



## ТБ-ИЗАТЕСТ: СПОСОБ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНОЙ ДИАГНОСТИКИ *Mycobacterium tuberculosis* МЕТОДОМ LAMP

© 2023 г. Ф. В. Ширшиков\*, \*\*, #, Ю. А. Беспярых\*, \*\*

\*ФГБУ “Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина”  
ФМБА России, Россия, 119435 Москва, ул. Малая Пироговская, 1А

\*\*ФГБОУ ВО “Российский химико-технологический университет имени Д.И. Менделеева”,  
Россия, 125047 Москва, Миусская пл., 9

Поступила в редакцию 21.02.2023 г.

После доработки 10.03.2023 г.

Принята к публикации 11.03.2023 г.

Чихотка, белая чума, туберкулез... Лишь относительно недавно это заболевание перестало быть абсолютно смертельным приговором для инфицированных людей, однако проблемы распространения и диагностики этого заболевания по-прежнему актуальны. В данной работе представлены результаты разработки новой тест-системы ТБ-ИЗАТЕСТ для дифференциальной диагностики вида *Mycobacterium tuberculosis* от нетуберкулезных микобактерий по видоспецифичному гену *rv2341* с использованием метода петлевой изотермической амплификации (LAMP). Тест-система применима для количественного анализа целевой геномной ДНК и позволяет выявлять десятикратные различия в концентрации. Впервые приводятся результаты оптимизации амплификации с помощью двухстадийного протокола на основе метода ортогональных матриц Тагути. Предложена теоретическая интерпретация высоких значений эффективности амплификации, наблюдаемых в реакции LAMP. Предел детекции разработанной тест-системы составляет 40 геном-эквивалентов на реакцию, а стадия амплификации требует 15 мин. По совокупности характеристик тест-система ТБ-ИЗАТЕСТ превосходит все известные способы идентификации *M. tuberculosis* методом LAMP.

**Ключевые слова:** изотермическая амплификация, микобактерии, туберкулез, *rv2341*

**DOI:** 10.31857/S0132342323060131, **EDN:** EYSSZB

### ВВЕДЕНИЕ

Туберкулез (ТБ) – опасное инфекционное заболевание человека, поэтому создание новых инструментов для его эпидемиологического контроля по-прежнему не теряет своей актуальности [1, 2]. В последние годы ТБ представляет особую опасность для пациентов, инфицированных вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ) и коронавирусом SARS-CoV-2, что обуславливает необходимость быстрых и адаптированных к массовому скринингу способов идентификации вариантов *Mycobacterium tuberculosis* (МТБ), представляющих опасность для человека. В отчете Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) за 2021 г. представлены данные об увеличении смертности от ТБ в связи с пандемией COVID-19

до показателей 2017 г. [3]. ТБ стал причиной смерти 1.6 млн человек в 2021 г., включая 187 тыс. ВИЧ-инфицированных пациентов [4]. Дальнейшее распространение ТБ зависит от эффективности мер, направленных на повышение качества и доступности его диагностики.

Бактерии вида *M. tuberculosis* – яркий пример генетически мономорфных патогенов с высоким уровнем консервативности генома [5], что делает их удобным объектом при разработке новых способов диагностики. Необходимо отметить, что только к 2018 г. Международным комитетом по систематике прокариот было принято решение о таксономическом статусе микобактерий, вызывающих ТБ [6]. Многие разновидности микобактерий, известные ранее в качестве отдельных видов и объединяемые термином “комплекс *M. tuberculosis*”, теперь предлагается рассматривать как различные варианты внутри единого типового вида *M. tuberculosis*. Обновление таксономических данных [7, 8] значительно облегчает проведение исследований МТБ и нетуберкулезных микобактерий (НТМ) [9], что особенно актуально в

Сокращения: LAMP – петлевая изотермическая амплификация; МГЭ – мобильный генетический элемент; МТБ – патогенные для человека варианты вида *Mycobacterium tuberculosis*; НТМ – нетуберкулезные микобактерии; ТБ – туберкулез; ТБ-ИЗАТЕСТ – тест на основе изотермической амплификации для диагностики ТБ.

# Автор для связи: (тел.: +7 (906) 114-70-00; эл. почта: shrshkv@ya.ru).

сравнительной геномике микобактерий при поиске уникальных мишеней для диагностики [10–12].

На идентификацию микобактерий с использованием культуральных методов требуется несколько недель, поэтому в клинической практике часто востребованы молекулярно-генетические подходы, позволяющие гораздо быстрее выявлять возбудителя и определять спектр его лекарственной устойчивости. Современные ускоренные способы диагностики МТБ реализованы с помощью различных модификаций метода ПЦР. Широко внедрены тест-системы Xpert MTB/RIF и Xpert MTB/RIF Ultra (Cepheid, США), одобренные ВОЗ наряду с тест-системами других производителей [13, 14]. В России широкое практическое применение получили тест-системы ТБ-ТЕСТ и СПОЛИГО-БИОЧИП (Биочип-ИМБ, Россия) на основе агарозных микрочипов [15].

Перспективной платформой для создания быстрых способов диагностики микобактериальной инфекции стал метод петлевой изотермической амплификации (от англ. loop-mediated isothermal amplification, LAMP) [16, 17]. Механизм реакции LAMP предполагает проведение амплификации ДНК при постоянной температуре ~65°C с помощью ДНК-полимеразы, обладающей цепь-вытесняющей активностью [18, 19], а также “кóровых” (внутренних и внешних) и петлевых праймеров для ускорения реакции [20]. На основе метода LAMP его авторами разработана новая автоматизированная система “Simpnova” для быстрой пробоподготовки и мультиплексной детекции патогенов [21], позволяющая проводить стадию амплификации за 15–20 мин в микрочипах особой архитектуры. Другие особенности метода LAMP подробно рассмотрены в обзорах [22, 23].

Первые способы идентификации *M. tuberculosis* методом LAMP были разработаны вскоре после появления самого метода [24, 25]. Имеются сведения [26], что именно эти ранние работы легли в основу тест-системы Loopamp MTBC Detection Kit (Eiken Chemical, Япония), ставшей единственным набором реагентов для качественного определения МТБ методом LAMP, рассматриваемым ВОЗ в качестве альтернативы диагностике легочной формы ТБ по микроскопии мазка мокроты [27]. В данной тест-системе используются праймеры для выявления гена *gyrB* (*rv0005*) и мобильного элемента *IS6110*, а на стадию амплификации требуется 40 мин [28]. При этом некоторые эксперты ВОЗ по проблемам ТБ заявляли о необходимости проведения анализа менее чем за 20 мин [29].

Большинство существующих тест-систем для идентификации *M. tuberculosis* методом LAMP основано на амплификации фрагментов генов домашнего хозяйства и/или последовательности мобильного генетического элемента (МГЭ)

*IS6110* [30–34]. Тем не менее уже ~20 лет назад на территории стран с высоким бременем ТБ, таких как Вьетнам, Индия, Ирак и Либерия, стали обнаруживаться штаммы *M. tuberculosis*, не имеющие ни одной копии *IS6110* [35]. Долгое время именно последовательность *IS6110* считалась наиболее подходящей мишенью для дифференциальной диагностики МТБ и применяется до сих пор [36, 37]. Это связано с тем, что в геноме микобактерий последовательности *IS1081* и *IS6110* могут присутствовать в нескольких копиях, поэтому их используют для увеличения аналитической и клинической чувствительности тест-систем [38]. На свойстве многокопийности этих МГЭ основан принцип работы тест-систем, одобренных ВОЗ [14], однако в них МГЭ используются только в качестве дополнительных мишеней.

Результаты полногеномного секвенирования микобактерий различных видов способствовали поиску новых молекулярно-генетических маркеров *M. tuberculosis*, не встречающихся у представителей НТМ [39]. Только к 2020 г. удалось провести широкомасштабное исследование по сравнительной геномике *M. tuberculosis* (>4700 геномов) и множества представителей НТМ (>4200 геномов), благодаря которому было обнаружено 30 перспективных генов-мишеней с высокой консервативностью [40]. Более того, авторами данной работы было впервые показано, что последовательности *IS1081*, *IS6110* и ряд других генов-мишеней характерны для многих представителей НТМ. Таким образом, была показана их непригодность в качестве единственных мишеней для дифференциальной диагностики МТБ. Следует подчеркнуть, что применение МГЭ в качестве основных мишеней, безусловно, имеет свои исторические предпосылки, но в связи с повышением доступности полногеномного секвенирования стремительно теряет актуальность, поскольку неизбежно снижает аналитическую и клиническую специфичность тест-систем.

Цель настоящей работы заключалась в разработке быстрой и чувствительной тест-системы ТБ-ИЗАТЕСТ на основе метода LAMP для количественной диагностики бактерий вида *M. tuberculosis*. В ходе работы проводился скрининг однокопийных мишеней в геноме микобактерий целевого вида, нуклеотидная последовательность и GC-состав которых совместимы с требованиями к дизайну праймеров для изотермической амплификации. Особое внимание уделялось оптимизации условий проведения реакции, подбору концентраций основных компонентов реакционной смеси, а также измерению аналитических характеристик тест-системы.

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров из набора TB2341

| Праймер | Нуклеотидная последовательность (5' → 3') |
|---------|-------------------------------------------|
| FIP     | TAGCTGCCGGTCCAGGTCTGGTGGTGCGGGCCACTGA     |
| BIP     | CAACCCAGTCCGGTGGTGTGCTTCGTCGACCGTGAACC    |
| F3      | ACCGGACCCCTCGTGT                          |
| B3      | GATAGACCTGATCGACGCTG                      |
| LF      | ACCCGTTGCCGTTGATC                         |
| LB      | GTGGCACCTGCAACTTCC                        |

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Выбор гена-мишени.** При поиске мишени в геноме *M. tuberculosis* было решено отказаться от использования МГЭ и провести *in silico* валидацию 30 потенциальных генов-мишеней [40] по критерию видоспецифичности не только внутри рода *Mycobacterium*, но и за его пределами:

1) на первом этапе из исходного перечня были исключены гены ( $n = 7$ ), не удовлетворяющие критерию видоспецифичности за пределами рода *Mycobacterium*: *rv0033*, *rv0034*, *rv0035*, *rv0698*, *rv1046c*, *rv1669* и *rv1725c*;

2) среди оставшихся нуклеотидных последовательностей ( $n = 23$ ) выявлены уникальные гены ( $n = 11$ ), не имеющие абсолютно никаких гомологичных участков в геномах представителей НТМ и/или других видов бактерий: *rv1374c*, *rv2142c*, *rv2269c*, *rv2307a*, *rv2309a*, *rv2336*, *rv2341*, *rv2662*, *rv2929*, *rv2960c* и *rv3566a*;

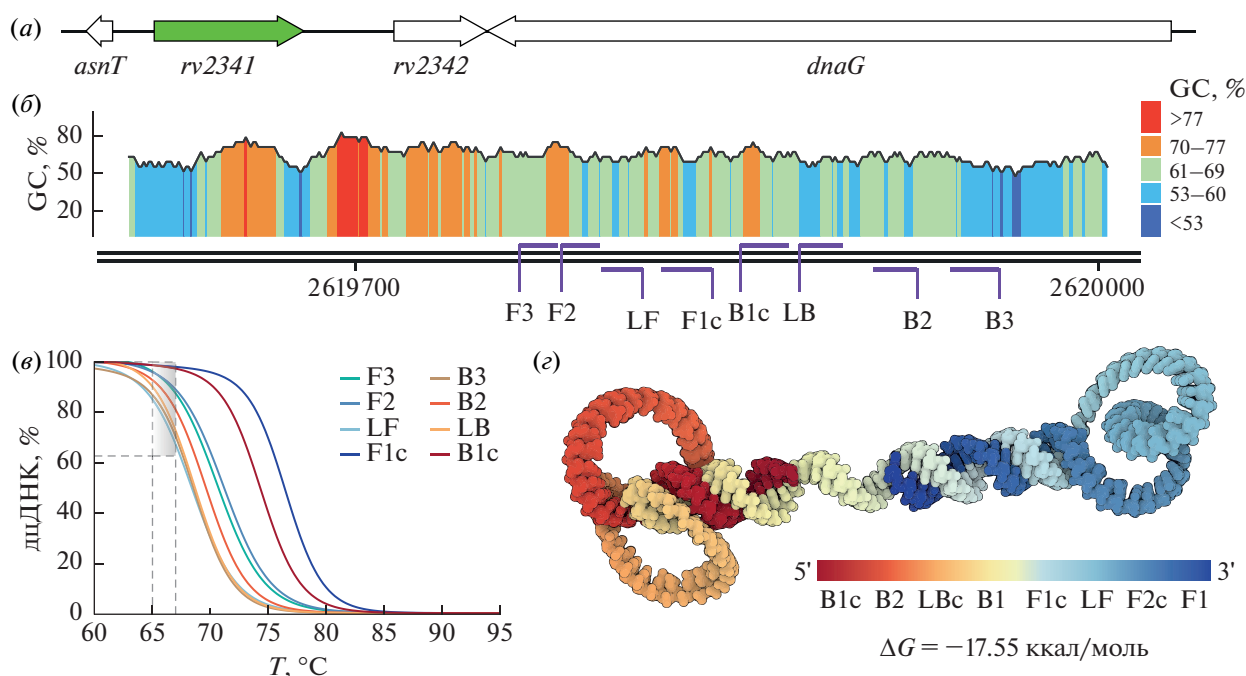
3) совокупность генов, исключенных на шаге 2, применима в качестве мишеней, если при дизайне праймеров избегать гомологичных участков с помощью программы MorphoCatcher [41], – этот список генов ( $n = 12$ ) включает *rv0112*, *rv0610c*, *rv1049*, *rv1499*, *rv2003c*, *rv2432c*, *rv2491*, *rv2492*, *rv2767c*, *rv3322c*, *rv3472* и *rv3770c*.

Анализ совместной экспрессии уникальных генов-мишеней оказался применим не только при оценке видоспецифичности предложенных ранее мишеней, но и при поиске новых. Так, ген *rv2341* функционально ассоциирован с геном *rv2395b* (*aprB*), от которого зависит его экспрессия [42]. Детальный анализ оперона *aprABC*, играющего ключевую роль на первых стадиях взаимодействия микобактерий с макрофагами, показал, что значительная часть нуклеотидной последовательности гена *rv2395a* (*aprA*) пригодна для дифференциальной диагностики МТБ. Кроме того, в ассоциации с геном *rv2142c*, кодирующим микобактериальный токсин *ParE2*, обнаружен другой уникальный ген *rv2142a* соответствующего анти-токсина *ParD2* [43]. Таким образом, перечень видоспецифичных для *M. tuberculosis* мишеней был проанализирован более детально, уточнен и дополнен тремя новыми генами, важными для физиологии микобактерий.

Ген *rv2341* использовался ранее при создании ПЦР-праймеров [40], но не применялся для тест-систем на основе LAMP, поэтому он был выбран в качестве мишени в данной работе (рис. 1а, 1б). При выборе гена принимали во внимание консервативность его нуклеотидной последовательности среди штаммов *M. tuberculosis* [40]. Важная роль *rv2341* в физиологии микобактерий и его локализация вблизи гена *Asn*-тРНК (*asnT*), предполагающие низкую вероятность делеции такого локуса, а также высокая аналитическая специфичность упомянутых выше ПЦР-праймеров служили дополнительными факторами в пользу выбора этой мишени.

**Дизайн праймеров.** По результатам *in silico* анализа ген *rv2341* и соответствующий набор праймеров TB2341 (табл. 1) удовлетворяли условиям реакции LAMP. Данные праймеры слабо подвержены образованию нежелательных димеров, имеют однородную температуру отжига (рис. 1в), гибридизуются с участками гена-мишени без стабильных вторичных структур (рис. 2). При этом стартовые гантелеобразные ампликоны в тех же условиях формируют более стабильные одноцепочечные петли, что следует из меньшего значения свободной энергии Гиббса ампликона (рис. 1г) в сравнении с термодинамической стабильностью шпилек в составе гена-мишени.

**Оптимизация амплификации.** Для подбора условий проведения реакции LAMP применяли двухстадийный протокол оптимизации на основе метода ортогональных матриц Тагути с последующим дисперсионным анализом экспериментальных данных. Ранее метод Тагути уже использовался для оптимизации реакций LAMP [44, 45], однако в представленной версии протокола оценивается влияние лишь трех факторов: температуры инкубации, концентрации ионов магния и дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP). Кроме того, длительность стадии амплификации определялась только после измерения предела детекции. Время выхода на плато сигналов амплификации с наименьшей концентрацией ДНК-матрицы, сохраняющих периодичность появления, считали достаточным для достижения максимальной чувствительности.



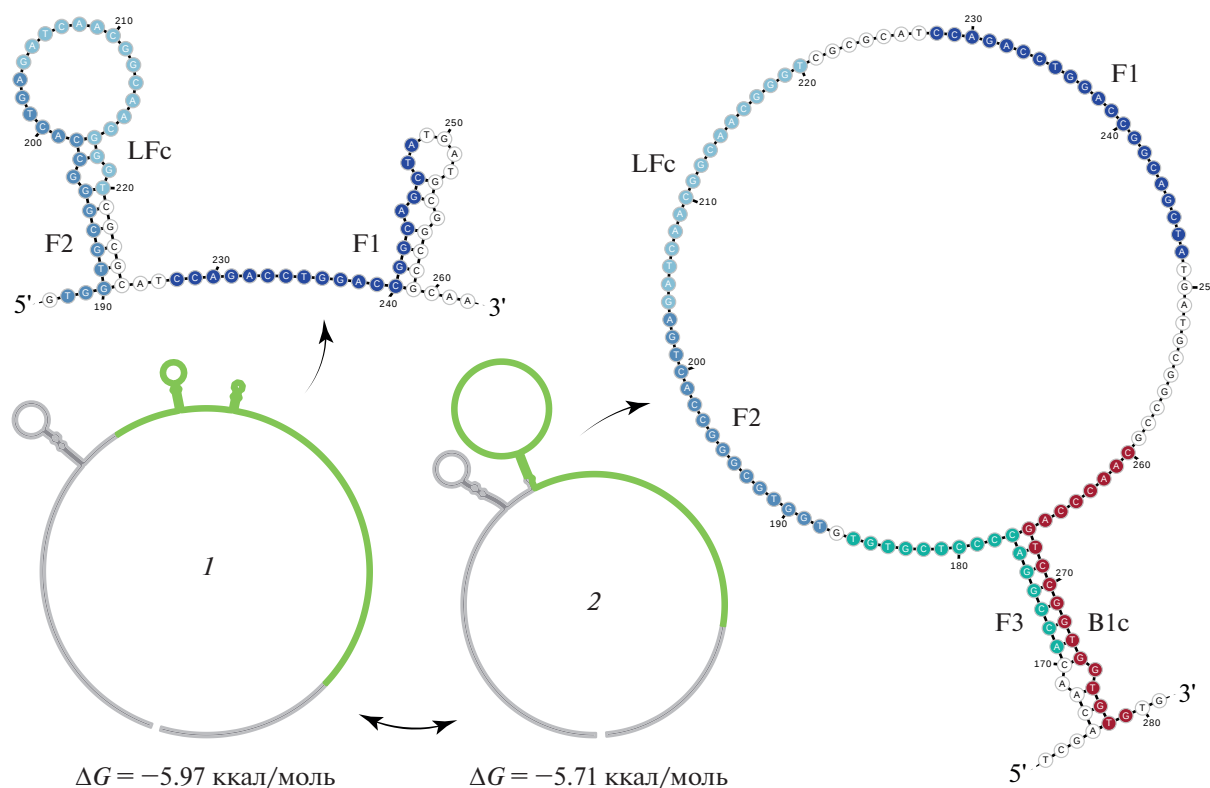
**Рис. 1.** Характеристика гена-мишени *rv2341* и набора праймеров TB2341. (a) — Карта расположения мишени в геноме типового штамма *M. tuberculosis* H37Rv; (б) — диаграмма распределения GC-состава нуклеотидной последовательности *rv2341*. Схематично показано расположение сайтов отжига праймеров; (в) — моделирование кривых плавления двуцепочечной ДНК (дцДНК) в сайтах отжига праймеров при различных температурах. Пунктиром выделен исследованный температурный диапазон активности *Bst*-ДНК-полимеразы (65–67°C), демонстрирующий динамику и синхронность гибридизации праймеров с геном-мишенью. Сайты отжига F1c/B1c обладают повышенной  $T_{пл}$ , необходимой для стабильности одноцепочечных петель стартового ампликона; (г) — молекулярная модель стартового ампликона, теоретически существующая при оптимальных условиях реакции LAMP. Одноцепочечные петли позволяют праймерам отжигаться при изотермических условиях без необходимости термической денатурации ДНК. Цветовым градиентом показано расположение различных сайтов отжига и их комплементарных участков. Длина стартового ампликона — 185 нт, GC-состав — 65%.

С точки зрения скорости реакции при различных значениях температуры инкубации оптимальным сочетанием финальных концентраций ионов магния и dNTP стало 7 и 1.4 mM соответственно, а наиболее ранние сигналы амплификации получены при 67°C (рис. 3 и 4). Процентный вклад температуры (Т), ионов магния (М) и dNTP (N) по результатам дисперсионного анализа данных составил 3.8, 47.0 и 40.4% соответственно. Предлагаемый способ оптимизации реакции получил название TMN-протокол. Он может найти применение в разработке мультиплексных способов детекции LAMP, когда для одинаковой температуры инкубации необходимо определить оптимальные значения концентраций компонентов различных реакционных смесей.

Установленные оптимальные значения основных факторов использовали для определения достаточной концентрации каждого из двух петлевых праймеров. Ускорение реакции наблюдалось при различных концентрациях петлевых праймеров (рис. 5a), однако для дальнейших экспериментов была выбрана концентрация 0.8 мкМ. Выявленный синергический эффект при добавле-

нии двух петлевых праймеров сопровождался максимальным ускорением реакции (рис. 5б). Все эксперименты с петлевыми праймерами завершали анализом кривых плавления амплификата и контролем продуктов неспецифической фоновой амплификации, что особенно важно для отрицательных контролей без добавления ДНК-матрицы. При данных условиях амплификации на кривых плавления минорные пики не наблюдались.

По итогам оптимизации для набора праймеров TB2341 было получено относительно высокое значение температуры инкубации реакции LAMP, составившее 67°C. По всей видимости, подобные значения температуры инкубации и температуры плавления ( $T_{пл}$ ) финальных продуктов амплификации (~94°C) — возможное следствие высокого GC-состава фрагмента мишени, фланкируемого внешними праймерами (64%). При этом GC-состав стартового ампликона и всей последовательности *rv2341* составляет 65%, а полного генома штамма *M. tuberculosis* H37Rv — 66%. Интересно, что идентичная температура инкубации используется в тест-системе Loopamp



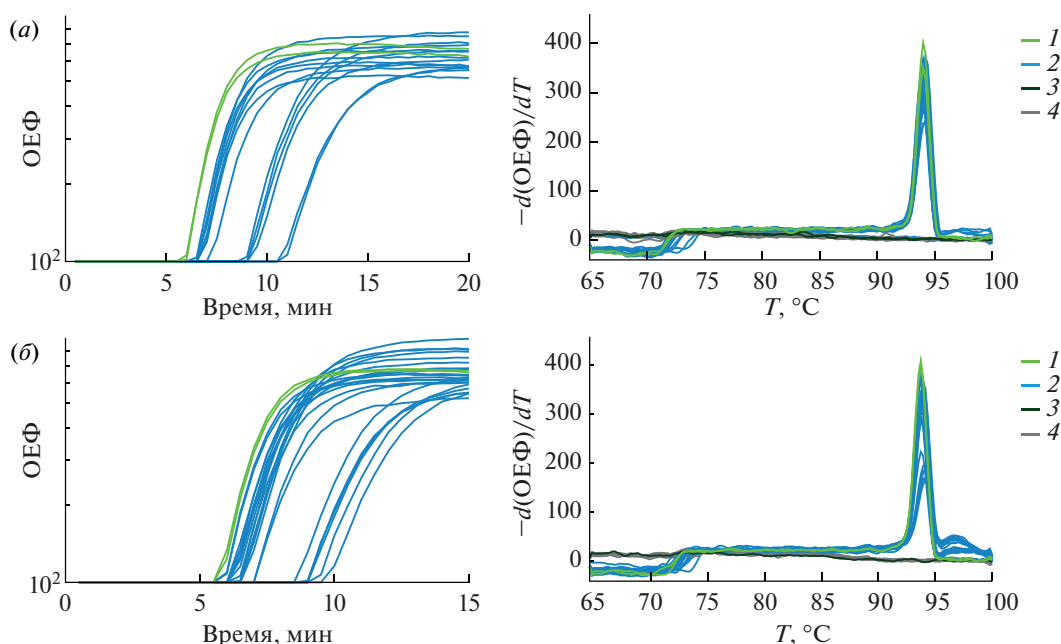
**Рис. 2.** Вторичная структура и термодинамика шпилек, образуемых нуклеотидной последовательностью гена *rv2341*: 1, 2 — две теоретически предсказанные структуры последовательности мишени, существующие при оптимальных условиях реакции LAMP. Зеленым цветом показан участок гена, фланкированный внешними праймерами. Рассчитанные значения свободной энергии Гиббса указывают на то, что обе структуры равновесны и не должны препятствовать отжигу праймеров. На увеличенных изображениях отмечены все сайты отжига, оказавшиеся в структуре шпилек.

MTBC Detection Kit [28] и более новых способах детекции МТБ на основе системы CRISPR-Cas [46], что удобно для сравнительных испытаний.

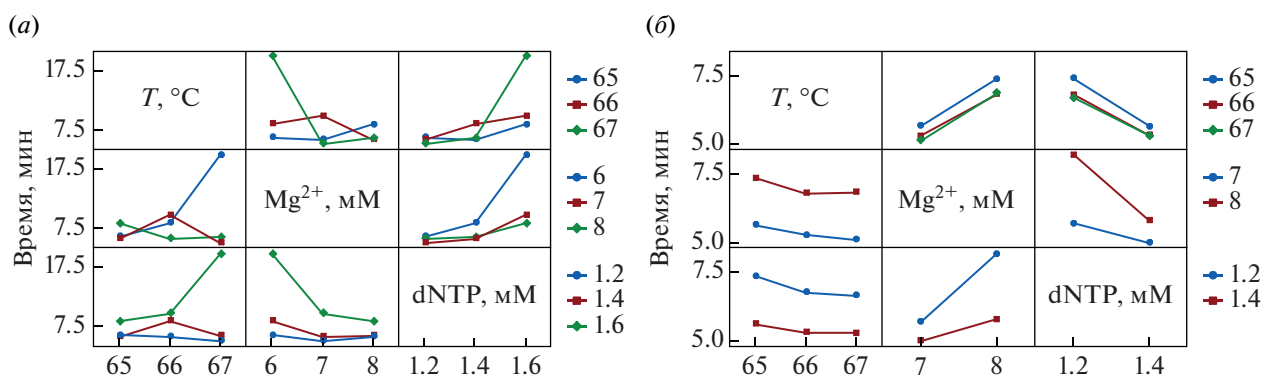
**Аналитическая чувствительность.** При оптимальных условиях реакции с помощью серии последовательных десятикратных разведений геномной ДНК *M. tuberculosis* установлен предел детекции, составивший 40 копий геномной ДНК на реакцию (рис. 6а, 6в). При высоких концентрациях матрицы наблюдалась высокая воспроизводимость сигналов амплификации, которая снизилась только на пределе детекции ( $SD = 0.60$ ;  $CV = 5.91\%$ ). Специфичность реакции LAMP сохранялась на протяжении всего линейного диапазона концентраций геномной ДНК, на что указывает равномерность  $T_{пл}$  финального амплификата  $\sim 94^\circ\text{C}$  (рис. 6б). Молекулярную массу продуктов амплификации анализировали с помощью капиллярного электрофореза (рис. 6г) и достаточно точно предсказывали существующей математической моделью [47]. Максимальное отличие между экспериментально измеренной массой и рассчитанной составило всего 5 п.н., что указывает на высокую специфичность реакции.

**Эффективность амплификации.** Для набора праймеров TB2341 эффективность амплификации в оптимальных условиях составила 152.4% ( $R^2 = 0.977$ ) (рис. 6в). На момент подготовки данной работы в научной литературе не был описан допустимый диапазон значений эффективности амплификации LAMP, в отличие от ПЦР, для которой некоторые практические руководства указывают диапазон 90–105% [48]. При интерпретации полученного значения эффективности применялись стандартные для метода ПЦР математические формулы [49]. Поправки были сделаны лишь на способ детекции сигнала амплификации. В частности, в ходе реакции LAMP считывание сигнала флуоресценции происходило в дискретные моменты времени, не привязанные к конкретным этапам механизма реакции, а именно в каждом “цикле детекции” ( $C_d$ , по аналогии с терминологией ПЦР) продолжительностью 30 с.

Для набора праймеров TB2341 установлены следующие показатели эффективности реакции:  $E = 2.5$  и  $s = -2.487$ . После поправки на продолжительность  $C_d$  в 30 с можно говорить о десятикратном приросте количества ампликонов в данной реакции LAMP примерно за минуту (1.244 мин), что



**Рис. 3.** Кривые амплификации в логарифмическом масштабе и кривые плавления финального ампликата на разных этапах оптимизации амплификации LAMP по методу Тагути на основе праймеров ТВ2341. (а) – Первая стадия оптимизации уровней факторов: температура инкубации (65, 66, 67°C), концентрация ионов магния (6, 7, 8 мМ), концентрация dNTP (1.2, 1.4, 1.6 мМ); (б) – вторая стадия оптимизации: температура инкубации (65, 66, 67°C), концентрация ионов магния (7, 8 мМ), концентрация dNTP (1.2, 1.4 мМ). ОЕФ – относительные единицы флуоресценции; 1 – сигналы реакций с ДНК-матрицей на основе плазмиды рНД2341, получаемые в оптимальных условиях; 2 – сигналы реакций в неоптимальных условиях, которые приводят к снижению скорости и появлению минорных пиков плавления неспецифичных продуктов фоновой амплификации; 3 – сигналы отрицательных контролей без добавления ДНК-матрицы (ОК) в оптимальных условиях; 4 – сигналы ОК в неоптимальных условиях. Все реакции ОК вне зависимости от условий амплификации протекали без ложноположительных сигналов.

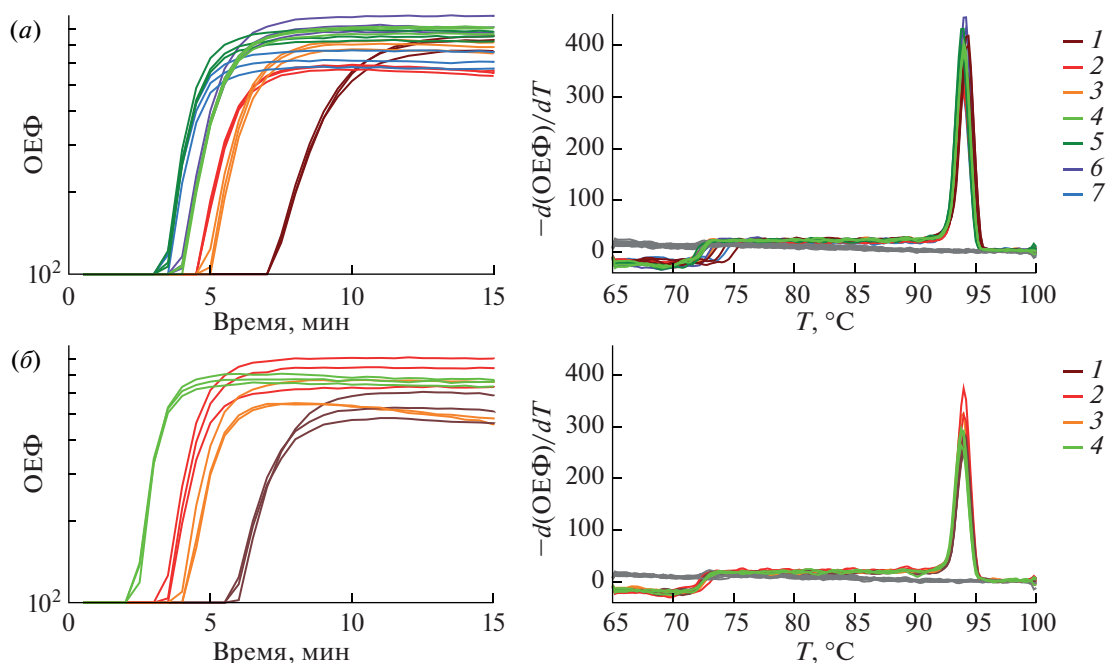


**Рис. 4.** Результаты дисперсионного анализа экспериментальных данных по оптимизации амплификации LAMP на основе метода Тагути. Представлены графики взаимодействий всех факторов различных уровней на основе средних значений времени появления сигналов амплификации. Уровни факторов, способствовавшие наиболее быстрым и специфичным сигналам амплификации по результатам первой стадии оптимизации (а), использовали для более точного сравнительного анализа на второй стадии (б). Соответствующие симметричные графики были получены и для значений показателя отношения сигнал/шум по модели “чем меньше, тем лучше”. Итоговый результат оптимизации амплификации предписывает проведение реакции LAMP при 67°C, концентрации ионов магния 7 мМ, концентрации dNTP 1.4 мМ.

объясняется неограниченным количеством новых актов отжига праймеров и элонгации цепей ДНК вплоть до наступления фазы плато.

В отличие от ампликонов ПЦР, которые в одноцепочечном состоянии содержат только один

сайт отжига для праймера, ампликоны LAMP содержат минимум два сайта отжига для внутреннего и петлевого праймеров – по одному сайту в каждой петле стартовой структуры [16, 20]. Кроме того, в стартовых ампликонах происходит элон-



**Рис. 5.** Влияние петлевых праймеров на скорость и специфичность реакции LAMP. (а) — Кривые амплификации и плавления финального амплификата при добавлении различных концентраций каждого петлевого праймера: 1 — коровые праймеры (СР); 2 — СР с добавлением прямого петлевого праймера (LF) в концентрации 0.4 мкМ; 3 — СР + обратный петлевой праймер (LB) (0.4 мкМ); 4 — СР + LF (0.8 мкМ); 5 — СР + LB (0.8 мкМ); 6 — СР + LF (1.2 мкМ); 7 — СР + LB (1.2 мкМ); (б) — кривые амплификации и плавления финального амплификата при оценке совместного эффекта двух петлевых праймеров (LP): 1 — СР; 2 — СР + LF; 3 — СР + LB; 4 — СР + LP. Концентрация каждого петлевого праймера — 0.8 мкМ. Однородная  $T_{пл}$  финального амплификата свидетельствует о сохранении специфичности при увеличении скорости реакции.

гация ДНК-полимеразой гибризованного 3'-конца, что вносит дополнительный вклад в выход реакции. Ампликоны LAMP с возрастанием молекулярной массы помимо терминальной петли приобретают множество сайтов отжига в своих двуцепочечных участках, где гибридизация с внутренними и петлевыми праймерами возможна благодаря эффекту “дыхания” цепей [50].

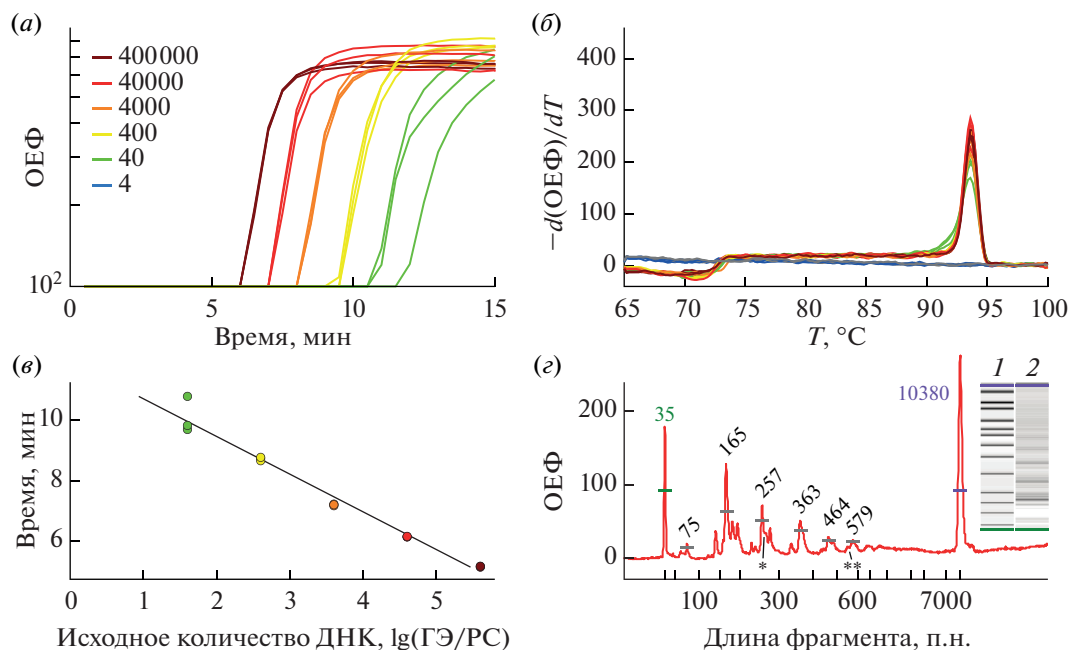
**Аналитическая специфичность.** Получив положительные сигналы амплификации на всех имеющихся образцах *M. tuberculosis* ( $n = 7$ ) и не наблюдая реакции при добавлении в качестве ДНК-матрицы остальных образцов нашей коллекции ( $n = 16$ ), видоспецифичность гена *rv2341* была дополнительно уточнена на внутривидовом уровне посредством *in silico* анализа геномов всех вариантов *M. tuberculosis*, доступных в базе NCBI Nucleotide (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

Установлено, что ген *rv2341* присутствует в геномах почти всех вариантов вида *M. tuberculosis*, за исключением двух: *M. tuberculosis* var. *munzi* и *M. tuberculosis* var. *pinnipedii*. Данные варианты — специализированные патогены естественных хозяев: мангустов и ластоногих [6]. Имеются факты заражения дрессировщиков тюленей штаммами

*M. tuberculosis* var. *pinnipedii* [51], но они редкие и скорее не представляют опасности. Случаи заражения людей штаммами *M. tuberculosis* var. *munzi* не описаны [52, 53].

Таким образом, ген *rv2341* по многим критериям является надежной мишенью и вполне мог бы стать новым стандартом в молекулярной диагностике МТБ. Мозаичность его встречаемости, по-видимому, отражает эволюцию предков известных ныне вариантов *M. tuberculosis* [54] и его возможное приобретение более ранними формами микобактерий в результате горизонтального переноса [55], поскольку для современных штаммов целевого вида характерна высокая степень консервативности генома [56].

Для демонстрации применимости гена *rv2341* в качестве мишени для праймеров, совместимых не только с методом ПЦР, но и с LAMP, в рамках настоящего исследования была разработана тест-система ТБ-ИЗАТЕСТ, предназначенная для дифференциальной диагностики вариантов МТБ, представляющих опасность для человека. По совокупности технических и аналитических характеристик тест-система ТБ-ИЗАТЕСТ пре-



**Рис. 6.** Характеристики реакции LAMP на основе полного набора праймеров TB2341 при оптимальных условиях амплификации. (а) — Кривые амплификации в логарифмическом масштабе при измерении аналитической чувствительности в диапазоне концентраций  $4 \times 10^0$ – $4 \times 10^5$  геном-эквивалентов *M. tuberculosis*. Предел детекции —  $4 \times 10^1$  копий геномной ДНК на реакцию; (б) — кривые плавления финального ампликата; (в) — стандартная кривая с визуализацией линейного динамического диапазона. Эффективность амплификации — 152.4% ( $R^2 = 0.977$ ). ГЭ — геном-эквивалент; РС — реакционная смесь; (г) — визуализация продуктов реакции с помощью капиллярного электрофореза: 1 — маркер молекулярных масс ДНК (снизу вверх: 35, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 1000, 2000, 3000, 7000, 10380 п.н.); 2 — продукты амплификации в виде характерной периодичной “лесенки”. Приведены значения молекулярной массы продуктов с наибольшей концентрацией. Рассчитанные молекулярные массы ампликонов имеют следующие значения: 165, 268\*, 361, 464, 557\*\* п.н. Звездочками на рисунке обозначены соответствующие минорные пики измеренных масс, обнаруженных в продуктах реакции на капиллярном электрофорезе: \* 267 п.н.; \*\* 552 п.н.

восходит все известные способы выявления геномной ДНК *M. tuberculosis* методом LAMP.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Выбор гена-мишени.** Для подбора гена-мишени проводили *in silico* скрининг идентифицированных ранее 30 потенциальных генов-мишеней [40] не только среди штаммов МТБ/НТМ, но и вне рода *Mycobacterium*. Для этого использовали веб-сервис NCBI BLAST и алгоритм blastn [57]. Анализ функциональной ассоциации и совместной экспрессии генов проводили с помощью веб-сервиса STRING 11.5 (<https://string-db.org>) [58]. При обнаружении гомологии ДНК вне вида *M. tuberculosis* (порог покрытия нуклеотидной последовательности — 25%) мишень признавали малоприспособной. В качестве мишени для определения *M. tuberculosis* использовали ген *rv2341* (синоним — *lppQ*; идентификатор NCBI Gene: 886275). Нуклеотидную последовательность гена извлекали из полного генома типового штамма *M. tuber-*

*culosis* H37Rv (идентификатор NCBI Nucleotide: NC\_000962.3) [59]. Геномное окружение и GC-состав *rv2341* визуализировали в программе SnapGene Viewer 6.0.5 (Dotmatrix, США).

**Олигонуклеотидные праймеры.** При подборе праймеров использовали программное обеспечение PrimerExplorer 5.0 (<https://primerexplorer.jp/e>) [17] и веб-сервис LAMP Primer Design Tool 1.0.2 (<https://lamp.neb.com>) [22]. Нуклеотидные последовательности разработанных праймеров приведены в табл. 1. Возможные димеры праймеров оценивали с помощью веб-сервиса PrimerDimer (<http://primer-dimer.com>) [60]. Проводили *in silico* контроль синхронности гибридизации парных сайтов отжига праймеров в оптимальных условиях реакции с помощью веб-сервиса uMelt Quartz 3.6.2 (<https://dna-utah.org/umelt/quartz>) [61]. При необходимости нуклеотидную последовательность праймеров модифицировали вручную.

Химический синтез праймеров проводили фосфорамидитным методом на автоматическом

синтезаторе ABI 3900 (Applied Biosystems, США). Все олигонуклеотиды были обессолены, лиофилизованы производителем (Евроген, Россия) и не проходили дополнительных стадий очистки.

В день эксперимента готовили 25× водные растворы коровых праймеров (FIP, VIP, F3, B3) [19]. В отдельных пробирках готовили 25× растворы петлевых праймеров (LF и LB). Готовили аликвоты всех растворов и хранили их при –20°C, допуская только один цикл заморозки-оттаивания.

Тестирование праймеров проводили на геномной ДНК по протоколу производителя ДНК-полимеразы *Bst* 2.0 WarmStart (New England Biolabs (NEB), США).

**Молекулярное моделирование.** Моделирование вторичной структуры цепей ДНК и термодинамические расчеты проводили в программе mFold 4.7 (<http://www.unafold.org>) [62] при оптимальных условиях LAMP. Шпильки ДНК визуализировали в приложении forna (<http://rna.tbi.univie.ac.at/forna>) [63]. С помощью веб-сервиса RNAComposer (<http://rnacomposer.ibch.poznan.pl>) [64], а также программ Discovery Studio Visualizer 21.1 (3DS, Франция) и PyMOL 2.5 (Schrödinger, США) проводили моделирование третичной структуры сахарофосфатного остова и оснований. Визуализацию стартового ампликона проводили с помощью веб-сервиса Mol\* Viewer (<https://molstar.org>) [65].

**Коллекция геномной ДНК.** Коллекция включала в себя образцы геномной ДНК, выделенной из штаммов целевого вида *M. tuberculosis* ( $n = 7$ ) [66]; близкородственных видов НТМ: *M. avium* ( $n = 2$ ), *M. goodii* ( $n = 1$ ) и *M. scrofulaceum* ( $n = 1$ ); близкородственных бактерий других видов: *Mycobacterium fortuitum* ( $n = 1$ ), *M. phlei* ( $n = 1$ ) и *M. smegmatis* ( $n = 1$ ); бактерий других таксонов: *Acinetobacter baumannii* ( $n = 1$ ), *Aeromonas hydrophila* ( $n = 1$ ), *Escherichia coli* ( $n = 1$ ), *Klebsiella pneumoniae* ( $n = 1$ ), *Proteus mirabilis* ( $n = 1$ ), *Pseudomonas aeruginosa* ( $n = 1$ ), *Salmonella enterica* ( $n = 1$ ) и *Staphylococcus aureus* ( $n = 1$ ).

Концентрация всех образцов ДНК составляла 2 нг/мкл. Концентрацию нуклеиновых кислот измеряли с помощью флуориметра Qubit 4 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, США). Принадлежность образцов ДНК таксону *M. tuberculosis* дополнительно подтверждали с помощью ПЦР и тест-системы ПОЛИТУБ (Литех, Россия).

**Молекулярное клонирование.** Для создания плазмидной ДНК с сайтами отжига праймеров проводили ПЦР-амплификацию фрагмента гена *rv2341*, фланкированного внешними праймерами (F3 и B3). Молекулярная масса клонируемого фрагмента –194 п.н., GC-состав – 64%. Для ам-

плификации использовали набор реагентов Tersus Plus PCR Kit (Евроген, Россия). Реакционную смесь готовили согласно инструкции производителя, используя 0.4 мкМ каждого внешнего праймера. В качестве ДНК-матрицы использовали 2 мкл образца геномной ДНК *M. tuberculosis* в концентрации 2 нг/мкл. ПЦР-амплификацию проводили в термоциклере CFX96 Touch (Bio-Rad, США) по следующему протоколу: 95°C – 3 мин; 35 циклов: 95°C – 10 с, 55°C – 30 с, 72°C – 15 с.

Целевой фрагмент гена *rv2341* после очистки в агарозном геле использовали для быстрого лигирования в линейаризованный плазмидный вектор pAL2-T с помощью набора реагентов Quick-TA Kit (Евроген, Россия). Полученной лигазной смесью проводили химическую трансформацию компетентных клеток штамма *E. coli* TOP10. После культивирования клеток *E. coli* при 37°C в чашках Петри на плотной питательной среде LB с ампициллином (100 мкг/мл), скрининга клонов и секвенирования вставки по Сэнгеру, культивировали успешный клон для накопления биомассы продуцента плазмиды. Далее выделяли плазмидную ДНК набором реагентов Plasmid Midi Kit (Qiagen, Германия). Плазмиду pHD2341 использовали в качестве ДНК-матрицы при оптимизации амплификации.

**Оптимизация амплификации.** Для определения оптимального соотношения концентраций компонентов буфера готовили реакционную смесь объемом 10 мкл, содержащую 1× Isothermal Amplification Buffer (NEB, США), 0.5× EvaGreen (Biotium, США), 1.6 мкМ каждого внутреннего праймера (FIP и VIP), 0.2 мкМ каждого внешнего праймера (F3 и B3), 3.2 ед. акт. ДНК-полимеразы *Bst* 2.0 WarmStart (NEB, США) и стерильную деионизированную воду без нуклеаз (Евроген, Россия). В качестве ДНК-матрицы использовали 2 мкл плазмиды pHD2341 в концентрации 5 нг/мкл.

Регистрацию флуоресценции интеркалирующего красителя EvaGreen при накоплении продуктов реакции LAMP проводили в канале детекции FAM/SYBR каждые 30 с. Длительность амплификации в протоколе двухстадийной оптимизации по методу ортогональных матриц Тагути составляла 20 мин (стадия I) и 15 мин (стадия II).

После термической инактивации ДНК-полимеразы (95°C – 2 мин) проводили анализ вероятных продуктов неспецифической амплификации с помощью анализа кривых плавления в диапазоне температур 65–100°C с шагом 0.2°C. Оптимальными признавали уровни факторов, способствующие максимальной скорости амплификации и однородности получаемых значений  $T_{пл}$

финального амплификата без дополнительных минорных пиков неспецифичных продуктов.

Исследовали влияние на скорость реакции градиента температуры инкубации (65–67°C с шагом 1°C) и компонентов реакционной смеси в концентрациях: 6–8 мМ MgSO<sub>4</sub> (NEB, США) с шагом 1 мМ; 1.2–1.6 мМ dNTP (Биосан, Россия) с шагом 0.2 мМ. Каждый фактор оптимизации тестировали в двух технических повторах ( $n = 2$ ), исследуя три уровня переменных значений фактора ( $n = 3$ ). Далее определяли достаточную концентрацию каждого петлевого праймера (LF и LB) в градиенте 0.4–1.2 мкМ с шагом 0.4 мкМ.

Все эксперименты проводили на термоциклере CFX96 Touch (Bio-Rad, США).

**Аналитическая чувствительность.** Для измерения предела детекции использовали серию последовательных десятикратных разведений стандартных образцов на основе очищенной геномной ДНК *M. tuberculosis*. Аналитическую чувствительность измеряли при оптимальных условиях в трех технических повторах ( $n = 3$ ) для каждой исследуемой концентрации в диапазоне значений  $4 \times 10^0$ – $4 \times 10^5$  геном-эквивалентов на реакцию, завершая анализом кривых плавления.

**Эффективность амплификации.** Анализ эффективности реакции проводили с помощью линейного уравнения стандартной кривой и полученного значения коэффициента детерминации ( $R^2$ ) [49]. Эффективность амплификации ( $E$ ) рассчитывали по коэффициенту наклона стандартной кривой ( $s$ , от англ. slope) по следующей формуле:

$$E = 10^{-1/s}.$$

**Капиллярный электрофорез.** Для визуализации продуктов реакции LAMP использовали систему капиллярного электрофореза на микрофлюидном чипе Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, США) с набором реагентов High Sensitivity DNA Reagents (Agilent Technologies, Литва). Концентрация ДНК в реакционной смеси после амплификации составляла 20 нг/мкл, поэтому перед измерением готовили десятикратное разведение амплификата деионизированной водой без нуклеаз. Значения экспериментально полученных молекулярных масс сравнивали с таковыми согласно математической модели [47].

**Статистический анализ.** Экспериментальные данные анализировали с помощью программы CFX Manager 3.1 (Bio-Rad, США). Построение ортогональных матриц Тагути и дисперсионный анализ проводили в программе Minitab 19 (Minitab, США).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пандемия коронавирусной инфекции наглядно продемонстрировала последствия низкой пропускной способности диагностических лабораторий, ограниченных рамками существующих методических рекомендаций и тест-систем на основе ПЦР. К сожалению, многие диагностические центры оказались неадаптированными к массовому скринингу. Более того, большой ущерб был нанесен диагностике других инфекционных заболеваний, среди которых оказался и ТБ. Один из способов решения этой проблемы заключается в более широком внедрении быстрых тестов на основе метода LAMP, применение которых возможно не только в крупных городах, но и в регионах.

В настоящей работе впервые для метода LAMP был применен комплексный подход к подбору гена-мишени, дизайну праймеров и анализу их физико-химических свойств, а также к выбору стратегии оптимизации концентраций компонентов реакционной смеси и условий амплификации, основанной на методе ортогональных матриц Тагути, с последующим дисперсионным анализом полученных экспериментальных данных.

Важное преимущество метода LAMP заключается в возможности сокращения длительности стадии амплификации, которая обычно составляет 30–60 мин. Поэтому большое внимание было уделено оценке ландшафта оптимальных значений таких факторов, как температура инкубации, а также концентрация ионов магния и dNTP. Двухстадийный TMN-протокол оптимизации и комплексный статистический анализ данных позволили небольшим количеством экспериментов добиться максимальных показателей эффективности амплификации. Так, важным результатом оптимизации стало сокращение длительности стадии амплификации до 15 мин, достаточных для обнаружения 40 копий геномной ДНК *M. tuberculosis*.

Разработанная тест-система ТБ-ИЗАТЕСТ может найти применение в различных областях исследований возбудителя ТБ. Наиболее вдохновляющим возможным примером применения разработанной тест-системы представляется ее использование для быстрой оценки эффективности схемы антибактериальной химиотерапии, назначаемой пациенту с ТБ. Высокая скорость амплификации в сочетании с количественным анализом геномной ДНК *M. tuberculosis* позволяют повысить регулярность контроля эффекта принимаемых препаратов, что недоступно при методе культивирования. При использовании однокопийной мишени *rv2341* выявляемое количество геном-эквивалентов будет соответствовать коли-

честву клеток микобактерий. Проблема дифференциации геномной ДНК живых и мертвых клеток при этом характерна для всех методов амплификации и, следовательно, не будет недостатком предлагаемой тест-системы.

В заключение необходимо отметить, что представленные результаты в значительной степени пионерские. В частности, в совокупности с результатами более ранних работ [23] можно утверждать, что диапазон значений эффективности амплификации LAMP для оптимизированных тест-систем лежит в пределах 99–152%, что существенно превосходит метод ПЦР. Многие аспекты экспериментов с LAMP раскрыты в соответствии с руководящими принципами MIQE [67], разработанными для стандартизации результатов количественной ПЦР.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы признательны П.А. Бобровскому за помощь в молекулярном клонировании и В.А. Веселовскому за анализ амплификата на установке для капиллярного электрофореза.

#### ФОНДОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-75-10144).

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей и использованием животных в качестве объектов исследований.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Нуклеотидные последовательности праймеров набора TB2341 стали основой патентной заявки на изобретение в Федеральную службу по интеллектуальной собственности (Роспатент): рег. № 2022133809 от 22.12.2022 (авторы: Ш.Ф.В., Б.Ю.А.).

#### ВКЛАД АВТОРОВ

Концепция исследования — Ш.Ф.В., Б.Ю.А.; дизайн экспериментов, методология, экспериментальная работа, анализ данных, визуализация, написание рукописи — Ш.Ф.В.; получение финансирования, редактирование рукописи, научное руководство — Б.Ю.А. Все авторы ознакомлены с финальной версией рукописи статьи.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Pai M., Behr M.A., Dowdy D., Dheda K., Divangahi M., Boehme C.C., Ginsberg A., Swaminathan S., Spigelman M., Getahun H., Menzies D., Raviglione M.* // *Nat. Rev. Dis. Prim.* 2016. V. 2. P. 16076. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.76>
2. *Bhat Z.S., Rather M.A., Maqbool M., Ahmad Z.* // *Biomed. Pharmacother.* 2018. V. 103. P. 1733–1747. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.04.176>
3. *Chakaya J., Petersen E., Nantanda R., Mungai B.N., Migliori G.B., Amanullah F., Lungu P., Ntoumi F., Kumarasamy N., Maeurer M., Zumla A.* // *Int. J. Infect. Dis.* 2022. V. 124. P. S26–S29. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.03.011>
4. *Bagechi S.* // *The Lancet Microbe.* 2023. V. 4. P. e20. [https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(22\)00359-7](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(22)00359-7)
5. *Achtman M.* // *Annu. Rev. Microbiol.* 2008. V. 62. P. 53–70. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.62.081307.162832>
6. *Riojas M.A., McGough K.J., Rider-Riojas C.J., Rastogi N., Hazbón M.H.* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2018. V. 68. P. 324–332. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002507>
7. *Gupta R.S., Lo B., Son J.* // *Front Microbiol.* 2018. V. 9. P. 67. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00067>
8. *Meenan C.J., Barco R.A., Loh Y.E., Cogneau S., Rigouts L.* // *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2021. V. 71. P. 004922. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004922>
9. *Johansen M.D., Herrmann J.-L., Kremer L.* // *Nat. Rev. Microbiol.* 2020. V. 18. P. 392–407. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0331-1>
10. *Galagan J.E.* // *Nat. Rev. Genet.* 2014. V. 15. P. 307–320. <https://doi.org/10.1038/nrg3664>
11. *Gagneux S.* // *Nat. Rev. Microbiol.* 2018. V. 16. P. 202–213. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2018.8>
12. *Merker M., Rasigade J.-P., Barbier M., Cox H., Feuerriegel S., Kohl T.A., Shitikov E., Klaos K., Gaudin C., Antoine R., Diel R., Borrell S., Gagneux S., Nikolaevskyy V., Andres S., Crudu V., Supply P., Niemann S., Wirth T.* // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. P. 5105. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32455-1>
13. *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., Kwiakowski R., Jones M., Alland D.* // *mBio.* 2017. V. 8. P. e00812-17. <https://doi.org/10.1128/mBio.00812-17>
14. World Health Organization, 2021. WHO Consolidated Guidelines on Tuberculosis. Module 3: Diagnosis. Rapid Diagnostics for Tuberculosis Detection, 2021 Update. Geneva: World Health Organization, 2021. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240029415>

15. Gryadunov D.A., Shaskolskiy B.L., Nasedkina T.V., Rubina A.Y., Zasedatelev A.S. // *Acta Naturae*. 2018. V. 10. P. 4–18.  
<https://doi.org/10.32607/20758251-2018-10-4-4-18>
16. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H., Yonekawa T., Watanabe K., Amino N., Hase T. // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. P. e63.  
<https://doi.org/10.1093/nar/28.12.e63>
17. Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T. // *Nat. Protoc.* 2008. V. 3. P. 877–882.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2008.57>
18. Kaboev O.K., Luchkina L.A., Akhmedov A.T., Bekker M.L. // *J. Bacteriol.* 1981. V. 145. P. 21–26.  
<https://doi.org/10.1128/jb.145.1.21-26.1981>
19. Tanner N.A., Evans T.C. // *Curr. Protoc. Mol. Biol.* 2014. V. 105. P. 15.14.1–15.14.14.  
<https://doi.org/10.1002/0471142727.mb1514s105>
20. Nagamine K., Hase T., Notomi T. // *Mol. Cell. Probes.* 2002. V. 16. P. 223–229.  
<https://doi.org/10.1006/mcpr.2002.0415>
21. Yonekawa T., Watanabe H., Hosaka N., Semba S., Shoji A., Sato M., Hamasaki M., Yuki S., Sano S., Segawa Y., Notomi T. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. P. 5409.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-62109-5>
22. Moore K.J.M., Cahill J., Aidelberg G., Aronoff R., Bektaş A., Bezdan D., Butler D.J., Chittur S.V., Codyre M., Federici F., Tanner N.A., Tighe S.W., True R., Ware S.B., Wyllie A.L., Afshin E.E., Bendesky A., Chang C.B., Dela Rosa R., Elhaik E., Erickson D., Goldsborough A.S., Grills G., Hadasch K., Hayden A., Her S.Y., Karl J.A., Kim C.H., Krieger A.J., Kunstman T., Landau Z., Land K., Langhorst B.W., Lindner A.B., Mayer B.E., McLaughlin L.A., McLaughlin M.T., Molloy J., Mozsary C., Nadler J.L., D'Silva M., Ng D., O'Connor D.H., Ongerth J.E., Osuolale O., Pinharanda A., Plenker D., Ranjan R., Rosbash M., Rotem A., Segarra J., Schürer S., Sherrill-Mix S., Solo-Gabriele H., To S., Vogt M.C., Yu A.D., Mason C.E., The gLAMP Consortium // *J. Biomol. Tech.* 2021. V. 32. P. 228–275.  
<https://doi.org/10.7171/jbt.21-3203-017>
23. Shirshikov F.V., Bespyatykh J.A. // *Russ. J. Bioorg. Chem.* 2022. V. 48. P. 1159–1174.  
<https://doi.org/10.1134/S106816202206022X>
24. Iwamoto T., Sonobe T., Hayashi K. // *J. Clin. Microbiol.* 2003. V. 41. P. 2616–2622.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.41.6.2616-2622.2003>
25. Boehme C.C., Nabeta P., Henostroza G., Raqib R., Rahim Z., Gerhardt M., Sanga E., Hoelscher M., Notomi T., Hase T., Perkins M.D. // *J. Clin. Microbiol.* 2007. V. 45. P. 1936–1940.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.02352-06>
26. Rakotosamimanana N., Lapierre S.G., Raharimanga V., Raherison M.S., Knoblauch A.M., Raherinandrasana A.H., Rakotoson A., Rakotonirina J., Rasolofo V. // *BMC Infect. Dis.* 2019. V. 19. P. 542.  
<https://doi.org/10.1186/s12879-019-4198-6>
27. World Health Organization, 2016. The Use of Loop-Mediated Isothermal Amplification (TB-LAMP) for the Diagnosis of Pulmonary Tuberculosis. Geneva: World Health Organization, 2016.  
<https://apps.who.int/iris/handle/10665/249154>
28. Gray C.M., Katamba A., Narang P., Giraldo J., Zamudio C., Joloba M., Narang R., Paramasivan C.N., Hillemann D., Nabeta P., Amisano D., Alland D., Cobelens F., Boehme C.C. // *J. Clin. Microbiol.* 2016. V. 54. P. 1984–1991.  
<https://doi.org/10.1128/JCM.03036-15>
29. García-Basteiro A.L., DiNardo A., Saavedra B., Silva D.R., Palmero D., Gegia M., Migliori G.B., Duarte R., Mambugue E., Centis R., Cuevas L.E., Izco S., Theron G. // *Pulmonology*. 2018. V. 24. P. 73–85.  
<https://doi.org/10.1016/j.rppnen.2017.12.002>
30. Neonakis I.K., Spandidos D.A., Petinaki E. // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 2011. V. 30. P. 937–942.  
<https://doi.org/10.1007/s10096-011-1195-0>
31. Yuan L., Li Y., Wang M., Ke Z., Xu W. // *J. Infect. Chemother.* 2014. V. 20. P. 86–92.  
<https://doi.org/10.1016/j.jiac.2013.07.003>
32. Nagai K., Horita N., Yamamoto M., Tsukahara T., Nagakura H., Tashiro K., Shibata Y., Watanabe H., Nakashima K., Ushio R., Ikeda M., Narita A., Kanai A., Sato T., Kaneko T. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 39090.  
<https://doi.org/10.1038/srep39090>
33. Nliwasa M., MacPherson P., Chisala P., Kamdolozi M., Khundi M., Kaswaswa K., Mwapasa M., Msefula C., Sohn H., Flach C., Corbett E.L. // *PLoS One*. 2016. V. 11. P. e0155101.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0155101>
34. Yu G., Shen Y., Zhong F., Ye B., Yang J., Chen G. // *PLoS One*. 2018. V. 13. P. e0199290.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0199290>
35. Lok K.H., Benjamin W.H., Kimerling M.E., Pruitt V., Lathan M., Razeq J., Hooper N., Cronin W., Dunlap N.E. // *Emerg. Infect. Dis.* 2002. V. 8. P. 1310–1313.  
<https://doi.org/10.3201/eid0811.020291>
36. Thierry D., Brisson-Noël A., Vincent-Lévy-Frébault V., Nguyen S., Guesdon J.L., Gicquel B. // *J. Clin. Microbiol.* 1990. V. 28. P. 2668–2673.  
<https://doi.org/10.1128/jcm.28.12.2668-2673.1990>
37. Kechin A., Ostorbin I., Cherednichenko A., Khrapov E., Schwartz Y., Stavitskaya N., Filipenko M. // *Arch. Microbiol.* 2023. V. 205. P. 71.  
<https://doi.org/10.1007/s00203-023-03410-5>
38. Alonso H., Samper S., Martín C., Otal I. // *BMC Genomics*. 2013. V. 14. P. 422.  
<https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-422>
39. Zhou L., Ma C., Xiao T., Li M., Liu H., Zhao X., Wan K., Wang R. // *Front. Microbiol.* 2019. V. 10. P. 1–10.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01887>
40. Goig G.A., Torres-Puente M., Mariner-Llicer C., Villamayor L.M., Chiner-Oms Á., Gil-Brusola A., Borrás R., Comas Espadas I. // *Bioinformatics*. 2019. V. 36. P. 985–989.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz729>

41. Shirshikov F. V., Pekov Y.A., Miroshnikov K.A. // PeerJ. 2019. V. 7. P. e6801.  
<https://doi.org/10.7717/peerj.6801>
42. Abramovitch R.B., Rohde K.H., Hsu F.-F., Russell D.G. // Mol. Microbiol. 2011. V. 80. P. 678–694.  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07601.x>
43. Gupta A. // FEMS Microbiol. Lett. 2009. V. 290. P. 45–53.  
<https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2008.01400.x>
44. Morero M., Ramirez M.R., Oyhenart J. // Vet. Parasitol. 2021. V. 295. P. 109462.  
<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2021.109462>
45. Shoushtari M., Salehi-Vaziri M., Roohvand F., Arashkia A., Jalali T., Azadmanesh K. // Biotechnol. Lett. 2021. V. 43. P. 2149–2160.  
<https://doi.org/10.1007/s10529-021-03175-1>
46. Wang Y., Li J., Li S., Zhu X., Wang X., Huang J., Yang X., Tai J. // Microchim. Acta. 2021. V. 188. P. 347.  
<https://doi.org/10.1007/s00604-021-04985-w>
47. Schneider L., Blakely H., Tripathi A. // Electrophoresis. 2019. V. 40. P. 2706–2717.  
<https://doi.org/10.1002/elps.201900167>
48. Bio-Rad Laboratories Inc., 2006. Real-Time PCR Applications Guide. Bulletin 5279. P. 4–6.  
[https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin\\_5279.pdf](https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_5279.pdf)
49. Ruijter J.M., Barnewell R.J., Marsh I.B., Szentirmay A.N., Quinn J.C., van Houdt R., Gunst Q.D., van den Hoff M.J.B. // Clin. Chem. 2021. V. 67. P. 829–842.  
<https://doi.org/10.1093/clinchem/hvab052>
50. von Hippel P.H., Johnson N.P., Marcus A.H. // Biopolymers. 2013. V. 99. P. 923–954.  
<https://doi.org/10.1002/bip.22347>
51. Cousins D.V., Bastida R., Cataldi A., Quse V., Redrobe S., Dow S., Duignan P., Murray A., Dupont C., Ahmed N., Collins D.M., Butler W.R., Dawson D., Rodríguez D., Loureiro J., Romano M.I., Alito A., Zumarraga M., Bernardelli A. // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2003. V. 53. P. 1305–1314.  
<https://doi.org/10.1099/ijs.0.02401-0>
52. Alexander K.A., Laver P.N., Michel A.L., Williams M., van Helden P.D., Warren R.M., Gey van Pittius N.C. // Emerg. Infect. Dis. 2010. V. 16. P. 1296–1299.  
<https://doi.org/10.3201/eid1608.100314>
53. Esteban J., Muñoz-Egea M.C. // Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections / Ed. David Schlossberg. Washington, DC: ASM Press, 2017. P. 754.  
<https://doi.org/10.1128/microbiolspec.TNMI7-0021-2016>
54. Ngabonziza J.C.S., Loiseau C., Marceau M., Jouet A., Menardo F., Tzfadia O., Antoine R., Niyigenga E.B., Mulders W., Fissette K., Diels M., Gaudin C., Duthoy S., Ssengooba W., André E., Kaswa M.K., Habimana Y.M., Brites D., Affolabi D., Mazarati J.B., de Jong B.C., Rigouts L., Gagneux S., Meehan C.J., Supply P. // Nat. Commun. 2020. V. 11. P. 2917.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-020-16626-6>
55. Panda A., Drancourt M., Tuller T., Pontarotti P. // Sci. Rep. 2018. V. 8. P. 14817.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-018-33261-w>
56. Eldholm V., Balloux F. // Trends Microbiol. 2016. V. 24. P. 637–648.  
<https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.03.007>
57. Altschul S.F., Gish W., Miller W., Myers E.W., Lipman D.J. // J. Mol. Biol. 1990. V. 215. P. 403–410.  
[https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
58. Szklarczyk D., Gable A.L., Lyon D., Junge A., Wyder S., Huerta-Cepas J., Simonovic M., Doncheva N.T., Morris J.H., Bork P., Jensen L.J., von Mering C. // Nucleic Acids Res. 2019. V. 47. P. D607–D613.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gky1131>
59. Chitale P., Lemenze A.D., Fogarty E.C., Shah A., Grady C., Odom-Mabey A.R., Johnson W.E., Yang J.H., Eren A.M., Brosch R., Kumar P., Alland D. // Nat. Commun. 2022. V. 13. P. 7068.  
<https://doi.org/10.1038/s41467-022-34853-x>
60. Lu J., Johnston A., Berichon P., Ru K., Korbie D., Trau M. // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 41328.  
<https://doi.org/10.1038/srep41328>
61. Dwight Z., Palais R., Wittwer C.T. // Bioinformatics. 2011. V. 27. P. 1019–1020.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr065>
62. Zuker M. // Nucleic Acids Res. 2003. V. 31. P. 3406–3415.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkg595>
63. Kerpedjiev P., Hammer S., Hofacker I.L. // Bioinformatics. 2015. V. 31. P. 3377–3379.  
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv372>
64. Popena M., Szachniuk M., Antczak M., Purzycka K.J., Lukasiak P., Bartol N., Blazewicz J., Adamiak R.W. // Nucleic Acids Res. 2012. V. 40. P. e112.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gks339>
65. Sehnal D., Bittrich S., Deshpande M., Svobodová R., Berka K., Bazgier V., Velankar S., Burley S.K., Koča J., Rose A.S. // Nucleic Acids Res. 2021. V. 49. P. W431–W437.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkab314>
66. Shitikov E.A., Bespyatykh J.A., Ischenko D.S., Alexeev D.G., Karpova I.Y., Kostyukova E.S., Isaeva Y.D., Nosova E.Y., Mokrousov I.V., Vyazovaya A.A., Narvskaya O.V., Vishnevsky B.I., Otten T.F., Zhuravlev V.I., Yablonsky P.K., Ilina E.N., Govorun V.M. // PLoS One. 2014. V. 9. P. e84971.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0084971>
67. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. // Clin. Chem. 2009. V. 55. P. 611–622.  
<https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>

## TB-ISATEST: a Diagnostic LAMP Assay for Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis*

F. V. Shirshikov\*, \*\*, # and J. A. Bespyatykh\*, \*\*

# Phone: +7 (906) 114-70-00; e-mail: shrshkv@ya.ru

\*Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of Federal Medical Biological Agency, ul. Malaya Pirogovskaya 1A, Moscow, 119435 Russia

\*\*Mendeleev University of Chemical Technology, Miusskaya pl. 9, Moscow, 125047 Russia

Consumption, white plague, tuberculosis... Only relatively recently, this disease has ceased to be an absolutely death sentence for infected people, but problems of the spread and diagnosis of the disease are still relevant. This paper presents results of the development of a new loop isothermal amplification (LAMP) assay, named TB-ISATEST, which targeting the species-specific gene *rv2341* for the differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* from non-tuberculosis mycobacteria. The assay is applicable for quantitative analysis of genomic DNA and allows detecting tenfold difference in concentration. The results of amplification optimization using a unique two-stage protocol based on the method of orthogonal Taguchi matrices are presented for the first time. A theoretical interpretation of the high amplification efficiency values observed in the LAMP reaction is proposed. Limit of detection of the developed assay is 40 copies of genomic DNA per reaction and amplification requires 15 min. In terms of the combination of characteristics, the TB-ISATEST assay surpasses all the known ways for identifying *M. tuberculosis* by the LAMP method.

**Keywords:** isothermal amplification, mycobacteria, tuberculosis, *rv2341*