЛУ-РВ»	
				Обнаружены мутации (положительные)	Не обнаружены мутации (отрицательные)
Проба ДНК, полученная экстракцией из образца биологического материала человека (мокроты, жБАЛ, биоптата (операционного материала))	200	Рифампицин	Обнаружены мутации (положительные)	99 ^a	0 ^c
			Не обнаружены мутации (отрицательные)	0 ^b	101 ^d
		Изониазид	Обнаружены мутации (положительные)	122	0
			Не обнаружены мутации (отрицательные)	0	78
Проба ДНК, полученная экстракцией из образца культуры микобактерий туберкулеза	100	Рифампицин	Обнаружены мутации (положительные)	50	0
			Не обнаружены мутации (отрицательные)	0	50
		Изониазид	Обнаружены мутации (положительные)	53	0
			Не обнаружены мутации (отрицательные)	0	47

Примечание: Положительное соответствие результатов = a / (a+b), отрицательное соответствие результатов = d / (c+d).

Результаты исследования

Клинические испытания нового набора реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-1» были проведены сотрудниками в отделе лабораторной диагностики ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» МЗ РФ в период с 22 июля по 26 октября 2021 г.

Обобщенные результаты тестирования нового НР «АмплиТест® МБТ-Резист-1» и набора сравнения «Амплитуб-МЛУ-РВ» представлены в табл. 2. Поскольку материалом для анализа с помощью нового набора реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-1» является уже выделенная ДНК (отобранная в определенной концентрации), а не нативный образец, положительное и отрицательное соответствие результатов двух наборов реагентов при выявлении мутаций, связанных с устойчивостью как к рифампицину, так и к изониазиду, было определено не для каждого вида биологического материала по отдельности, а суммарно для всех видов биологического материала человека и отдельно для культур МБТ, при этом для каждого ПТП отдельно, поэтому и обобщенные результаты тестирования представлены аналогичным образом (табл. 2).

Получено полное совпадение результатов при использовании нового НР и набора сравнения при анализе генетических маркеров резистентности МБТ как к рифампицину, так и к изониазиду, как для проб ДНК из биологического материала, так и проб ДНК культур МБТ. Дискордантных результатов не выявлено. Однако в двух пробах ДНК культур МБТ, наряду с мутацией Asp516Tyr в гене *rpoB*, с помощью нового НР «АмплиТест® МБТ-Резист-1» обнаружена еще одна мутация в области кодона 572 того же гена с помощью соответствующего зонда (комплементарного ДНК дикого типа), флуоресценция которого из-за на-

личия мутации не детектировалась по каналу HEX в ПЦР-смеси-FL МБТ-Р № 3. Однако эта мутация не входит в спектр мутаций, выявляемых набором сравнения, поэтому для подтверждения полученных результатов было проведено секвенирование по Сэнгеру фрагмента гена *rpoB* в этих двух пробах ДНК и так было доказано наличие мутации ATC→CTC (Ile→Leu) в кодоне 572 гена *rpoB* МБТ, которая не встречается в научной литературе. Вклад данной мутации в фенотипическую устойчивость МБТ к RIF в данном случае оценить однозначно не представляется возможным, поскольку мутация встретилась в пробах ДНК культур МБТ в сочетании со значимой мутацией в кодоне 516. Однако из результатов рентгеноструктурного анализа RRDR в комплексе с рифампицином известно, что аминокислота в позиции 572 РНК-полимеразы участвует в связывании рифампицина [5]. Кроме того, в Свазиленде (Южная Африка) были обнаружены фенотипически устойчивые к RIF штаммы МБТ, в которых была выявлена только одна мутация в гене *rpoB* – в кодоне 572 (кодон 491 в *M tuberculosis*) (Ile→Phe) [18]. В совокупности все эти данные позволяют предполагать, что и другие несинонимичные замены в кодоне 572 гена *rpoB* могут приводить к устойчивости МБТ к RIF вследствие иной конформации белка и ухудшения взаимодействия РНК-полимеразы с RIF.

На основе полученных данных были рассчитаны положительное и отрицательное соответствие результатов нового набора реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-1» относительно набора сравнения «Амплитуб-МЛУ-РВ» (ООО «Синтол» (табл. 3)). **Положительное соответствие результатов (ПЦР)** – доля образцов, содержащих ДНК МБТ, в которых с помощью нового НР обнаружены мутации, ассоциированные с устойчивостью МБТ к рифампицину или изониазиду, среди образцов с соответствующими мутациями, выявленными с помощью набора

Таблица 3. Итоговая таблица определения эффективности (положительного и отрицательного соответствия результатов) нового набора реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-1» выявления мутаций, ассоциированных с устойчивостью МБТ к рифампицину и изониазиду

Table 3. The final table for determining the effectiveness (positive and negative concordance of results) of the new kit of reagents of AmpliTest® MTB-Resist-1 for detecting mutations associated with MTB resistance to rifampicin and isoniazid

Вид исследуемого материала (общее количество исследованных образцов)	Выявление мутаций, связанных с устойчивостью	Положительное соответствие результатов, % (95% ДИ)	Отрицательное соответствие результатов, % (95% ДИ)
Проба ДНК, полученная экстракцией из образца биологического материала человека (мокроты, жБАЛ, биоптата (операционного материала)) (N=200)	к рифампицину	100 (96,34–100)	100 (96,41–100)
	к изониазиду	100 (97,02–100)	100 (95,38–100)
Проба ДНК, полученная экстракцией из образца культуры микобактерий туберкулеза (N=100)	к рифампицину	100 (92,89–100)	100 (92,89–100)
	к изониазиду	100 (93,28–100)	100 (92,45–100)

сравнения. **Отрицательное соответствие результатов (ОСР)** – доля образцов, содержащих ДНК МБТ, в которых с помощью нового НР не обнаружены мутации, ассоциированные с устойчивостью МБТ

Таблица 4. Спектр мутаций в генах *rpoB*, *katG* и промоторной области гена *inhA*, связанных с устойчивостью МБТ к рифампицину и изониазиду, в проанализированных образцах ДНК МБТ, полученных из биологического материала человека разного вида и культур МБТ

Table 4. The spectrum of mutations in the *rpoB*, *katG* genes and the promoter region of the *inhA* gene associated with MTB resistance to rifampicin and isoniazid in analyzed MTB DNA samples obtained from different human specimens and MTB cultures

ПТП	Мутация, связанная с устойчивостью МБТ к ПТП	Количество образцов			
		Вид исследуемого материала			
		ДНК МБТ из мокроты (n=100)	ДНК МБТ из БАЛ (n=50)	ДНК МБТ из биоптата (опер. материала) (n=50)	ДНК из культур МБТ (n=100)
Рифампицин	<i>rpoB</i> Ser531Leu	47	25	22	42
	<i>rpoB</i> His526Arg	1	0	0	0
	<i>rpoB</i> His526Tyr	0	0	1	0
	<i>rpoB</i> His526Leu	0	0	1	0
	<i>rpoB</i> His526Asn	0	0	0	3
	<i>rpoB</i> His526Asp	0	0	0	1
	<i>rpoB</i> Leu533Pro	2	0	0	0
	<i>rpoB</i> Asp516Tyr	0	0	0	2
	<i>rpoB</i> Asp516Tyr + Ile572Leu	0	0	0	2
	Всего образцов с мутацией	50	25	24	50
	Всего образцов без мутаций	50	25	26	50
Изониазид	<i>katG</i> Ser315Thr1	53	26	27	42
	<i>katG</i> Ser315Thr1 + <i>inhA</i> _p mut	5	3	2	10
	<i>inhA</i> _p mut	2	2	2	1
	Всего образцов с мутацией	60	31	31	53
	Всего образцов без мутаций	40	19	19	47

Примечание: «*inhA_p mut*» означает, что в образце ДНК МБТ присутствовала мутация в промоторной области гена *inhA*: C(-15)T или T(-8)A/C.

к рифампицину или изониазиду, среди образцов, не содержащих эти мутации, согласно результатам тестирования с помощью набора сравнения. В случае определения ПСР и ОСР выявления генетических маркеров резистентности МБТ к рифампицину подразумевается соответственно наличие или отсутствие мутации в гене *rpoB*. В случае определения ПСР выявления генетических маркеров резистентности МБТ к изониазиду подразумевается выявление мутаций в гене *katG* и (или) промоторе гена *inhA*. В случае определения ОСР для изониазида подразумевается отсутствие мутаций и в гене *katG*, и в промоторе гена *inhA*.

Таким образом, полученные показатели положительного и отрицательного соответствия результатов нового набора реагентов относительно набора сравнения при выявлении мутаций, связанных с устойчивостью МБТ как к рифампицину, так и к изониазиду, составили 100%, как для образцов ДНК МБТ из биологического материала, так и из культур МБТ.

Спектр выявленных мутаций, ассоциированных с устойчивостью МБТ к рифампицину и изониазиду, в исследованных образцах ДНК МБТ представлен в табл. 4.

Согласно таблице 4 при тестировании проб ДНК МБТ, полученных из всех типов исследуемых образцов, наиболее распространенной мутацией в гене *rpoB*, связанной с устойчивостью к рифампицину,

являлась мутация Ser531Leu, что соответствует литературным данным по РФ [2, 4, 14, 15, 19]. В единичных образцах ДНК МБТ встречались различные варианты различных мутаций в кодонах 526 и 516. Среди мутаций, ассоциированных с устойчивостью к изониазиду, в подавляющем большинстве образцов ДНК МБТ была выявлена мутация Ser315Thr1 в гене *katG* в сочетании с промоторной областью гена *inhA* без мутаций.

Заключение

Новый набор реагентов для выявления мутаций, связанных с лекарственной устойчивостью микобактерий туберкулеза к рифампицину и изониазиду методом полимеразной цепной реакции «АмплиТест® МБТ-Резист-1» производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, при проведении клинических испытаний показал высокую эффективность (положительное и отрицательное соответствие ре-

зультатов 100%) выявления генетических маркеров резистентности МБТ к RIF и INH в сравнении с набором реагентов «Амплитуб-МЛУ-РВ» при анализе 200 образцов ДНК из биологического материала разного вида и 100 культур МБТ.

Принцип действия, реализованный в новом наборе реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-1», позволяет выявлять широкий спектр целевых мутаций, ассоциированных с устойчивостью МБТ к рифампицину и изониазиду. Процедура анализа в формате одностадийной ПЦР позволяет сократить его длительность и трудоемкость, а также обеспечить высокий уровень безопасности в отношении контаминации продуктами амплификации.

Набор реагентов «АмплиТест® МБТ-Резист-1» зарегистрирован в РФ как медицинское изделие для диагностики *in vitro* (ПУ № РЗН 2022/16720) и может служить эффективным инструментом для выявления мутаций, связанных с устойчивостью микобактерий туберкулеза к рифампицину и изониазиду.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии у них конфликта интересов.
Conflict of interests. The authors declare there is no conflict of interest.

ЛИТЕРАТУРА

1. Клинические рекомендации «Туберкулез у взрослых» 2022 г. – М.: 2022. URL: <http://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/16> [Дата обращения 15.06.2023]
2. Манаenkova E. B., Savin A. A. Опыт применения тест-системы «ТБ-Биочип» в Тамбовской области // Клиническая лабораторная диагностика. – 2015. – № 2. – С. 59–62.
3. Нечаева О. Б. Эпидемическая ситуация при инфекционных социально-значимых заболеваниях в Российской Федерации в период пандемии COVID-19 (презентация от 04.09.2020) URL: <https://may2020.rofconf.ru/uploads/presentation/nechaeva-o-b-epidemicheskaya-situaciya-pri-infekcionnyh-socialno-znachimyh-zabolevaniyah-v-rossiyskoy-federacii-v-period-pandemii-covid-19.pdf> [Дата обращения 10.07.2023]
4. Afanašev M. V., Ikryannikova L. N., Il'ina E. N., Sidorenko S. V., Kuz'min A. V., Larionova E. E., Smirnova T. G., Chernousova L. N., Kamaev E. Yu., Skorniakov S. N., Kinsht V. N., Cherednichenko A. G., Govorun V. M. Molecular characteristics of rifampicin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Russian Federation // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2007. – Vol. 59. – P. 1057–1064.
5. Campbell E. A., Korzhveva N., Mustaev A., et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase // Cell. – 2001. – Vol. 104. – № 6. – P. 901–912.
6. Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance. Geneva: World Health Organization; 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
7. Chakravorty S., Simmons A. M., Rowneki M., Parmar H., Cao Y., Ryan J., Banada P. P., Deshpande S., Shenai S., Gall A., Glass J., Krieswirth B., Schumacher S. G., Nabeta P., Tukvadze N., Rodrigues C., Skrahina A., Tagliani E., Cirillo D. M., Davidow A., Denking C. M., Persing D., Kwiatkowski R., Jones M., Alland D. The new Xpert MTB/RIF Ultra: improving detection of *Mycobacterium tuberculosis* and resistance to rifampin in an assay suitable for point-of-care testing // mBio. – 2017. – № 8. – P. e00812-17.
8. Clopper-Pearson Confidence Interval; Clopper C., Pearson E. (1934). The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial // Biometrika. – Vol. 26. – № 4. – P. 404–413. doi:10.2307/2331986.
9. de Freitas F. A., Bernardo V., Gomgnimbou M. K., Sola C., Siqueira H. R., Pereira M. A., Fandinho F. C., Gomes H. M., Araújo M. E., Suffys P. N.,

REFERENCES

1. *Klinicheskie rekomendatsii Tuberkulez u vzroslykh*. [Clinical guidelines on tuberculosis in adults]. Moscow, 2022. Available: <http://cr.minzdrav.gov.ru/recomend/16> Accessed: June 15, 2023
2. Manaenkova E. V., Savin A. A. Experience in using the TB-Biochip test system in Tambov Oblast. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*, 2015, no. 2, pp. 59–62. (In Russ.)
3. Nechaeva O. B. *Epidemicheskaya situatsiya pri infektsionnykh sotsial'no-znachimyh zabolevaniyakh v Rossiyskoy Federatsii v period pandemii COVID-19*. [The epidemic situation of infectious socially important diseases in the Russian Federation during the COVID-19 pandemic]. (Presentation dated September 04, 2020) Available: <https://may2020.rofconf.ru/uploads/presentation/nechaeva-o-b-epidemicheskaya-situaciya-pri-infekcionnyh-socialno-znachimyh-zabolevaniyah-v-rossiyskoy-federacii-v-period-pandemii-covid-19.pdf> Accessed: July 10, 2023
4. Afanašev M. V., Ikryannikova L. N., Il'ina E. N., Sidorenko S. V., Kuz'min A. V., Larionova E. E., Smirnova T. G., Chernousova L. N., Kamaev E. Yu., Skorniakov S. N., Kinsht V. N., Cherednichenko A. G., Govorun V. M. Molecular characteristics of rifampicin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from the Russian Federation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2007, vol. 59, pp. 1057–1064.
5. Campbell E. A., Korzhveva N., Mustaev A. et al. Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell*, 2001, vol. 104, no. 6, pp. 901–912.
6. Catalogue of mutations in *Mycobacterium tuberculosis* complex and their association with drug resistance. Geneva, World Health Organization, 2021. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.
7. Chakravorty S., Simmons A. M., Rowneki M., Parmar H., Cao Y., Ryan J., Banada P. P., Deshpande S., Shenai S., Gall A., Glass J., Krieswirth B., Schumacher S. G., Nabeta P., Tukvadze N., Rodrigues C., Skrahina A., Tagliani E., Cirillo D. M., Davidow A., Denking C. M., Persing D., Kwiatkowski R., Jones M., Alland D. The new Xpert MTB/RIF Ultra: improving detection of *Mycobacterium tuberculosis* and resistance to rifampin in an assay suitable for point-of-care testing. *mBio*, 2017, no. 8, pp. e00812-17.
8. Clopper-Pearson Confidence Interval; Clopper C., Pearson E. (1934). The use of confidence or fiducial limits illustrated in the case of the binomial. *Biometrika*, vol. 26, no. 4, pp. 404–413. doi:10.2307/2331986.
9. de Freitas F.A., Bernardo V., Gomgnimbou M. K., Sola C., Siqueira H. R., Pereira M. A., Fandinho F. C., Gomes H. M., Araújo M. E., Suffys P. N.,

- Marques E. A., Albano R. M. Multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*: a retrospective katG and rpoB mutation profile analysis in isolates from a reference center in Brazil // *PLoS One*. – 2014. – Vol. 9. – № 8. – P. e104100.
10. El-Hajj H. H., Marras S. A., et al. Detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in a single tube with molecular beacons // *J. Clin. Microbiol.* – 2001. – Vol. 39. – № 11. – P. 4131–4137.
11. Global tuberculosis report 2020. Geneva: World Health Organization; 2020. – 208 p.
12. Herrera L., Jiménez S., Valverde A., García-Aranda M. A., Sáez-Nieto J. A. Molecular analysis of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Spain (1996–2001). Description of new mutations in the rpoB gene and review of the literature // *Int. J. Antimicrob. Agents*. – 2003. – Vol. 21. – № 5. – P. 403–408.
13. Hillemann D., Weizenegger M., Kubica T., Richter E., Niemann S. Use of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates // *J. Clin. Microbiol.* – 2005. – Vol. 43. – № 8. – P. 3699–3703.
14. Lipin M. Y., Stepanshina V. N., Shemyakin I. G., Shinnick T. M. Association of specific mutations in katG, rpoB, rpsL and rrs genes with spoligotypes of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Russia // *Clin. Microbiol. Infect.* – 2007. – Vol. 13. – № 6. – P. 620–626.
15. Mokrousov I., Filliol I., Legrand E., Sola C., Otten T., Vyshnevskaya E., Limeschenko E., Vyshnevskiy B., Narvskaya O., Rastogi N. Molecular characterization of multiple-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from northwestern Russia and analysis of rifampin resistance using RNA/RNA mismatch analysis as compared to the line probe assay and sequencing of the rpoB gene // *Res. Microbiol.* – 2002. – Vol. 153. – № 4. – P. 213–219.
16. Sajduda A., Brzostek A., Poplawska M., Augustynowicz-Kopec E., Zwolska Z., Niemann S., Dziadek J., Hillemann D. Molecular characterization of rifampin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Poland // *J. Clin. Microbiol.* – 2004. – Vol. 42, № 6. – P. 2425–2431.
17. Ramaswamy S. V., Reich R., Dou S.-J., Jasperse L., Pan X., Wanger A., et al. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2003. – Vol. 47. – P. 1241–1250.
18. Sanchez-Padilla E., Merker M., Jochims F., Dlamini T., et al. Detection of drug-resistant tuberculosis by Xpert MTB/RIF in Swaziland // *N. Engl. J. Med.* – 2015. – Vol. 372. – P. 1181–1182.
19. Toungoussova O. S., Sandven P., Mariandyshv A. O., Nizovtseva N. I., Bjune G., Caugant D. A. Spread of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype in the Archangel Oblast, Russia // *J. Clin. Microbiol.* – 2002. – Vol. 40. – № 6. – P. 1930–1937.
20. Zhao L. L., Chen Y., Liu H. C. etc. Molecular characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2014. – Vol. 58. – № 4. – P. 1997–2005.
- Marques E. A., Albano R. M. Multidrug resistant *Mycobacterium tuberculosis*: a retrospective katG and rpoB mutation profile analysis in isolates from a reference center in Brazil. *PLoS One*, 2014, vol. 9, no. 8, pp. e104100.
10. El-Hajj H. H., Marras S. A. et al. Detection of rifampin resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in a single tube with molecular beacons. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, vol. 39, no. 11, pp. 4131–4137.
11. Global tuberculosis report 2020. Geneva, World Health Organization, 2020. 208 p.
12. Herrera L., Jiménez S., Valverde A., García-Aranda M. A., Sáez-Nieto J. A. Molecular analysis of rifampicin-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolated in Spain (1996–2001). Description of new mutations in the rpoB gene and review of the literature. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2003, vol. 21, no. 5, pp. 403–408.
13. Hillemann D., Weizenegger M., Kubica T., Richter E., Niemann S. Use of the genotype MTBDR assay for rapid detection of rifampin and isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis* complex isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, vol. 43, no. 8, pp. 3699–3703.
14. Lipin M. Y., Stepanshina V. N., Shemyakin I. G., Shinnick T. M. Association of specific mutations in katG, rpoB, rpsL and rrs genes with spoligotypes of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Russia. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2007, vol. 13, no. 6, pp. 620–626.
15. Mokrousov I., Filliol I., Legrand E., Sola C., Otten T., Vyshnevskaya E., Limeschenko E., Vyshnevskiy B., Narvskaya O., Rastogi N. Molecular characterization of multiple-drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from northwestern Russia and analysis of rifampin resistance using RNA/RNA mismatch analysis as compared to the line probe assay and sequencing of the rpoB gene. *Res. Microbiol.*, 2002, vol. 153, no. 4, pp. 213–219.
16. Sajduda A., Brzostek A., Poplawska M., Augustynowicz-Kopec E., Zwolska Z., Niemann S., Dziadek J., Hillemann D. Molecular characterization of rifampin- and isoniazid-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains isolated in Poland. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, vol. 42, no. 6, pp. 2425–2431.
17. Ramaswamy S. V., Reich R., Dou S.-J., Jasperse L., Pan X., Wanger A. et al. Single nucleotide polymorphisms in genes associated with isoniazid resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003, vol. 47, pp. 1241–1250.
18. Sanchez-Padilla E., Merker M., Jochims F., Dlamini T. et al. Detection of drug-resistant tuberculosis by Xpert MTB/RIF in Swaziland. *N. Engl. J. Med.*, 2015, vol. 372, pp. 1181–1182.
19. Toungoussova O. S., Sandven P., Mariandyshv A. O., Nizovtseva N. I., Bjune G., Caugant D. A. Spread of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains of the Beijing genotype in the Archangel Oblast, Russia. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, vol. 40, no. 6, pp. 1930–1937.
20. Zhao L. L., Chen Y., Liu H. C. etc. Molecular characterization of multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates from China. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2014, vol. 58, no. 4, pp. 1997–2005.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ:

ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России
119121, Россия, г. Москва, ул. Погодинская, д. 10, стр. 1
Тел.: +7 (495) 540-61-75, доб. 3032

Миколович Юлия Львовна

Кандидат химических наук, научный сотрудник
лаборатории разработки новых методов молекулярной
диагностики заболеваний человека
E-mail: YuMikulovich@cspfmbaru

Савочкина Юлия Анатольевна

Кандидат биологических наук, ведущий научный
сотрудник лаборатории разработки новых методов
молекулярной диагностики заболеваний человека
E-mail: YSavochkina@cspfmbaru

INFORMATION ABOUT AUTHORS:

Center for Strategic Planning and Management
of Biomedical Health Risks, Russian Federal Medical
Biological Agency
10, Bd. 1, Pogodinskaya St., Russia Moscow, 119121
Phone: +7 (495) 540-61-75, ext. 3032

Yulia L. Mikulovich

Candidate of Chemical Sciences, Researcher,
Laboratory for Development of New Methods
for Molecular Diagnosis of Human Diseases
Email: YuMikulovich@cspfmbaru

Yulia A. Savochkina

Candidate of Biological Sciences, Leading Researcher,
Laboratory for Development of New Methods
for Molecular Diagnosis of Human Diseases
Email: YSavochkina@cspfmbaru

Зайцева Анастасия Игоревна

Лаборант-исследователь лаборатории разработки
новых методов молекулярной диагностики
заболеваний человека
E-mail: AZaytseva@cspfmmba.ru

Шипулин Герман Александрович

Кандидат медицинских наук,
директор Центра постгеномных технологий
Тел.: +7 (495) 540-61-77, доб. 1019
E-mail: Shipulin@cspfmmba.ru

ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский
центр фтизиопульмонологии и инфекционных
заболеваний» МЗ РФ
127473, Россия, г. Москва, ул. Достоевского, д. 4, корп. 2

Панова Анна Евгеньевна

Кандидат медицинских наук, заведующая лабораторией
микробиологии, вирусологии и молекулярно-биологических
методов исследования
Тел.: +7 (495) 631-15-15, доб. 4001
E-mail: PanovaAE@nmrc.ru

Винокуров Анатолий Сергеевич

Младший научный сотрудник лаборатории микробиологии,
вирусологии и молекулярно-биологических методов
исследования
Тел.: +7 (495) 631-15-15, доб. 4021
E-mail: VinokurovAS@nmrc.ru

Anastasia I. Zaytseva

Laboratory Researcher, Laboratory for Development
of New Methods for Molecular Diagnosis
of Human Diseases
Email: AZaytseva@cspfmmba.ru

German A. Shipulin

Candidate of Medical Sciences, Director of Center
for Postgenomic Technologies
Phone: +7 (495) 540-61-77, ext. 1019
Email: Shipulin@cspfmmba.ru

National Medical Research Center
of Phthisiopulmonology and Infectious Diseases,
Russian Ministry of Health
Build. 2, 4, Dostoevskiy St., Moscow, Russia, 127473

Anna E. Panova

Candidate of Medical Sciences, Head of Laboratory
of Microbiology, Virology and Molecular Biological
Research Methods
Phone: +7 (495) 631-15-15, ext. 4001
Email: PanovaAE@nmrc.ru

Anatoliy S. Vinokurov

Junior Researcher of Laboratory
of Microbiology, Virology and Molecular Biological
Research Methods
Phone: +7 (495) 631-15-15, ext. 4021
Email: VinokurovAS@nmrc.ru

Поступила 20.02.2023

Submitted as of 20.02.2023