

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Огарков О.Б., Синьков В.В., Кондратов И.Г., Жданова С.Н., Орлова Е.А., Хромова П.А.

РАЗРАБОТКА ПЦР-РВ МЕТОДА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ТУБЕРКУЛЕЗНЫХ И НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ НА ОСНОВЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА БЕЛКА ТЕПЛООВОГО ШОКА

ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», 664003, Иркутск, Россия

Цель - разработка ПЦР метода с флуоресцентной детекцией в реальном времени для выявления туберкулезных и нетуберкулезных микобактерий в клиническом материале, в том числе за счет выявления свободно циркулирующей ДНК в крови, плевральной жидкости, других тканях и органах. Для выявления уникальных мутаций пригодных для дискриминации туберкулезных и нетуберкулезных микобактерий, проведен биоинформационный анализ референсных геномов микобактерий для их выравнивания по гомологичным нуклеотидным последовательностям. Анализ выровненных последовательностей M. tuberculosis complex, M. avium complex и других медленно и быстро растущих микобактерий, представленных в базе данных NCBI, выявил участок гена Rv0440 (GroE12), содержащий в позициях 529633 и 529636 специфические однонуклеотидные замены, пригодные для одностадийной ПЦР-РВ идентификации ДНК возбудителей M. tuberculosis complex и дискриминации их от иных нетуберкулезных микобактерий. Проведено испытание разработанных компонентов ПЦР - праймеров и TaqMan зондов на чистых культурах туберкулезных и нетуберкулезных микобактерий и клинических образцах от больных туберкулезом и микобактериозами. При разработке метода использованы образцы мокроты, крови, пунктатов лимфатических узлов более чем 150 больных туберкулезом и микобактериозами. Разработанные ПЦР реактивы успешно выявляли низкомолекулярную высоко-деградированную ДНК микобактерий, циркулирующую в крови и других тканях больных туберкулезом и микобактериозами. На исчерпывающей выборке референсных геномов микобактерий из NCBI показана высокая потенциальная специфичность разработанного теста. Виртуальной программой Primer-BLAST, и вручную сервисом Blastn показано, что разработанный метод будет успешно дискриминировать виды M. tuberculosis complex: M. tuberculosis, M. africanum, M. canettii, M. bovis, M. caprae, M. microti от 125 видов нетуберкулезных микобактерий.

Ключевые слова: ПЦР-РВ; TaqMan зонды; ген Rv0440; M. tuberculosis complex; нетуберкулезные микобактерии

Для цитирования: Огарков О.Б., Синьков В.В., Кондратов И.Г., Жданова С.Н., Орлова Е.А., Хромова П.А. Разработка ПЦР-РВ метода для выявления туберкулезных и нетуберкулезных микобактерий в клиническом материале на основе полиморфизма гена белка теплового шока. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (8): 421-426.
DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-8-421-426>

Для корреспонденции: Огарков Олег Борисович, д-р мед. наук, гл. науч. сотр., директор института Эпидемиологии и микробиологии ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека»; e-mail: obogarkov@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 05.06.2024
Принята к печати 24.06.2024
Опубликовано 01.08.2024

Ogarkov O.B., Sinkov V.V., Kondratov I.G., Zhdanova S.N., Orlova E.A. Khromova P.A.

DEVELOPMENT OF A PCR-RT METHOD FOR DETECTION OF TUBERCULOUS AND NON-TUBERCULOUS MYCOBACTERIA IN CLINICAL SAMPLES BY POLYMORPHISM OF GENE HEAT SHOCK PROTEIN

Scientific Centre of the Family Health and Human Reproduction Problems, 664003, Irkutsk, Russia

The aim of the study is to develop a real-time PCR method with fluorescent detection for the identification and discrimination of tuberculosis and non-tuberculosis mycobacteria in clinical material, including freely circulating DNA in blood, pleural fluid and other tissues and organs. Bioinformatics analysis of mycobacterial genomes was performed to align them with homologous nucleotide sequences. Aligned sequences of M. tuberculosis complex, M. avium complex and other slow and fast-growing mycobacteria presented in the NCBI database, were analysed, it was revealed the Rv0440 (GroE12) gene region containing specific single-nucleotide substitutions in positions 529633 and 529636. This SNPs were suitable for design of a diagnostic test for one-step PCR of DNA of M. tuberculosis complex and nontuberculous mycobacteria. The developed PCR reagents - primers and TaqMan probes were tested on pure cultures of tuberculosis and nontuberculous mycobacteria and clinical samples from patients with tuberculosis and mycobacteriosis. Sputum, blood and lymph node samples from more than 150 patients with tuberculosis and mycobacteriosis were used in the development of the method. The developed PCR reagents successfully detected low molecular weight, highly degraded mycobacterial DNA circulating in the blood and other tissues of patients with tuberculosis and mycobacteriosis. Exhaustive sampling of mycobacterial reference genomes from NCBI demonstrated the high potential specificity of the developed test. Using the virtual program Primer-BLAST, as well as manually using the Blastn service, it was shown that the developed method successfully discriminates species of the M. tuberculosis complex: M. tuberculosis; M. africanum; M. canettii; M. bovis; M. caprae; M. microti from 125 species of nontuberculous mycobacteria.

Key words: PCR-RT; TaqMan probes; Rv0440 gene; *M. tuberculosis* complex; nontuberculous mycobacteria

For citation: Ogarkov O.B., Sinkov V.V., Kondratov I.G., Zhdanova S.N., Orlova E.A., Khromova P.A. Development of a PCR-RT method for detection of tuberculous and non-tuberculous mycobacteria in clinical samples by polymorphism of gene heat shock protein. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (8): 421-426 (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-8-421-426>

For correspondence: Ogarkov O.B., MD., Ph.D., Dr.Sc., Head of Institute of Epidemiology and Microbiology, «Scientific Centre for Family Health and Human Reproduction Problems», Russia; e-mail: obogarkov@mail.ru

Information about authors:

Ogarkov O.B., <https://orcid.org/0000-0002-3168-1983>;
Sinkov V.V., <https://orcid.org/0000-0003-3396-9590>;
Kondratov I.G., <https://orcid.org/0000-0002-2631-4724>;
Zhdanova S.N., <https://orcid.org/0000-0001-7160-9700>;
Elizaveta A. Orlova, <https://orcid.org/0000-0003-2169-0242>;
Khromova P.A., <https://orcid.org/0000-0002-6449-5060>.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Received 05.06.2024

Accepted 24.06.2024

Published 01.08.2024

По оценкам ВОЗ, почти четверть населения мира инфицирована *Mycobacterium tuberculosis* (МБТ) [1]. Даже после пандемии COVID-19 туберкулёз (ТБ) остается ведущей причиной смертности от инфекционных заболеваний во всем мире [2]. Несмотря на то, что глобально общее количество случаев заражения МБТ снизилось, количество случаев заболеваний легких, вызванных нетуберкулезными условно-патогенными микобактериями (НТМ), возросло. На эту нозологию приходится более 90% клинических случаев заболеваний, вызванных НТМ [3]. В западной части РФ преобладающими видами НТМ, как и в большинстве стран мира, являются медленно растущие: *Mycobacterium avium* complex, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. lentiflavum*, *M. goodii* и быстрорастущие: *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. smegmatis* [4-6]. НТМ, циркулирующие в восточной части России менее изучены, однако, по всей видимости, спектр НТМ не отличается принципиально от западных регионов России и мира в целом [7]. Из-за уникального характера развития этой инфекции и характеристик заболевания НТМ обычно устойчивы к противотуберкулезным препаратам первого ряда [8]. Клиническая идентификация видов НТМ имеет решающее значение для определения тактики лечения и оценки устойчивости к антибиотикам этих возбудителей [9]. По нашему опыту быстрая лабораторная диагностика сепсиса, вызванного *M. avium*, в буквальном смысле спасла жизнь ВИЧ-инфицированному пациенту [10]. Одним из очевидных трендов в клинической лабораторной диагностике в области инфекционных заболеваний является применение современных молекулярно-биологических методов в клинической практике, в первую очередь метода ПЦР. Новейшим подходом в этой области является исследование свободно циркулирующей в жидкостях организма бесклеточной ДНК (сцДНК) для этиологического доказательства той или иной инфекции. Такого рода исследования приводились при пневмониях [11], туберкулезных плевритах [12], туберкулезных менингитах у детей

[13] и т.д. Нами ранее методом полногеномного секвенирования показано, что в моче коинфицированных ВИЧ-инфекцией и туберкулёзом (ВИЧ/ТБ) больных преобладают низкомолекулярные фрагменты микобактериальной ДНК длиной от 19 до 44 пар оснований [14]. Имеются данные о плевритах, вызванных нетуберкулезными микобактериями [15]. Цель настоящего исследования - разработка ПЦР метода с флуоресцентной детекцией в реальном времени для выявления туберкулезных и нетуберкулезных микобактерий в клиническом материале, в том числе за счет выявления свободно циркулирующей ДНК в крови, плевральной жидкости и других тканях и органах.

Материал и методы. Штаммы микобактерий получены с плотной питательной среды Левенштейна-Йенсена. Сбор и характеристика штаммов МБТ и НТМ в клиническом материале от больных с подозрением на микобактериоз проводилось, как описано ранее [7, 16]. При невозможности выделить ДНК в день взятия, инактивацию и консервацию патогенного материала осуществляли 50% изопропиловым спиртом с 1% СТАВ, согласно описанной ранее методике [17]. Выделение геномной ДНК из штаммов МБТ или НТМ и клинических образцов (мокрота, плевральная жидкость и т.д.) проводили набором ДНК-сорб-В (Интерлабсервис, Россия). Измерение концентрации ДНК осуществляли на флуориметре Qubit 4 (Thermo Fisher Scientific, США). Дизайн олигонуклеотидных праймеров и зондов разрабатывался самостоятельно, эти компоненты ПЦР синтезированы ЗАО «Синтол», остальные реагенты для ПЦР приобретались в виде готовых премиксов для ПЦР-РВ. Видовая идентификация выявленных МБТ или НТМ проводилась путем секвенирования по Сэнгеру полного рибосомального оперона 16S-ITS-23S или его фрагмента [7]. При биоинформационном анализе выровненных референсных геномов избегали использования нуклеотидных последовательностей элемента IS6110, поскольку он не является общим для всех штаммов микобактерий [18], по сходным причинам из выборки исключены после-

довательности гена *groB* [18]. Исследование не ставило целью проверки чувствительности и специфичности сходных тестов, разработанных другими исследователями [19]. Наиболее важной задачей при дизайне праймеров и зондов для ПЦР-РВ авторы видели в создании высокочувствительного теста, направленного на мишень менее 100 п.н. [14] и пригодного для анализа сцДНК микобактерий в крови и других жидкостях больных туберкулезом и микобактериозами. Представляет интерес тот факт, что проведенный биоинформационный анализ привел нас к использованию того же гена *Rv0440 (GroEL2)*, что изначально использовался для дифференцировки микобактерий путем

ПЦР с последующий рестрикционным анализом [20].

Структуры праймеров и зондов, температура отжига и размер ампликонов для индикации однонуклеотидных замен в позициях 529633A/C и 529636A/G относительно референсного генома *M. tuberculosis* NC_000962.3 приведены в табл. 1. Дизайн и анализ *in silico* праймеров и зондов выполнялся с помощью онлайн программ Blastn и Primer-BLAST NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>). Разработанные тесты с детекцией ПЦР-РВ испытывали на амплификаторе CFX (Bio-Rad), с набором BioMaster ОТ-ПЦР Премиум (БиоЛабМикс). Статистическую обработку результатов проводили в таблицах Excel.

Таблица 1

Праймеры и зонды, использованные для проведения исследования

Название гена и (позиция SNP в геноме)	Структура олигонуклеотида 5'→3'	Размер ампликона (п.н.)	Tm, °C	Позиция в геноме NC_000962.3	Примечание
<i>groEL2 (Rv0440)</i>	[FAM]-CCATCGCCGG A CG A GTGG-[BHQ1]	97	63	529623-529640	Зонд для индикации ДНК <i>M. tuberculosis complex</i>
	[R6G]-CCATCGCCGG C CG G GTG-[BHQ1]				Зонд для индикации ДНК иных микобактерий
	ACCAAGGACGAGACCACCAT			529577- 529596	Прямой праймер для амплификации ДНК фрагмента гена <i>groEL2</i>
	GAGTCGCTGTTCTCGATCTC			529655-529674	Обратный праймер для амплификации ДНК фрагмента гена <i>groEL2</i>

Для модельных экспериментов с деградированной ДНК использована смесь трех клинических штаммов МБТ генотипов Beijing (2 штамма) и LAM (1 штамм), смесь трех НТМ: *M. avium*, *M. gordonae*, *M. fortuitum*. Для моделирования процессов деградации ДНК в организме человека, смеси ДНК МБТ и НТМ фрагментировали NEBNext dsDNA фрагментазой (M0348, New England Biolabs) в соответствии с рекомендациями производителя. Для получения фрагментов в диапазоне длин 50-200 п.н., 10 нг ДНК инкубировали в буфере с фрагментазой при 37 °C в течение 35 минут. Инактивацию фермента осуществляли кратковременным прогревом смеси до 95 °C в течение 5 минут. ПЦР проводили в режиме: 5 минут - 95° для активации Taq полимеразы; 10 секунд - 95°, 10 с - 63°, 10 с - 72° с детекцией по каналам FAM и HEX на этапе отжига праймеров; 45 циклов. В качестве модели загрязняющего фона использована высокомолекулярная ДНК буккального соскоба здорового добровольца в конечной концентрации 1 нг в 1 мкл при проведении всех ПЦР-РВ. Температура отжига праймеров подобрана с учетом минимизации фоновой флуоресценции от неспецифической гибридизации зондов с ДНК человека.

Результаты. Приведенный в табл. 1 набор праймеров и зондов успешно испытан при работе с клиническим материалом в 2019-2023 годах на базе лаборатории Иркутской областной клинической туберкулезной больницы более чем на 200 клинических образцах (мокрота, ликвор, кровь, пунктаты лимфатических узлов)

[7, 10]. В 9 случаях получена чистая культура, и результат индикации НТМ подтвержден секвенированием рибосомального оперона *16S-ITS-23S* [7]. В одном случае [10] в плазме крови ВИЧ инфицированной больной разработанным тестом, однозначно показано наличие циркулирующих НТМ при отсутствии ДНК *M. tuberculosis complex*, выделена чистая культура и определен спектр лекарственной чувствительности и принадлежность штамма к *Mycobacterium avium subsp. hominissuis* [7]. Для верификации структуры праймеров и зондов и их теоретической специфичности относительно современных данных о референсных геномах микобактерий проведен исчерпывающий поиск с помощью онлайн программ Blastn и Primer-BLAST (NCBI). Поиск проводился с использованием критериев «Referred sequence representative genomes» по разделу «Mycobacteriales (taxid:85007)»

Таксоны *Mycobacterium tuberculosis complex*, определенные посредством виртуальной ПЦР программой Primer-BLAST, и вручную сервисом Blastn с разработанными праймерами и зондом (см. табл. 1) как *M. tuberculosis complex* (канал FAM): *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. canettii*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. microti*.

Исключения составили: *M. pinnipedii* (референс геномы GCF_002982275.1 и GCF_003027795.2 и др.); *M. mungi* (референс геном GCF_001652545.1); *M. orygis* (референс геном GCF_000353205.1) недоступны для анализа.

Таксоны *Mycobacterium/Mycobacteroides*, опреде-

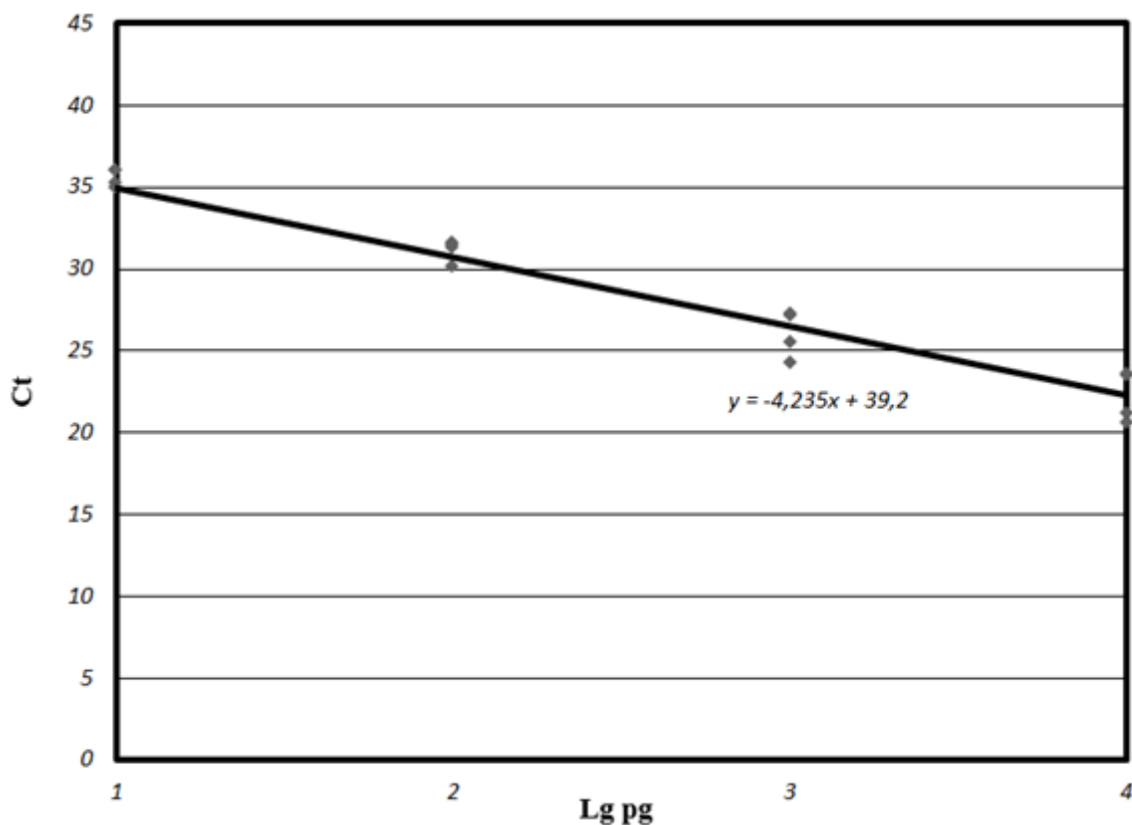
ленные посредством виртуальной ПЦР программой Primer-BLAST и вручную сервисом Blastn с праймерами и зондом (см. табл. 1) как НТМ (канал HEX): *M. abscessus*, *M. adipatum*, *M. ahvazicum*, *M. alsense*, *M. angelicum*; *M. aquaticum*; *M. arosiense*; *M. arupensis*; *M. asiaticum*; *M. attenuatum*; *M. avium*; *M. barrassiae*; *M. bouchedurhonense*; *M. bourgelatii*; *M. celatum*; *M. chelonae*, *M. colombiense*; *M. conspicuum*; *M. europaeum*; *M. genavense*; *M. gordonae*; *M. florentinum*; *M. hackensackense*; *M. heidelbergense*; *M. helveticum*; *M. innocens*; *M. intracellulare*; *M. interjectum*; *M. intermedium*; *M. kansatii*; *M. kubicae*; *M. kyogaense*; *M. kiyosense*; *M. lacus*; *M. lentiflavum*; *M. mantenii*; *M. marseillense*; *M. montefiorensis*; *M. nativiensis*; *M. nebraskense*; *M. numidiamassiliense*; *M. palustre*; *M. paraense*; *M. paragordonae*; *M. paraintracellulare*; *M. parmense*; *M. paraterrae*; *M. parascrofulaceum*; *M. paraseoulense*; *M. persicum*; *M. pinniadriaticum*; *M. rhizamassiliense*; *M. riyadhense*; *M. saopaulense*, *M. saskatchewanense*; *M. senriense*; *M. scrofulaceum*; *M. seoulense*; *M. sherrisii*; *M. shinjukuense*; *M. shimoide*; *M. shottsii*; *M. simulans*; *M. stomatepia*; *M. stomatepiae*; *M. szulgai*; *M. talmoniae*; *M. terramassiliense*; *M. tilburgii*; *M. timonense*; *M. tuberculosis*; *M. vicinigorona*.

Таксоны *Mycolicibacterium/Mycolicibacter*, определенные посредством виртуальной ПЦР программой Primer-BLAST и вручную сервисом Blastn с праймерами и зондом (см. табл. 1) как НТМ (канал HEX): *M. austroafricanum*; *M. agri*; *M. aichiense*;

M. algericus; *M. anyangense*; *M. arabiense*; *M. arenosum*; *M. aromaticivorans*; *M. aubagnense*; *M. aurum*; *M. brutae*; *M. canariasense*; *M. doricum*; *M. chlorophenicum*; *M. chubuense*; *M. cosmeticum*; *M. duvalii*; *M. elephantis*; *M. engbaekii*; *M. hassiacum*; *M. flavescens*; *M. fluoranthenvorans*; *M. fortuitum*; *M. gilvum*; *M. goodii*; *M. helvum*; *M. heraklionensis*; *M. hiberniae*; *M. hippocampi*; *M. iranikum*; *M. koreensis*; *M. kumamotoensis*; *M. longobardus*; *M. monacense*; *M. moriokaense*; *M. murale*; *M. nonchromogenicus*; *M. obuense*; *M. palauense*; *M. pallens*; *M. parafortuitum*; *M. parakoreensis*; *M. phlei*; *M. phocaicum*; *M. poriferae*; *M. pulveris*; *M. rufum*; *M. rutilum*; *M. sediminis*; *M. terrae*; *M. thermoresistibile*; *M. tokaiense*; *M. trivialis*; *M. vaccae*; *M. vanbaalenii*; *M. vinylchloridicum*; *M. vulneris*; *M. xanthum*; *M. wolinskyi*.

Исключения составили: *M. grossiae* и *M. deserti* для которых нуклеотидных последовательностей для гибридизации и праймеров и/или зонда для индикации ДНК иных микобактерий (канал HEX) в их геномах не обнаружено. По всей видимости, это связано с недостаточным качеством геномных последовательностей, представленных в NCBI.

Как видно из калибровочных данных, представленных на рисунке и в таблице 2 при концентрации ДНК МБТ в нативном виде (МБТ) или фрагментированном (МБТfr) и ДНК НТМ в нативном (НТМ) или фрагментированном (НТМfr) расхождение пороговых значений ПЦР-ПВ (Ct) статистически не значимы.



Графические значения калибровки ПЦР-ПРВ по нативной и деградированной ДНК микобактерий в присутствии высокомолекулярной ДНК человека. По оси ординат - Ct (пороговые значения в циклах реакции) ПЦР-ПВ, по оси абсцисс - количество в образце микобактериальной ДНК в пикограммах в каждой реакции, выраженное в десятичных логарифмах (Lg): 1 пг - 0, 10 пг - 1; 100 пг - 2; 1000 пг (1 нг) - 3; 10000 пг (10 нг) - 4.

Пороговые значения ПЦР-РВ при различных концентрациях нативной и деградированной ДНК МБТ и НТМ

Ст/концентрация	10 нг	1 нг	100 пг	10 пг	1 пг	ρ^*
МБТ	21,2	25,5	31,3	35	38	>0,05
МБТfr	23,6	27,3	31,6	36	39,3	
НТМ	20,6	24,3	30,1	35,3	37,8	
НТМfr	23,5	27,2	31,5	36	39,5	

Примечание. * - однофакторный дисперсионный анализ.

Обсуждение. Пятилетняя история применения разработанного ПЦР-РВ метода для быстрой дифференциальной диагностики МТБ и НТБ в клинических образцах с целью выявления больных микобактериозами при поступлении в туберкулезную больницу свидетельствует о востребованности теста и необходимости внесения такого рода разработок в клинические стандарты лечения больных туберкулезом. Основной проблемой лечения иммунокомпрометированных пациентов с микобактериозами в настоящее время является высокая вероятность ко-инфекции МБТ в процессе обследования по поводу подозрения на туберкулез в стационаре. С этой точки зрения, такого рода лабораторное обследование гораздо более целесообразно проводить в рамках поликлиник или Центров СПИД с целью минимизации контактов больных микобактериозами с больными туберкулезом. Ключевым вопросом такого рода разработок является высокая чувствительность и специфичность относительно ДНК мишени. Для высококонсервативного генома возбудителя туберкулеза подобрать специфическую нуклеотидную последовательность в большинстве случаев не составляет труда. Совершенно иная ситуация с диагностикой НТБ, потенциальный спектр которых постоянно расширяется в связи с открытием новых видов потенциально патогенных для иммунокомпрометированных лиц.

Заключение. Проведенные исследования свидетельствуют, что разработанные реактивы (праймеры и флуоресцентные зонды) для ПЦР-РВ теста позволяют с высокой специфичностью дифференцировать подавляющее большинство видов НТМ от МБТ. Чувствительность теста при этом составляет менее 1 пг ДНК на реакцию, что соответствует количеству менее 400 геном-эквивалентов микобактериальной ДНК на одну ПЦР реакцию (расчеты не приводятся), независимо от степени «загрязнения» образца ДНК человека.

ЛИТЕРАТУРА (ПП. 1-3, 7-15, 17-20 СМ. REFERENCES)

4. Эргешов А.Э., Шмелев Е.И., Ковалевская М.Н., Ларионова Е.Е., Черноусова Л.Н. Нетуберкулезные микобактерии у пациентов с заболеваниями органов дыхания (клинико-лабораторное исследование). *Пульмонология*. 2016; 26(3):303-08. DOI: 10.18093/0869-0189-2016-26-3-303-308.

5. Старкова Д. А., Журавлев В. Ю., Вязовая А. А., Соловьева Н. С., Куликова О. Н., Нарвская О. В. Видовое разнообразие нетуберкулезных микобактерий у больных микобактериозом на территориях Северо-Западного федерального округа России. *Туберкулёз и бо-*

лезни лёгких. 2019; (6):16-22. DOI: 10.21292/2075-1230-2019-97-6-16-22.

6. Макарова М.В., Гунтупова Л.Д. Нетуберкулезные микобактерии. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020; 20(2):97-102. DOI: 10.30895/2221-996X-2020-20-2-97-102.

7. Огарков О.Б., Жданова С.Н., Орлова Е.А., Хромова П.А., Белькова Н.Л., Синьков В.В., и др. Секвенирование 16S-ITS-23S фрагмента рибосомального оперона обеспечивает необходимые и достаточные условия для идентификации микобактерий. *Инфекция и иммунитет*. 2022; 12(5):976-80. DOI: 10.15789/2220-7619-ROS-1871.

16. Хромова П.А., Огарков О.Б., Жданова С.Н., Синьков В.В., Моисеева Е.Я., Цыренова Т.А., и др. Выявление высокотрансмиссивных генотипов возбудителя в клиническом материале для прогноза неблагоприятного течения туберкулёза *Клиническая лабораторная диагностика*. 2017; 62 (10): 622-7. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-10-622-627.

REFERENCES

1. Global tuberculosis report 2023. Geneva: World Health Organization; 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO. <https://www.who.int/publications/i/item/9789240083851>.

2. Togun T., Kampmann B., Stoker N.G., Lipman M. Anticipating the impact of the COVID-19 pandemic on TB patients and TB control programmes. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* 2020; 19(1):21. DOI: 10.1186/s12941-020-00363-1.

3. Koh W.J. Nontuberculous Mycobacteria-Overview. *Microbiol. Spec-tr.* 2017; 5(1). DOI: 10.1128/microbiolspec.TNMI7-0024-2016.

4. Ergeshov A.E., Shmelev E.I., Kovalevskaya M.N., Lariionova E.E., Chernousova L.N. Nontuberculous mycobacteria in patients with respiratory diseases (a clinical study). *Pul'monologiya*. 2016; 26(3):303-08. DOI: 10.18093/0869-0189-2016-26-3-303-308.

5. Starkova D.A., Zhuravlev V.Yu., Vyazovaya A.A., Solovieva N.S., Kulikova O.N., Narvskaya O.V. Species diversity of non-tuberculous mycobacteria in patients with mycobacteriosis in the North-Western Federal District of Russia. *Tuberkulyoz i bolezni legkikh*. 2019; 97(6):16-22. DOI: 10.21292/2075-1230-2019-97-6-16-22. (in Russian)

6. Makarova M.V., Guntupova L.D. Nontuberculous mycobacteria. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2020; 20(2):97-102. DOI: 10.30895/2221-996X-2020-20-2-97-102. (in Russian)

7. Ogarkov O. B., Zhdanova S. N., Orlova E. A., Khromova P. A., Belkova N. L., Sinkov V.V., et al. 16S-ITS-23S rRNA operon segment sequencing provides necessary and sufficient conditions for bacterial species-specific identification. *Infektsiya i immunitet*. 2022; 12(5): 976-80. DOI: 10.15789/2220-7619-ROS-1871. (in Russian)

8. Saxena S., Spaink H.P., Forn-Cuní G. Drug Resistance in Nontuberculous Mycobacteria: Mechanisms and Models. *Biology (Basel)*. 2021; 10(2):96. DOI: 10.3390/biology10020096.

9. Pennington K.M., Vu A., Challener D., Rivera C.G., Shweta F.N.U., Zeuli J.D., et al. Approach to the diagnosis and treatment of non-tuberculous mycobacterial disease. *J. Clin. Tuberc. Other. Mycobact. Dis.* 2021; 24:100244. DOI: 10.1016/j.jctube.2021.100244.

10. Ogarkov O., Zhdanova S.N., Sinkov V., Khromova P.A., Orlova E., Heysell S. Quantitative DST determination in a patient with sepsis

- from *M. avium* before isolation of strain. *Chest*. 2020; 157(S6). DOI: 10.1016/j.chest.2020.05.075
11. Bergin S.P., Chemaly R.F., Dadwal S.S., Hill J.A., Lee Y.J., Haidar G. et al. Plasma Microbial Cell-Free DNA Sequencing in Immunocompromised Patients With Pneumonia: A Prospective Observational Study. *Clin. Infect. Dis.* 2024; 78(3):775-84. DOI: 10.1093/cid/ciad599.
 12. Yang X., Che N., Duan H., Liu Z., Li K., Li H. et al. Cell-free *Mycobacterium tuberculosis* DNA test in pleural effusion for tuberculous pleurisy: a diagnostic accuracy study. *Clin. Microbiol. Infect.* 2020; 26(8):1089.e1-89.e6. DOI: 10.1016/j.cmi.2019.11.026.
 13. Li G., Cannon K., Sisniega C., Fergie J. Cell-free DNA blood test for the diagnosis of pediatric tuberculous meningitis. *J. Clin. Tuberc. Other. Mycobact. Dis.* 2024; 35:100421. DOI: 10.1016/j.jctube.2024.100421.
 14. Sinkov V.V., Ogarkov O.B., Plotnikov A.O., Gogoleva N.E., Zhdanova S.N., Pervanchuk V.L. et al. Metagenomic analysis of mycobacterial transrenal DNA in patients with HIV and tuberculosis coinfection. *Infect. Genet. Evol.* 2020; 77:104057. DOI: 10.1016/j.meegid.2019.104057.
 15. Bachar K., Shulimzon T., Segel M.J. Nontuberculous mycobacteria infections of the pleura: A systematic review. *Respir. Med.* 2022; 205:107036. DOI: 10.1016/j.rmed.2022.107036
 16. Khromova P.A., Ogarkov O.B., Zhdanova S.N., Sinkov V.V., Moiseva E.Y., Tzyrenova T.A., et al. The detection of highly-transmissible genotypes of agent in clinical samples for prognosis of unfavorable course of tuberculosis. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2017; 62(10):622-7. DOI: 10.18821/0869-2084-2017-62-10-622-627. (in Russian)
 17. Ogarkov O., Zhdanova S., Savilov E., Mokrousov I., Sinkov V., Antipina S. 'Lethal' combination of *Mycobacterium tuberculosis* Beijing genotype and human CD209 -336G allele in Russian male population. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012; 12(4): 732-36. DOI: 10.1016/j.meegid.2011.10.005.
 18. Zhou L., Ma C., Xiao T., Li M., Liu H., Zhao X., et al. A New Single Gene Differential Biomarker for *Mycobacterium tuberculosis* Complex and Non-tuberculosis Mycobacteria. *Front. Microbiol.* 2019; 10:1887. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01887.
 19. Ustinova V.V., Smirnova T.G., Sochivko D.G., Varlamov D.A., Larionova E.E., Andreevskaya S.N. et al. New assay to diagnose and differentiate between *Mycobacterium tuberculosis* complex and non-tuberculous mycobacteria. *Tuberculosis (Edinb)*. 2019; 114:17-23. DOI: 10.1016/j.tube.2018.10.004.
 20. Telenti A., Marchesi F., Balz M., Bally F., Böttger E.C., Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.* 1993; 31(2):175-8. DOI: 10.1128/jcm.31.2.175-178.1993.