

ПРИБОРОСТРОЕНИЕ ДЛЯ БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЫ

УДК 543.426,543.9

© А. П. Ткачук, А. Г. Алатырев, В. А. Пономарев, Д. В. Каникевич, Ю. К. Дзагоева,
А. А. Казюлина, Т. Е. Тюлькова, А. Г. Самойлова, И. А. Васильева, 2025

РАЗРАБОТКА И ЛАБОРАТОРНЫЕ ИСПЫТАНИЯ ОПЫТНОГО ОБРАЗЦА АВТОМАТИЗИРОВАННОГО УСТРОЙСТВА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Представлены результаты разработки и лабораторных испытаний опытного образца портативного автоматического прибора для экспресс-диагностики туберкулеза и определения лекарственной устойчивости возбудителя. Система состоит из анализатора и одноразового картриджа, содержащего все необходимые реагенты для пробоподготовки и проведения ПЦР. Протокол анализа предусматривает обработку мокроты (ультразвуковая обработка, лизис и экстракция ДНК с использованием магнитных частиц), последующую гнездовую ПЦР в режиме реального времени для детекции возбудителя туберкулеза (*Mycobacterium tuberculosis*) и анализ мутаций гена *rpoB* методом плавления зондов. В лабораторных испытаниях на образцах мокроты показано, что система успешно выявляет ДНК *Mycobacterium tuberculosis* (мишень IS6110) с высокой чувствительностью, в том числе в образцах с низкой бактериальной нагрузкой, и корректно идентифицирует мутации, обуславливающие устойчивость к рифампицину. При этом внутренний контроль подтверждает отсутствие ингибирования ПЦР. Точность результатов сопоставима со стандартным лабораторным ПЦР-анализом. Технологические преимущества системы включают полную автоматизацию "от образца до результата" (время анализа около 2 ч) и снижение риска контаминации за счет закрытого картриджа в сравнении с классическими методами молекулярно-генетического анализа. Разработанная платформа перспективна для прикроватной диагностики туберкулеза (исследования по месту нахождения пациента), включая мультирезистентные формы. Планируется расширение панели тестов для выявления устойчивости не только к рифампицину, но и к изониазиду и фторхинолонам.

Ключевые слова: туберкулез, молекулярная экспресс-диагностика, молекулярно-генетический тест, полимеразная цепная реакция, гнездовая ПЦР, одноразовый картридж, прикроватная диагностика, антибиотикорезистентность, рифампицин, изониазид, фторхинолоны, мокрота

ВВЕДЕНИЕ

По данным Глобального отчета Всемирной организации здравоохранения в 2023 г. в мире было зарегистрировано 10.8 млн новых случаев туберкулеза, а умерло 1.1 млн человек, что вновь вывело эту инфекцию на первое место по смертности среди инфекционных заболеваний [1]. Российская Федерация в 2021 г. покинула список стран с высоким бременем туберкулеза. Несмотря на это, распространение инфекции с лекарственной устойчивостью возбудителя остается вызовом для всего медицинского сообщества. Этому существенно способствовала пандемия COVID-19 [2]. По данным Федерального регистра больных туберкулезом, в 2021 г. было зарегистрировано 15 604 больных туберкулезом с подтвержденной устойчивостью как минимум к рифампицину [3]. Раннее выявление устойчивости к антимикробным

препаратам способствует своевременному назначению или коррекции противотуберкулезной химиотерапии.

Классические методы диагностики туберкулеза имеют ряд ограничений. Микроскопия мазка мокроты отличается невысокой чувствительностью, особенно при низком содержании микобактерий в пробе. Культуральный метод (посев) — "золотой стандарт" диагностики и определения лекарственной резистентности — обладает высокой чувствительностью, однако требует нескольких недель на рост культуры. В последние годы широкое распространение получили молекулярно-генетические методы диагностики, прежде всего полимеразная цепная реакция (ПЦР), позволяющие выявлять ДНК *Mycobacterium tuberculosis* в образцах пациента в течение считанных часов и определять мутации, ассоциированные с лекарственной

устойчивостью, например, в RRDR-области (81 пара нуклеотидов, участок гена *rpoB*).

Внедрение автоматизированных ПЦР-систем с одноразовыми картриджами (таких как Cepheid GeneXpert MTB/RIF) совершило революцию в диагностике туберкулеза [4, 5]. Система GeneXpert обеспечивает обнаружение *M. tuberculosis* и определение устойчивости к рифампицину в одном анализе за ~90 мин и рекомендована ВОЗ к применению во многих странах. Помимо GeneXpert, разработаны и применяются другие молекулярные тесты: линейные ДНК-зонды (Hain GenoType MTBDRplus и др.), изотермические амплификационные тесты, а также портативные ПЦР-приборы типа Molbio Truenat и др. Некоторые новые системы способны одновременно определять устойчивость к нескольким препаратам (например, Xpert MTB/XDR, FluoroType MTBDR, MeltPro и др.). Тем не менее многие из этих решений являются импортными и дорогостоящими, либо требуют лабораторной инфраструктуры. Актуальной задачей является создание отечественных портативных приборов для молекулярной диагностики туберкулеза, пригодных для использования в местах оказания медицинской помощи ("point-of-care"), на основе штаммов, циркулирующих на территории Российской Федерации [6, 7].

В данной работе описывается портативная автоматическая система молекулярно-генетической диагностики туберкулеза, разработанная для проведения анализа в одноразовых картриджах без участия оператора. Прибор обеспечивает полностью автоматическое выделение нуклеиновых кислот из клинического образца (мокроты или бронхоальвеолярного лаважа) и детекцию *M. tuberculosis* методом ПЦР в режиме реального времени, а также анализ мутаций ДНК возбудителя, ассоциированных с лекарственной устойчивостью. Целью разработки является создание автономной системы "проба-результат", способной значительно ускорить и упростить диагностику туберкулеза и выявление мультирезистентного туберкулеза в клинических условиях в сравнении с неавтоматизированными методами анализа. Настоящая статья представляет результаты испытаний опытного образца прибора и картриджа с необходимыми реагентами, включая оценку его диагностической эффективности (выявление *M. tuberculosis* в образцах мокроты) и способности идентифицировать мутации, обуславливающие устойчивость к основным противотуберкулезным препаратам — рифампицину, изониазиду и фторхинолонам для успешной терапии больных туберкулезом [8].

ОПИСАНИЕ КОНСТРУКЦИИ ПРИБОРА И РЕАГЕНТНОГО КАРТРИДЖА

Анализатор

Опытный образец анализатора представляет собой портативный прибор, рассчитанный на работу с одноразовым картриджем, внутри которого проводится анализ (рис. 1). Конструкция анализатора модульная: при установке картриджа он фиксируется в приборе в строго заданном положении относительно основных модулей — механизма поворота золотникового клапана, узла вертикального перемещения поршня и модуля термоциклирования с оптической системой детекции. Таким образом, анализатор выполняет сразу несколько функций: 1) приведение в действие встроенного в картридж микрофлюидного насоса (поворотного клапана с поршнем) для перекачивания жидкостей между камерами; 2) управление процессом экстракции ДНК (например, активация ультразвукового излучателя и подведение магнитного сепаратора); 3) обеспечение ПЦР-амплификации (нагрев/охлаждение ПЦР-чипа) и регистрацию флуоресцентного сигнала. Оптическая система прибора оснащена набором фотодетекторов по числу используемых флуоресцентных каналов; в опытном образце реализовано до пяти каналов детекции, что позволяет одновременно отслеживать несколько мишеней и контроль в режиме реального времени. Предусмотрено программное обеспечение для управления всеми этапами анализа и автоматической интерпретацией результатов амплификации.

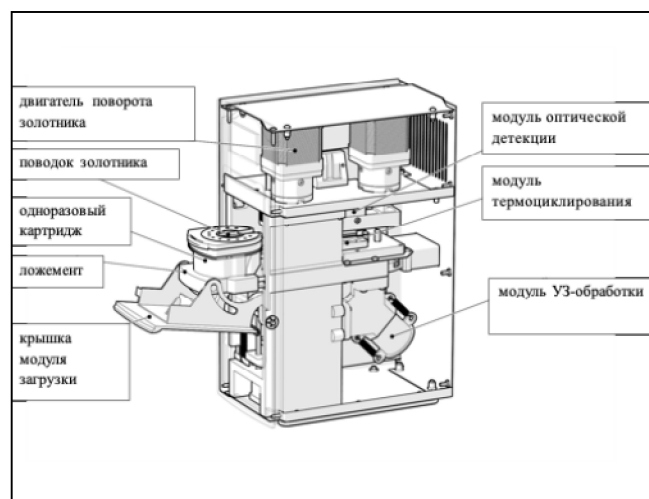


Рис. 1. Общая схема устройства анализатора для молекулярной диагностики туберкулеза и других инфекционных заболеваний.

Картридж

Одноразовый картридж — это полимерное изделие, внутри которого размещен полный комплект реагентов, необходимых для анализа. Конструкция картриджа включает три ключевых узла (рис. 2): 1) набор функциональных ячеек-резервуаров (включая ячейку для внесения пробы и ячейки, содержащие реагенты — лизирующий буфер, промывочные растворы, элюирующий буфер, лиофилизированные реагенты для ПЦР, а также отдельную реакторную ячейку для проведения ПЦР); 2) микрофлюидный ПЦР-чип, герметично соединенный с ячейками; 3) поворотный золотниковый клапан, осуществляющий перемещение жидкостей между ячейками. Картридж загружается оператором в прибор вручную; после этого все стадии анализа выполняются автоматически. Перед началом анализа картридж герметично закрывается в приборе, производится тест на отсутствие утечки (подача воздуха под давлением в ПЦР-ячейки) и инициализация системы. В резервуарах картриджа находятся реагенты: универсальный буфер для ликвидации и лизиса мокроты (средство для разжижения и инактивации биоматериала), магнитные микрочастицы с функционализированной поверхностью для сорбции ДНК, промывочные буферы для очистки выделенных нуклеиновых кислот, элюент для десорбции ДНК, а также ПЦР-смеси (праймеры, зонды, термостабильная ДНК-полимераза, дезоксинуклеотиды и пр.) для амплификации целевого фрагмента ДНК *M. tuberculosis* и внутренних контролей. В состав тест-системы включен внутренний контроль (ВКО). Наличие ВКО позволяет контроли-

ровать эффективность всех этапов — от лизиса до амплификации — и отслеживать возможное ингибирование ПЦР в каждом образце. Отличительной особенностью картриджа является интегрированный микрофлюидный ПЦР-чип, представляющий собой миниатюрный блок с одним или несколькими ПЦР-реакторами (лунками), в которых происходит амплификация ДНК в замкнутом объеме. После заполнения реакционной смеси ПЦР-лунка автоматически герметизируется в картридже, что исключает испарение и контаминацию. Стоит отметить, что в процессе разработки конструкция картриджа оптимизировалась: в частности, была усовершенствована форма и механизм золотникового клапана для обеспечения многостадийной (гнездовой) ПЦР без риска распространения ампликонов. Первоначальный вариант клапана имел открытый сектор, из-за чего после первой фазы ПЦР одна из лунок оставалась открытой, увеличивая вероятность контаминации прибора ампликонами. В опытном образце клапан доработан — он полностью перекрывает вентиляционные каналы во время переноса жидкостей, благодаря чему каждая ПЦР-лунка остается закрытой после заполнения и риск контаминации ампликонами сведен к минимуму.

ПРОТОКОЛ АВТОМАТИЧЕСКОГО АНАЛИЗА ОТ ОБРАЗЦА ДО РЕЗУЛЬТАТА

Анализ выполняется по предварительно запрограммированному протоколу. Ниже описаны основные этапы обработки клинического образца мокроты внутри системы.

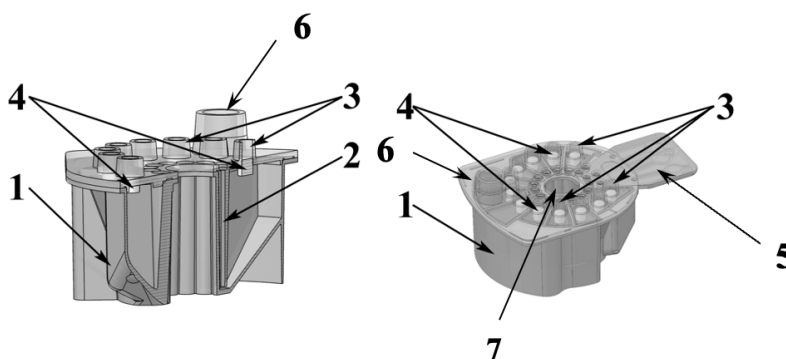


Рис. 2. Общий вид картриджа устройства для автоматического выделения, очистки и амплификации участков ДНК *M. tuberculosis* с регистрацией результатов в режиме реального времени.

1 — основание с емкостями-резервуарами; 2 — крышка с капиллярами для движения жидкости; 3 — вентиляционные колодцы; 4 — фильтрующий элемент; 5 — ячейки для проведения ПЦР; 6 — крышка и отверстие под ней (порт) для введения пробы; 7 — поворотный клапан

Загрузка пробы

Врач или лаборант вручную собирает образец мокроты пациента в стерильный контейнер. Перед загрузкой в картридж мокроту предварительно смешивают со специальным лизирующим буфером в соотношении 1 : 2 и инкубируют около пяти минут при комнатной температуре для разжижения вязкого материала. Полученную обработанную смесь (в объеме 2.0–2.5 мл) набирают дозатором или одноразовой пипеткой Пастера и вносят в приемную камеру картриджа через специальное загрузочное отверстие под крышкой. После этого картридж помещается в анализатор, крышка прибора закрывается — запускается автоматический цикл анализа.

Лизис и высвобождение ДНК

В автоматической системе реализован метод выделения нуклеиновых кислот, описанный R. Voort и соавторами [9], с модификациями. Прямо в картридже осуществляется обработка образца для инактивации микобактерий и освобождения их ДНК. К реакторной ячейке, куда поступает образец, вплотную прилегает ультразвуковой излучатель. Анализатор генерирует серию ультразвуковых импульсов, передаваемых через стенку ячейки: длительность импульса ~1 с, пауза 1 с, суммарно около 40–60 импульсов. Такая ультразвуковая соникация приводит к механическому разрушению клеток *M. tuberculosis*, разжижению мокроты и повышению выхода ДНК. Согласно проведенной нами оценке, применение ультразвука в картридже позволяет увеличить количество выделенной микобактериальной ДНК примерно в 10 раз по сравнению с несонированным образцом. Вышеописанная обработка инактивирует микобактерии, что повышает биобезопасность анализа и снижает ингибирование ПЦР.

Экстракция ДНК с использованием магнитных частиц

После этапа лизиса прибор переходит к автоматическому выделению нуклеиновых кислот. В картридже предусмотрены магнитные микро-частицы (ММЧ) со специальным покрытием, способным связывать ДНК. Анализатор посредством встроенного вращающегося клапана и поршня последовательно распределяет жидкость из реактора по другим камерам картриджа: сначала образец смешивается с магнитными частицами, затем частицы с адсорбированной ДНК переносятся в промывочную камеру. Для перемещения жидкостей используется поворотный золотниковый кла-

пан: он ориентируется над нужной ячейкой, поршень внутри клапана опускается, выгружая из ячейки заданный объем жидкости за счет создаваемого отрицательного давления, затем клапан поворачивается к целевой ячейке и поршень выдавливает жидкость. Таким образом, реализуется функция своеобразного микрошприца. В промывочной ячейке прибор с помощью постоянного магнита, подводимого к внешней стороне картриджа, удерживает магнитные частицы с ДНК на стенке, тогда как жидкость отбирается клапаном и удаляется. Последовательно выполняется несколько этапов промывки — введение промывочных буферов и их удаление — для очистки сорбированной ДНК от ингибиторов и примесей. После промывок частицы переводятся во вторую камеру, где осуществляется элюция ДНК: добавляется небольшой объем элюента, в котором нуклеиновые кислоты десорбируются с частиц. Затем очищенный элюат с ДНК микобактерий загружается в ПЦР-камеру с лиофилизированными реагентами для амплификации.

Амплификация (гнездовая ПЦР)

Полученная реакционная смесь (элюат с ДНК + реагенты) автоматически разливается по ПЦР-лункам микрофлюидного чипа картриджа. В опытном образце реализована двухстадийная гнездовая ПЦР (nested PCR) для повышения чувствительности. Для этого в картридже предусмотрены по крайней мере две ПЦР-ячейки: в одной происходит 1-я фаза ПЦР — первичное воспроизведение ДНК-мишени с использованием внешних праймеров; затем часть полученных ампликонов автоматически переносится во вторую ячейку, где готовится смесь для 2-й фазы ПЦР с внутренними (nested) праймерами. Двухфазная амплификация позволяет детектировать даже единичные копии ДНК *M. tuberculosis* и частично нивелировать влияние возможных ингибиторов, остающихся в пробе после экстракции. В финальной конфигурации протокола каждая фаза ПЦР проводилась в 30 циклов, продукты 1-й фазы разбавлялись приблизительно в пропорции 1 : 200 для 2-й фазы. Термальный профиль ПЦР (температурные режимы денатурации, отжига и элонгации) аналогичен стандартным ПЦР в режиме реального времени. Временные затраты на оба этапа амплификации и промежуточный перенос невелики, и полный цикл анализа укладывается в пределах двух часов. После заполнения каждой ПЦР-лунки клапан картриджа поворачивается в положение герметизации, исключая контакт лунки с внешней средой во время амплификации.

Детекция и интерпретация результатов

Термоциклирование в ПЦР-чипе сопровождается регистрацией флуоресцентного сигнала в реальном времени. В тест-системе целевой фрагмент ДНК *M. tuberculosis* — это мультикопийная последовательность *IS6110*, амплификация которой детектируется по каналу FAM (используется зонд с меткой FAM). Одновременно во втором канале (например HEX) регистрируется амплификация ДНК внутреннего контроля (ВКО). Программное обеспечение анализатора строит кривые накопления продукта; по достижении порогового уровня флуоресценции выводится результат ПЦР: положительный (обнаружено *IS6110*) или отрицательный (не обнаружено, при условии положительной реакции ВКО). В случае двухстадийной ПЦР на выходе формируется сводный вывод с учетом обеих фаз. Для определения лекарственной устойчивости к рифампицину реализован дополнительный анализ продуктов амплификации гена *rpoB*. После завершения ПЦР прибор выполняет анализ кривых плавления зондов (melt curve analysis) для выявления точечных мутаций в RRDR-области. В тестовой системе применены несколько зондов молекулярных маяков, комплементарных различным участкам RRDR; изменения температур плавления этих зондов при связке с ампликоном указывают на присутствие мутации. Например, для мутантов с заменой *Ser531Leu* (одна из самых частых мутаций рифампицин-устойчивого туберкулеза, ~75% случаев) характерно увеличение температуры плавления зонда Р-4 на 6.9 °С по сравнению с диким типом. Анализатор регистрирует кривые плавления в нескольких оптических каналах, соответствующих каждому отдельному зонду, и сопоставляет полученные значения температуры плавления T_m с эталонными для дикого типа. На основе этого определяется, присутствует ли мутация в RRDR и какого рода (в границах детектируемых позиций 516, 526, 531 и др.). Результат по устойчивости к рифампицину выдается в формате: "рифампицин-устойчивый" (при обнаружении мутации) либо "рифампицин-чувствительный" (мутация не обнаружена). На этапе опытного образца метод продемонстрировал работоспособность и показал перспективность для распространения на другие препараты. Аналогичным образом планируется реализовать детекцию мутаций генов *katG/inhA* (изониазид) и *gyrA* (фторхинолоны), т.е. расширить одноразовый картридж дополнительными реагентами/зондами для одновременного определения нескольких мутаций, ассоциированных с устойчивостью к нескольким антибиотикам в рамках одного анализа, что продиктовано потребностью практического здравоохранения [10].

МЕТОДИКА ИСПЫТАНИЙ И ОБЪЕКТЫ

Объекты исследований

Лабораторные испытания опытного образца прибора проводились на клинических пробах мокроты, полученных от пациентов с подтвержденным диагнозом "туберкулез легких" с их согласия по установленной форме Локальным этическим комитетом ФГБУ "НМИЦ ФПИ" Минздрава РФ. В частности, в исследование включались пробы мокроты от больных, у которых присутствие *M. tuberculosis* ранее было подтверждено методами ПЦР (тест-система "Амплитуб-РВ") и/или культурально, а также пробы от условно здоровых доноров (отрицательные по туберкулезу). Все образцы до постановки теста хранились в холодильнике (+4 °С) не более 1–2 суток или замораживались при –20 °С для последующего анализа. Перед загрузкой в прибор мокрота смешивалась с универсальным лизирующим буфером 1 : 2, как описано выше. Анализы проводились на базе лаборатории молекулярно-биологических методов ФГБУ "НМИЦ ФПИ" Минздрава РФ.

Испытание на обнаружение *M. tuberculosis*

Для оценки работоспособности системы в режиме детекции возбудителя туберкулеза были отобраны как положительные, так и отрицательные клинические образцы. Часть положительных проб имела высокую бактериальную нагрузку, другие — низкую (единичные бактерии, положительные только культурально или ПЦР). Всего на опытном приборе протестировано 6 образцов мокроты и 5 образцов бронхо-альвеолярного лаважа (БАЛ) для идентификации *M. tuberculosis*. Каждый образец параллельно анализировали референтным методом — ПЦР в режиме реального времени на коммерческом наборе ("Амплитуб-РВ") с экстракцией ДНК методом фенол-хлороформ или на колонках.

Испытание на выявление мутаций лекарственной устойчивости

Для проверки работоспособности системы в режиме определения устойчивости к рифампицину была сформирована выборка из 20 образцов мокроты, содержащих рифампицин-устойчивые штаммы *M. tuberculosis* (мутации в RRDR *rpoB*), что подтверждалось стандартным ПЦР-анализом "Амплитуб-РВ" и секвенированием. В данную группу вошли клинические пробы от больных с установленным диагнозом МЛЮ-ТБ (множественная лекарственная устойчивость туберкулеза), большинство из которых имели известные мутации *rpoB* (*S531L*, *H526D/Y* и др.). Кроме того,

тестировались несколько образцов с лекарственно-чувствительным туберкулезом (дикий тип *groV*) для контроля специфичности. Все пробы анализировались на опытном приборе с использованием одноразовых картриджей, оснащенных экспериментальным набором реагентов для выявления мутаций *groV* (4 молекулярных зонда по числу основных целевых позиций мутаций). Результаты прибор сравнивал с эталонными данными по каждому образцу.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ АНАЛИЗ

Детекция *M. tuberculosis*

В ходе лабораторных испытаний опытный прибор продемонстрировал способность надежно обнаруживать ДНК возбудителя туберкулеза в образцах мокроты или БАЛ. Все протестированные положительные пробы, содержавшие *M. tuberculosis*, дали положительный результат на приборе, отрицательные контрольные пробы — отрицательный (при этом в них успешно амплифицировался ВКО). В табл. 1 приведены данные серии параллельных испытаний опытного образца: результаты анализов на приборе сопоставлены с данными референтного ПЦР-теста. Как видно, наблюдается полное соответствие — прибор не дал ни одного ложного результата в данной выборке. В частности, образец с низкой концентрацией МБТ (№ 2609243) был определен как положительный как нашим прибором, так и референтным методом. Отрицательные по туберкулезу образцы (например, № 2609241) корректно иденти-

фицированы прибором как отрицательные (при наличии сигнала ВКО).

Таким образом, чувствительность и специфичность детекции *M. tuberculosis* на опытном образце, по предварительным оценкам, находятся на уровне 100% по сравнению с лабораторной ПЦР, однако точные показатели будут установлены на расширенной выборке в рамках клинических испытаний.

Выявление мутаций устойчивости к рифампицину

Опытный образец системы успешно прошел проверку на способность идентифицировать мутации, связанные с лекарственной устойчивостью микобактерий. В 20 проанализированных прибором рифампицин-устойчивых образцах мокроты во всех случаях были зафиксированы изменения кривых плавления зондов, свидетельствующие о наличии мутаций в участке *groV*.

Полученные типы сдвигов температуры плавления соответствовали конкретным мутациям: так, сдвиг температуры плавления по зонду Р-2 характерен только для мутации *Asp516Tyr*. Сдвиг T_m по Р-3 возникает при наличии мутаций в кодонах 526 и 531. Для дифференцировки мутаций по 526 и 531 кодону необходимо сравнение с T_m Р-4: сдвиг по Р-4 возникает только при мутациях в кодонах 531 и 533, следовательно, при отсутствии сдвига T_m по Р-4 сдвиг T_m по Р-3 характерен только для мутаций в 526 кодоне. Все результаты, полученные на приборе, совпали с данными референс-методов: мутации *groV* были обнаружены во всех заведомо резистентных образцах и отсутствовали в заведомо чувствительных.

Табл. 1. Сводные данные анализа образцов мокроты и БАЛ с помощью разработанного набора реагентов в автоматическом анализаторе

№ образца	Результат по данным микробиологического анализа. Наличие МБТ/нагрузка	Результат анализа, полученный на опытном образце (в ПЦР-ячейках)		Соответствие результатов
		ВКО	MTB (IS6110)	
2609241	– / отсутствует	+	–	соответствует
2609242	+/ высокая	+	+	соответствует
2609243	+/ низкая	+	+	соответствует
2609244	+/ высокая	+	+	соответствует
2709241	– / отсутствует	+	–	соответствует
2709242	– / отсутствует	+	–	соответствует
5902230050	+/ низкая	+	+	соответствует
5902230067	+/ низкая	+	+	соответствует
1002230046	– / отсутствует	+	–	соответствует
1602230072	+/ низкая	+	+	соответствует
2102230038	+/ высокая	+	+	соответствует

Табл. 2. Результаты детекции мутаций путем сравнения температур T_m плавления зондов, связанных с амплифицированным участком RRDR гена *rpoB*

Мутации в кодонах	Температуры плавления гибридных зондов					
	P-2		P-3		P-4	
	$T_m, ^\circ\text{C}$	$(\Delta T_m, ^\circ\text{C})^*$	$T_m, ^\circ\text{C}$	$\Delta T_m, ^\circ\text{C}$	$T_m, ^\circ\text{C}$	$\Delta T_m, ^\circ\text{C}$
Без мутаций (чувствительны к риф- ампицину)	70.4	—	71.7	—	63.7	—
516 Asp/Tyr	66.2	— 4	71.7	—	63.4	—
526 His/Arg	70.6	—	69.7	—2.0	64.8	—
526 His/Asn	70.0	—	68.2	—3.5	64.2	—
526 His/Leu	69.6	—	67.8	—3.9	64.2	—
531 Ser/Leu	71.0	—	69.4	—2.3	70.6	+6.9
533 Leu/Pro	69.8	—	71.6	—	58.5	—5.2

* — указана разница относительно температуры плавления зондов с образца без мутаций.

Более того, использование нескольких зондов позволило предварительно дифференцировать конкретные варианты мутаций. Обработанные усредненные данные по температуре плавления для разных типов мутаций приведены в табл. 2.

Таким образом, методика анализа кривых плавления в картридже продемонстрировала работоспособность при идентификации основных мутаций рифампициновой устойчивости *M. tuberculosis*.

ОБСУЖДЕНИЕ

Оценка результатов испытания прибора

Результаты испытаний опытного образца прибора и картриджа с набором реагентов подтверждают принципиальную реализуемость концепции "автоматическая лаборатория в картридже" применительно к диагностике туберкулеза. Система продемонстрировала высокую чувствительность в обнаружении *M. tuberculosis* ДНК — использование гнездовой ПЦР позволило достигнуть порога детекции, сопоставимого с лучшими коммерческими тестами. По нашим данным, при помощи гнездового подхода в сочетании с ультразвуковым лизисом удастся выявлять порядка 10^2 – 10^3 копий микобактериальной ДНК в пробе объемом ~1 мл (что эквивалентно ~1–10 микобактериям в поле зрения мазка). Это особенно важно для диагностики скрытых форм туберкулеза и внегочного туберкулеза. Специфичность метода также находится на высоком уровне: праймеры и зонды системы нацелены на уникальную инсерционную последовательность IS6110, присутствующую только у микобактерий туберкулеза, что исключает

ложноположительные реакции. В испытаниях не отмечено ни одного случая ложноположительной детекции *M. tuberculosis* — все отрицательные пробы дали отрицательный результат при корректном срабатывании внутреннего контроля.

Отдельного внимания заслуживает обсуждение возможностей прибора в плане определения лекарственной устойчивости. В представленном опытном образце реализовано выявление устойчивости к рифампицину — ключевому препарату, по которому, как правило, судят о мультирезистентности туберкулеза. Методика основана на принципе выявления мутаций в горячей точке гена *rpoB*, который давно зарекомендовал себя как надежный молекулярный маркер: более 95% штаммов, устойчивых к рифампицину, несут мутации именно в RRDR *rpoB* [11]. Наш подход с анализом кривых плавления зондов аналогичен, по сути, используемому в Xpert MTB/RIF и других системах (Hain, Genoscholar и т.д.), но имеет и преимущества, например, несколько зондов позволяют дифференцировать разные мутации, что дает дополнительную информацию о профиле резистентности. Предварительные испытания показали полное соответствие результатов определению *rpoB*-мутаций референсными методами, т.е. высокую специфичность и чувствительность определения рифампициновой устойчивости.

Возможности определения устойчивости к изониазиду и фторхинолонам

На этапе опытного образца в тест-системе полностью реализована только детекция мутаций гена *rpoB*. Тем не менее, методические подходы, заложенные в систему, позволяют аналогичным образом выявлять и другие мутации лекарственной

устойчивости *M. tuberculosis*. Принцип основан на амплификации определенных участков генома микобактерий с последующим анализом продуктов с помощью специфических олигонуклеотидных зондов. В частности, для изониазида такими мишенями являются мутации гена *katG* (позиция Ser315Thr) и промотора *inhA*, а для фторхинолонов — мутации в *gyrA* (т.н. QRDR-область). В перспективе предполагается дополнить картридж реагентами (праймерами и зондами) для детекции данных мутаций, что превратит систему в мультитестовую, аналогичную по функционалу лучшим зарубежным образцам (наподобие Xpert MTB/XDR или гибридного анализа).

Наша система изначально создавалась модульной и гибкой: оптический блок с пятью каналами детекции позволяет при наличии соответствующих реагентов параллельно амплифицировать несколько мишеней. Добавление еще 1–2 ПЦР-реакций (например, для генов *katG*, *gyrA*) в картридж не представляет принципиальных затруднений, учитывая запас по числу ПЦР-лунок и каналов детекции. Таким образом, в дальнейшем прибор может быть доработан до уровня платформы для диагностики туберкулеза с широкой панелью лекарственной устойчивости, вплоть до определения мультирезистентного и экстремально резистентного туберкулеза (МЛУ/ШЛУ-ТБ) в одном анализе. Проведенные нами предварительные эксперименты подтверждают, что разработанный прибор и программное обеспечение готовы к расширению панели. Так, ПЦР-метод с использованием зондов на других генах микобактерий (например, *katG*) успешно апробирован на макете прибора, и ожидается его внедрение в следующей версии тест-системы. Таким образом, созданная платформа обладает высоким потенциалом для комплексной диагностики лекарственно-устойчивого туберкулеза.

Технологические преимущества разработанной системы включают не только ее диагностические характеристики, но и удобство использования и безопасность. Прибор рассчитан на применение непосредственно в местах оказания помощи (в смотровом кабинете, процедурной, и т.п.), т.е. по концепции point-of-care. Оператору не требуется выполнять сложных манипуляций — достаточно поместить пробу мокроты в картридж и запустить анализ. Все потенциально опасные этапы (лизис, инаktivация патогена, амплификация) происходят внутри закрытого картриджа, что минимизирует риск инфицирования персонала и контаминации помещения возбудителем или ампликонами. После завершения анализа использованный картридж может быть безопасно утилизирован как инфекционный отход. Предусмотрена возможность встроенной дезинфекции лотка при-

борного отсека после извлечения картриджа (например, посредством УФ-излучения или обработкой дезраствором), что дополнительно обеспечивает эпидемиологическую безопасность при серийном использовании прибора.

Автономность и мобильность прибора также являются значимыми преимуществами. Анализатор имеет относительно небольшие размеры и вес, может транспортироваться в переносном кейсе. Энергопотребление невысоко; возможно питание как от сети ~220 В, так и от портативного источника (аккумулятора), что важно для полевых условий. Все реагенты стабилизированы в картридже (лиофилизированы), срок их хранения при комнатной температуре составляет не менее нескольких месяцев, а при холодильном хранении — 1 год и более (эти параметры еще уточняются). Таким образом, систему можно применять в отдаленных регионах, мобильных противотуберкулезных лабораториях, при обследовании мигрантов, заключенных и др., где развертывание полноценной лаборатории затруднительно.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В рамках настоящей работы разработан и изготовлен опытный образец автоматизированной системы для молекулярно-генетической диагностики туберкулеза, включающей портативный анализатор и одноразовый картридж с реагентами. Лабораторные испытания подтвердили работоспособность системы: она успешно выделяет ДНК *M. tuberculosis* из нативных образцов мокроты и БАЛ и обнаруживает целевой фрагмент методом гнездовой ПЦР-РВ, обеспечивая чувствительность, сопоставимую с традиционными методами. Встроенный внутренний контроль и оптимизация протокола позволили добиться высокой надежности результатов даже на сложных образцах. Реализован также метод молекулярной детекции рифампицин-резистентности микобактерий — идентификация мутации гена *rpoB* по изменению температуры плавления специальных зондов, — который показал полное соответствие данным референсного анализа.

Полученные результаты демонстрируют существенные технологические преимущества предлагаемой системы. Полная автоматизация всех этапов — от лизиса образца до выдачи результата — устраняет влияние человеческого фактора и сокращает время получения диагноза до 2 ч. Использование формата "картридж" обеспечивает максимальную простоту и безопасность работы, а портативность прибора — возможность проводить диагностику непосредственно у постели пациента или в полевых условиях (прикроватный тест). Таким образом, данный прибор может найти

широкое применение в фтизиатрической практике: для экспресс-выявления туберкулеза у лиц с подозрением на заболевание, скрининга на туберкулез в популяциях высокого риска, оперативного определения лекарственной устойчивости (что особенно важно при МЛУ-ТБ) и т. д.

В перспективе развитие данной платформы будет продолжено. Предстоят ее клиническая оценка в многоцентровом исследовании, доработка конструкции с целью подготовки к промышленному производству, а также расширение возможностей тестирования. Планируется внедрение в картридж дополнительных реакций для определения устойчивости к изониазиду, фторхинолонам и другим ключевым препаратам, что сделает систему полноценным инструментом персонифицированной диагностики туберкулеза. Учитывая стратегическую важность борьбы с туберкулезом и рост доли лекарственно-устойчивых форм, предлагаемая отечественная разработка имеет большие шансы занять нишу в ряду передовых диагностических технологий и внести вклад в улучшение эпидемиологической ситуации по туберкулезу. Описываемая разработка демонстрирует глубинное влияние новых научных знаний и достижений на отраслевое приборостроение.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Organization, 2024. Global tuberculosis report 2024. Geneva: World Health. 69 p. URL: <https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/7292c91e-ffb0-4cef-ac39-0200f06961ea/content>
2. Васильева И.А., Тестов В.В., Стерликов С.А. Эпидемиологическая ситуация по туберкулезу в годы пандемии COVID-19 — 2020–2021 гг. // Туберкулез и болезни легких. 2022. Т. 100, № 3. С. 6–12. DOI: 10.21292/2075-1230-2022-100-3-6-12
3. Васильева И.А., Тестов В.В., Стерликов С.А., Бурыхин В.С., Кудрина В.Г., Урушадзе Н.Д. Факторы риска летального исхода у больных туберкулезом с устойчивостью к рифампицину по данным федерального регистра лиц, больных туберкулезом // Туберкулез и болезни легких. 2024. Т. 102, № 6. С. 40–47. DOI: 10.58838/2075-1230-2024-102-6-40-47
4. Chakravorty S., Simmons A.M., Rowneki M., et al. 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. Vol. 8, no. 4. DOI: 10.1128/mbio.00812-17
5. Walzl G., McNerney R., du Plessis N., Bates M., McHugh T.D., Chegou N.N., Zumla A. Tuberculosis: advances and challenges in development of new diagnostics and biomarkers // Lancet Infect Dis. 2018. Vol. 18, no. 7. P. e199–e210. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30111-7
6. Беляев Д.В., Умпелева Т.В., Дианов Д.В., Лавренчук Л.С., Ботева Т.Ю., Вахрушева Д.В. Фенотипическая устойчивость к рифампицину у *Mycobacterium tuberculosis* с мутацией *rpoB* Leu430Pro // Туберкулез и болезни легких. 2024. Т. 102, № 5. С. 64–69. DOI: 10.58838/2075-1230-2024-102-5-64-69
7. Umpeleva T., Chernikova E., Belyaev D., Ereemeeva N., Boteva T., Golubeva L., Vakhrusheva D.V., Vasilyeva I.A. Identification of genetic determinants of bedaquiline resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Ural region, Russia // Microbiology spectrum. 2024. Vol. 12, no. 3. Id. e0374923. P.1–5. DOI: 10.1128/spectrum.03749-23
8. Бурмистрова И.А., Ваниев Э.В., Самойлова А.Г., Ловачева О.В., Васильева И.А. Нарастание спектра лекарственной устойчивости возбудителя на фоне неадекватной химиотерапии туберкулеза легких // Туберкулез и болезни легких. 2019. Т. 97, № 8. С. 46–51. DOI: 10.21292/2075-1230-2019-97-8-46-51
9. Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M., van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids // J. Clin. Microbiol. 1990. Vol. 28, no. 3. P. 495–503. DOI: 10.1128/jcm.28.3.495-503.1990
10. Васильева И.А., Самойлова А.Г., Эргешов А.Э., Багдасарян Т.Р., Черноусова Л.Н. Химиотерапия туберкулеза: проблемы и перспективы // Вестник Российской академии медицинских наук. 2012. Т. 67, № 11. С. 9–14. DOI: 10.15690/vramn.v67i11.465
11. Umpeleva T., Belyaev D., Dianov D., Lavrenchuk L., Boteva T., Vakhrusheva D. Mutations outside RRDR lead to increased MICs for *M. tuberculosis* isolated with “borderline” *rpoB* mutations // African Journal of Biological Sciences. 2024. Vol. 6, No. 8. P. 2778–2782. URL: <https://www.afjbs.com/issue-content/mutations-outside-rrdr-lead-to-increased-mics-for-m-tuberculosis-isolates-with-borderline-rpoB-mutations-3077>

ФГБУ "НМИЦ фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний" Минздрава России, Москва, Российская Федерация (Ткачук А.П., Алатырев А.Г., Казюлина А.А., Тюлькова Т.Е., Самойлова А.Г., Васильева И.А.)

ООО "Троицкий инженерный центр", Москва, ТиНАО, Российская Федерация (Пономарев В.А., Каникевич Д.В., Дзгоева Ю.К.)

Контакты: Ткачук Артем Петрович,
artem.p.kachuk@gmail.com

Материал поступил в редакцию 02.08.2025

DEVELOPMENT AND LABORATORY TESTING OF A PROTOTYPE AUTOMATED DEVICE FOR TUBERCULOSIS DIAGNOSIS USING REAL-TIME PCR

A. P. Tkachuk¹, A. G. Alatyrev¹, V. A. Ponomarev², D. V. Kanikevich², Yu. K. Dzagoeva²,
A. A. Kazulina¹, T. E. Tyulkova¹, A. G. Samoylova¹, I. A. Vasilyeva¹

¹National Medical Research Center of Phthisiopulmonology and Infectious Diseases, Moscow, Russia

²Troitsk Research and Development Center LLC, Moscow, Russia

This article presents the results of the development and laboratory testing of portable automated device prototype for rapid tuberculosis diagnosis and detection of drug resistance. The system comprises an analyzer and a disposable cartridge that contains all necessary reagents for sample preparation and PCR amplification inside. The analytical protocol includes sputum processing (ultrasonic treatment, lysis, and DNA extraction using magnetic particles), followed by nested real-time PCR for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* and probe-melting analysis of *rpoB* gene mutations. Laboratory tests using sputum samples demonstrated that the system reliably detects *M. tuberculosis* DNA (*IS6110* target) with high sensitivity, including samples with low bacterial load, and accurately identifies mutations associated with rifampicin resistance. An internal control confirms the absence of PCR inhibition. The accuracy of the results is comparable to standard laboratory PCR testing. Technological advantages of the system include full automation from sample to result (total analysis time ~2 hours) and reduced risk of contamination due to the sealed cartridge format compared to conventional molecular genetic methods. The developed platform demonstrates promise for point-of-care tuberculosis diagnostics, including multidrug-resistant forms. Further development is to expand the test panel to include resistance detection not only to rifampicin but also to isoniazid and fluoroquinolones.

Keywords: tuberculosis, rapid molecular diagnostics, molecular genetic test, polymerase chain reaction, nested PCR, disposable cartridge, point-of-care testing, antibiotic resistance, rifampicin, isoniazid, fluoroquinolones, sputum

REFERENCES

- Global tuberculosis report 2024. Geneva: World Health Organization, 2024. 69 p. ULR: <https://iris.who.int/server/api/core/bitstreams/7292c91e-ffb0-4cef-ac39-0200f06961ea/content>
- Vasilyeva I.A., Testov V.V., Sterlikov S.A. [Tuberculosis Situation in the Years of the COVID-19 Pandemic — 2020–2021]. *Tuberkulez i bolezni legkikh* [Tuberculosis and Lung Diseases], 2022, vol. 100, no. 3, pp. 6–12. DOI: 10.21292/2075-1230-2022-100-3-6-12. (In Russ.)
- Vasilyeva I.A., Testov V.V., Sterlikov S.A., Burykhin V.S., Kudrina V.G., Urushadze N.D. [Lethal Risk Factors in Patients with Rifampicin Resistant Tuberculosis according to Federal Register of Tuberculosis Cases]. *Tuberkulez i bolezni legkikh* [Tuberculosis and Lung Diseases], 2024, vol. 102, no. 6, pp. 40–47. DOI: 10.58838/2075-1230-2024-102-6-40-47. (In Russ.)
- Chakravorty S., Simmons A.M., Rowneki M., et al. 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, vol. 8, no. 4. DOI: 10.1128/mbio.00812-17
- Walzl G., McNERney R., du Plessis N., Bates M., McHugh T.D., Chegou N.N., Zumla A. Tuberculosis: advances and challenges in development of new diagnostics and biomarkers. *Lancet Infect Dis.*, 2018, vol. 18, no. 7, pp. e199–e210. DOI: 10.1016/S1473-3099(18)30111-7
- Belyaev D.V., Umpeleva T.V., Dianov D.V., Lavrenchuk L.S., Boteva T.Yu., Vakhrusheva D.V. [Phenotypic Resistance to Rifampicin of *Mycobacterium tuberculosis* with the *rpoB* Leu430Pro Mutation]. *Tuberkulez i bolezni legkikh* [Tuberculosis and Lung Diseases], 2024, vol. 102, no. 5, pp. 64–69. DOI: 10.58838/2075-1230-2024-102-5-64-69. (In Russ.)
- Umpeleva T., Chernikova E., Belyaev D., Ereemeeva N., Boteva T., Golubeva L., Vakhrusheva D.V., Vasilyeva I.A. Identification of genetic determinants of bedaquiline resistance in *Mycobacterium tuberculosis* in Ural region, Russia. *Microbiology spectrum*, 2024, vol. 12, no. 3, id. e0374923, pp. 1–5. DOI: 10.1128/spectrum.03749-23
- Burmistrova I.A., Vaniev E.V., Samoylova A.G., Lovacheva O.V., Vasilyeva I.A. [Amplification of drug resistance against the background of inadequate chemotherapy for pulmonary tuberculosis]. *Tuberkulez i bolezni legkikh* [Tuberculosis and Lung Diseases], 2019, vol. 97, no. 8, pp. 46–51. DOI: 10.21292/2075-1230-2019-97-8-46-51. (In Russ.)
- Boom R., Sol C.J., Salimans M.M., Jansen C.L., Wertheim-van Dillen P.M., van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, vol. 28, no. 3, pp. 495–503. DOI: 10.1128/jcm.28.3.495-503.1990

10. Vasil'eva I.A., Samoilova A.G., Ergeshov A.E., Bagdasaryan T.R., Chernousova L.N. [Chemotherapy of tuberculosis: problems and perspectives]. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk* [Annals of the Russian Academy of Medical Sciences], 2012, vol. 67, no. 11, pp. 9–14. DOI: 10.15690/vramn.v67i11.465. (In Russ.).
11. Umpeleva T., Belyaev D., Dianov D., Lavrenchuk L., Boteva T., Vakhrusheva D. Mutations outside RRDR lead to increased MICs for *M. tuberculosis* isolated with "borderline" *rpoB* mutations. *African Journal of Biological Sciences*, 2024, vol. 6, no. 8, pp. 2778–2782. URL: <https://www.afjbs.com/issue-content/mutations-outside-rrdr-lead-to-increased-mics-for-m-tuberculosis-isolates-with-borderline-rpob-mutations-3077>

Contacts: *Tkachuk Artem Petrovich*,
artem.p.tkachuk@gmail.com

Article received by the editorial office on 02.08.2025

INTRODUCTION

According to the World Health Organization's Global Report, in 2023, 10.8 mln new cases of tuberculosis were registered globally, and 1.1 mln people died, making this infection once again the leading cause of death among infectious diseases [1]. In 2021, the Russian Federation left the list of countries with a high tuberculosis burden. Despite this, the spread of drug-resistant tuberculosis remains a challenge for the entire medical community. This has been significantly accelerated by the COVID-19 pandemic [2]. According to the Federal Tuberculosis Registry, 15,604 patients with tuberculosis with confirmed resistance to at least rifampicin were registered in 2021 [3]. Early detection of antimicrobial resistance facilitates the timely initiation or adjustment of anti-tuberculosis chemotherapy.

Classical methods for diagnosing tuberculosis have several limitations. Sputum smear microscopy is not very sensitive, especially when the mycobacterial count is low. Culture, the "gold standard" for diagnosing and determining drug resistance, is highly sensitive but requires several weeks for culture growth. In recent years, molecular genetic diagnostic methods, primarily polymerase chain reaction (PCR), have become widespread. These methods allow for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* DNA in patient samples within hours and the identification of mutations associated with drug resistance, such as those in the RRDR region (81 base pairs, a region of the *rpoB* gene).

The introduction of automated PCR systems with disposable cartridges (such as the Cepheid GeneXpert MTB/RIF) has revolutionized tuberculosis diagnostics [4, 5]. The GeneXpert system detects *M. tuberculosis* and determines rifampicin resistance in a single assay in approximately 90 minutes and is recommended by the WHO for use in many countries. In addition to GeneXpert, other molecular tests have been developed and are in use: linear DNA probes (Hain GenoType MTBDRplus, etc.), isothermal amplification tests, and portable PCR devices such as the Molbio Truenat. Some new systems are capable of simultaneously detecting resistance to multiple drugs (e.g., Xpert MTB/XDR, FluoroType MTBDR, MeltPro, etc.). However, many of these solutions are imported and expensive or require laboratory infrastructure. A pressing challenge is the development of domestically produced portable devices for molecular tuberculosis diagnostics, suitable for use at the point of care, based on strains circulating within the Russian Federation [6, 7].

This paper describes a portable, automated system for the molecular genetic diagnosis of tuberculosis,

designed for unattended analysis in disposable cartridges. The device provides fully automated nucleic acid extraction from a clinical sample (sputum or bronchoalveolar lavage) and real-time PCR detection of *M. tuberculosis*, as well as analysis of DNA mutations associated with drug resistance. The goal of this development is to create an autonomous "sample-to-result" system capable of significantly accelerating and simplifying tuberculosis diagnosis and the detection of multidrug-resistant tuberculosis in clinical settings, compared to manual analysis methods.

This article presents the results of testing a prototype device and a cartridge with the necessary reagents, including an assessment of its diagnostic efficacy (detection of *M. tuberculosis* in sputum samples) and the ability to identify mutations conferring resistance to the main anti-tuberculosis drugs — rifampicin, isoniazid, and fluoroquinolones — for the successful treatment of tuberculosis patients [8].

DESCRIPTION OF THE DEVICE AND REAGENT CARTRIDGE DESIGN

Analyzer

The prototype analyzer is a portable device designed to operate with a disposable cartridge, which houses the analysis (Fig. 1).

Fig. 1. General diagram of the analyzer for molecular diagnostics of tuberculosis and other infectious diseases.

The analyzer's design is modular: when the cartridge is installed, it is fixed in the device in a precisely defined position relative to the main modules — the spool valve rotation mechanism, the vertical piston movement unit, and the thermal cycling module with an optical detection system. Thus, the analyzer performs several functions simultaneously: 1) actuating the cartridge's integrated microfluidic pump (a rotary valve with a piston) to transfer fluids between chambers; 2) controlling the DNA extraction process (e.g., activating the ultrasonic emitter and moving the magnetic separator); 3) enabling PCR amplification (heating/cooling the PCR chip) and recording the fluorescence signal. The device's optical system is equipped with a set of photodetectors corresponding to the number of fluorescence channels used; the prototype features up to five detection channels, allowing for simultaneous tracking of multiple targets and real-time control. Software is included to manage all analysis stages and automatically interpret amplification results.

Cartridge

A disposable cartridge is a polymer product containing a complete set of reagents required for analysis. The cartridge design includes three key components (Fig. 2): 1) a set of functional reservoir cells (including a cell for sample introduction and cells containing reagents — lysis buffer, wash solutions, elution buffer, lyophilized PCR reagents, as well as a separate reactor cell for performing the PCR); 2) a microfluidic PCR chip hermetically connected to the cells; 3) a rotary spool valve that transfers fluids between the cells. The cartridge is manually loaded into the instrument by the operator; after this, all analysis steps are performed automatically. Before analysis, the cartridge is sealed in the device, a leak test is performed (air is supplied under pressure to the PCR cells), and the system is initialized.

Fig. 2. General view of the cartridge of the device for the automatic extraction, purification, and amplification of *M. tuberculosis* DNA regions with real-time recording of results.

1 — base with reservoir tanks; 2 — lid with capillaries for fluid movement; 3 — ventilation wells; 4 — filter element; 5 — PCR cells; 6 — lid and opening underneath (port) for sample introduction; 7 — rotary valve

The cartridge reservoirs contain reagents: a universal buffer for sputum lysis and liquefaction (a means for liquefying and inactivating the biomaterial), magnetic microparticles with a functionalized surface for DNA sorption, wash buffers for purifying the isolated nucleic acids, an eluent for DNA desorption, as well as PCR mixtures (primers, probes, thermostable DNA polymerase, deoxynucleotides, etc.) for amplifying the target fragment of *M. tuberculosis* DNA and internal controls. The test system includes an internal control (IC). The presence of an IC allows for monitoring the efficiency of all stages — from lysis to amplification — and tracking possible PCR inhibition in each sample. A distinctive feature of the cartridge is its integrated microfluidic PCR chip, a miniature unit with one or several PCR reactors (wells) where DNA amplification occurs in a confined space. After filling with the reaction mixture, the PCR well is automatically sealed within the cartridge, preventing evaporation and contamination. It's worth noting that the cartridge design was optimized during development: in particular, the shape and mechanism of the spool valve were improved to ensure multi-stage (nested) PCR without the risk of amplicons spreading. The original version of the valve had an open sector, which meant that after the first phase of PCR, one of the wells remained open, increasing the risk of ampli-

cons contaminating the instrument. In the prototype, the valve has been modified to completely close the ventilation channels during fluid transfer, ensuring that each PCR well remains closed after filling, minimizing the risk of amplicon contamination.

AUTOMATIC ANALYSIS PROTOCOL FROM SAMPLE TO RESULT

The analysis is performed according to a pre-programmed protocol. The main stages of processing a clinical sputum sample within the system are described below.

Sample loading

A physician or laboratory technician manually collects a patient's sputum sample into a sterile container. Before loading into the cartridge, the sputum is pre-mixed with a special lysis buffer at a 1 : 2 ratio and incubated for approximately five minutes at room temperature to liquefy the viscous material. The resulting processed mixture (2.0–2.5 mL) is drawn up using a pipette or a disposable Pasteur pipette and introduced into the cartridge's receiving chamber through a special loading opening under the lid. Then the cartridge is placed in the analyzer, the instrument lid is closed, and the automatic analysis cycle begins.

Lysis and DNA release

The automated system implements the nucleic acid extraction method described by R. Boom et al. [9], with modifications. The sample is processed directly in the cartridge to inactivate mycobacteria and release their DNA. An ultrasonic emitter is closely adjacent to the reactor cell where the sample is introduced. The analyzer generates a series of ultrasonic pulses transmitted through the cell wall: pulse duration is approximately 1 s, pause for 1 s, for a total of approximately 40–60 pulses. This ultrasonic sonication leads to mechanical disruption of *M. tuberculosis* cells, liquefaction of sputum, and an increase in DNA yield. According to our assessment, the use of ultrasound in the cartridge increases the amount of mycobacterial DNA isolated by approximately 10 times compared to a non-sonicated sample. The above treatment inactivates mycobacteria, increasing the biosafety of the assay and reducing PCR inhibition.

DNA extraction using magnetic particles

After the lysis step, the instrument automatically extracts nucleic acids. The cartridge contains magnetic microparticles (MMPs) with a special coating capable of binding DNA. Using a built-in rotating valve and piston, the analyzer sequentially distributes liquid from the reactor to the other chambers of the car-

tridge: first, the sample is mixed with the magnetic particles, then the particles with adsorbed DNA are transferred to the wash chamber. A rotary spool valve is used to move the fluids: it is oriented over the desired cell, a piston inside the valve descends, discharging a predetermined volume of fluid from the cell by creating negative pressure. The valve then rotates toward the target cell, and the piston expels the liquid. This functions as a kind of microsyringe. In the wash cell, the device, using a permanent magnet applied to the outside of the cartridge, holds magnetic particles with DNA on the wall while the liquid is withdrawn by the valve and removed. Several washing steps are performed sequentially — the introduction and removal of wash buffers — to purify the adsorbed DNA from inhibitors and impurities. After washing, the particles are transferred to the second chamber, where DNA elution occurs: a small volume of eluent is added, desorbing nucleic acids from the particles. The purified eluate containing mycobacterial DNA is then loaded into a PCR chamber containing lyophilized amplification reagents.

Amplification (nested PCR)

The resulting reaction mixture (DNA eluate + reagents) is automatically dispensed into the PCR wells of the cartridge's microfluidic chip.

The prototype utilizes a two-stage nested PCR system to increase sensitivity. For this purpose, the cartridge is equipped with at least two PCR wells: one for phase 1 PCR — the initial replication of the target DNA using external primers — and then a portion of the resulting amplicons are automatically transferred to the second well, where the mixture for phase 2 PCR with internal (nested) primers is prepared. Two-phase amplification enables detection of even single copies of *M. tuberculosis* DNA and partially mitigates the effects of potential inhibitors remaining in the sample after extraction. In the final protocol configuration, each PCR phase was performed for 30 cycles, with phase 1 products diluted approximately 1 : 200 for phase 2. The PCR thermal profile (denaturation, annealing, and elongation temperatures) is similar to standard real-time PCR. The time required for both amplification stages and intermediate transfer is short, and the complete analysis cycle takes less than two hours. After each PCR well is filled, the cartridge valve is rotated to the sealing position, preventing contact of the well with the external environment during amplification.

Detection and interpretation of results

Thermal cycling in the PCR chip is accompanied by real-time fluorescence signal recording. In the test system, the target *M. tuberculosis* DNA fragment is the multicopy IS6110 sequence, which amplification

is detected in the FAM channel (using a probe labeled with FAM). Simultaneously, amplification of the internal control DNA (IC) is recorded in a second channel (e.g., HEX). The analyzer software plots product accumulation curves; upon reaching the threshold fluorescence level, the PCR result is displayed: positive (IS6110 is detected) or negative (not detected, provided the IC reaction is positive). In the case of a two-stage PCR, a summary report is generated, taking both phases into account. To determine drug resistance to rifampicin, an additional analysis of *rpoB* gene amplification products was implemented. After PCR, the instrument performs melt curve analysis to identify point mutations in the RRDR region. The test system utilizes several molecular beacon probes complementary to different regions of RRDR; changes in the melting temperatures of these probes when bound to the amplicon indicate the presence of a mutation. For example, mutants with the Ser531Leu substitution (one of the most common mutations in rifampicin-resistant tuberculosis, accounting for ~75% of cases) are characterized by a 6.9°C increase in the melting temperature of the P-4 probe compared to the wild-type. The analyzer records melting curves in several optical channels corresponding to each individual probe and compares the obtained melting temperature T_m values with the wild-type reference values. Based on this, it is determined whether a mutation is present in RRDR and what type it is (within the detection range of positions 516, 526, 531, etc.). The result for rifampicin resistance is reported as "rifampicin-resistant" (if a mutation is detected) or "rifampicin-sensitive" (if no mutation is detected). At the prototype stage, the method demonstrated its viability and showed potential for expansion to other drugs. Similar implementations are planned for the detection of mutations in the *katG/inhA* (isoniazide) and *gyrA* (fluoroquinolones) genes, i.e., expand the disposable cartridge with additional reagents/probes for the simultaneous detection of multiple mutations associated with resistance to multiple antibiotics in a single assay, which is dictated by the needs of practical healthcare [10].

TEST METHODOLOGY AND SUBJECTS

Subjects

Laboratory testing of the prototype device was conducted on clinical sputum samples obtained from patients with a confirmed diagnosis of pulmonary tuberculosis, with their consent in accordance with the established form by the Local Ethics Committee of the National Medical Research Center for Phthisiopulmonology and Infectious Diseases of the Ministry of Health of the Russian Federation. Specifically, the study included sputum samples from patients in whom

the presence of *M. tuberculosis* had previously been confirmed by PCR (AmpliTub-RV test system) and/or culture, as well as samples from conditionally healthy donors (negative for tuberculosis). All samples were stored in a refrigerator (4 °C) for no more than 1–2 days before testing or frozen at –20 °C for subsequent analysis. Before loading into the device, sputum was mixed with a universal lysis buffer at a 1 : 2 ratio, as described above. Analyses were performed at the Molecular Biology Methods Laboratory of the National Medical Research Center for Phthisiopulmonology and Infectious Diseases of the Ministry of Health of the Russian Federation.

Test for the detection of M. tuberculosis

To evaluate the system's performance in detecting the tuberculosis pathogen, both positive and negative clinical samples were collected. Some positive samples had a high bacterial load, while others had a low load (single bacteria, positive only by culture or PCR). A total of 6 sputum samples and 5 bronchoalveolar lavage (BAL) samples were tested on the pilot device to identify *M. tuberculosis*. Each sample was analyzed in parallel using the reference method — real-time PCR using a commercial kit (Ampli-tub-RV) with DNA extraction using the phenol-chloroform method or columns.

Testing for detection of drug resistance mutations

To test the system's performance in rifampicin resistance detection mode, we generated a set of 20 sputum samples containing rifampicin-resistant *M. tuberculosis* strains (mutations in RRDR *rpoB*) confirmed by the standard AmpliTub-RV PCR assay and sequencing. This set included clinical samples from patients diagnosed with MDR-TB (multidrug-resistant tuberculosis), most of them had known *rpoB* mutations (S531L, H526D/Y, etc.). Additionally, several samples with drug-susceptible tuberculosis (wild-type *rpoB*) were tested to control for specificity. All samples were analyzed using a pilot device equipped with disposable cartridges and an experimental reagent kit for detecting *rpoB* mutations (four molecular probes corresponding to the number of primary target positions of the mutations). The results were compared with reference data for each sample.

RESULTS AND ANALYSIS

Detection of M. tuberculosis

During laboratory testing, the pilot device demonstrated the ability to reliably detect tuberculosis DNA in sputum and BAL samples. The device identified all positive samples tested containing *M. tuberculosis*; negative control samples yielded negative results (al-

though the IC was successfully amplified in them). Table 1 presents the results of a series of parallel tests of the pilot device: the results of the device's analysis are compared with the data of the reference PCR test. As can be seen, there is complete compliance—the device did not return a single false positive result in this set. Specifically, a sample with a low *M. tb* concentration (No. 2609243) was identified as positive by both our device and the reference method. Tuberculosis-negative samples (for example, No. 2609241) were correctly identified as negative by the device (in the presence of an IQR signal).

Tab. 1. Summary data of sputum and BAL samples analysis using the developed reagent kit in an automatic analyzer

Thus, the sensitivity and specificity of *M. tuberculosis* detection in the pilot sample are, according to preliminary estimates, 100% compared to laboratory PCR; however, precise results will be established in an expanded set as part of clinical trials.

Detection of rifampicin resistance mutations

The pilot system successfully passed testing for its ability to identify mutations associated with drug resistance in mycobacteria. In 20 rifampin-resistant sputum samples analyzed by the instrument, changes in the probe melting curves were detected in all cases, indicating the presence of mutations in the *rpoB* region.

The obtained types of melting point shifts corresponded to specific mutations: for example, a shift in the melting point of probe P-2 is characteristic only of the Asp516Tyr mutation. A shift T_m in the melting point of probe P-3 occurs in the presence of mutations in codons 526 and 531. To differentiate between mutations in codons 526 and 531, a comparison with the melting point T_m of probe P-4 is necessary: a shift in the melting point of probe P-4 occurs only with mutations in codons 531 and 533. Therefore, in the absence of a shift in the melting point T_m of probe P-4, a shift in the melting point T_m of probe P-3 is characteristic only of mutations in codon 526. All results obtained with the device were consistent with reference method data: *rpoB* mutations were detected in all known resistant samples and were absent in known sensitive ones.

Moreover, the use of multiple probes allowed for preliminary differentiation of specific mutation variants. The processed average melting point data for different mutation types are presented in Tab. 2.

Thus, the cartridge melting curve analysis method demonstrated its effectiveness in identifying the main rifampicin-resistant mutations in *M. tuberculosis*.

Tab. 2. Results of mutation detection by comparing the melting temperatures T_m of probes bound to the amplified RRDR region of the *rpoB* gene

DISCUSSION

Evaluation of the instrument testing results

The results of testing the prototype instrument and the cartridge with the reagent kit confirm the fundamental feasibility of the "automated laboratory in a cartridge" concept for tuberculosis diagnostics. The system demonstrated high sensitivity in detecting *M. tuberculosis* DNA — the use of nested PCR enabled detection thresholds comparable to those of the best commercial tests. According to our data, using a nested approach combined with ultrasound lysis, we can detect approximately 10^2 – 10^3 copies of mycobacterial DNA in a sample volume of ~1 ml (equivalent to ~1–10 mycobacteria per smear in the field of view). This is especially important for diagnosing latent forms of tuberculosis and extrapulmonary tuberculosis. The method's specificity is also high: the system's primers and probes target the unique insertion sequence IS6110, present only in *Mycobacterium tuberculosis*, eliminating false-positive reactions. No false-positive detection of *M. tuberculosis* was observed in the trials — all negative samples yielded negative results due to the internal control working correctly.

The device's capabilities for detecting drug resistance deserve special attention. The presented prototype implements the detection of resistance to rifampicin, a key drug typically used to assess multidrug-resistant tuberculosis. The method is based on the principle of detecting mutations in the *rpoB* gene hot spot, which has long been established as a reliable molecular marker: more than 95% of rifampicin-resistant strains carry mutations in the RRDR of *rpoB* [11]. Our approach using probe melting curve analysis is essentially similar to that used in Xpert MTB/RIF and other systems (Hain, Genoscholar, etc.) but also has advantages. For example, multiple probes allow us to differentiate mutations, providing additional information about the resistance profile.

Preliminary testing showed full compliance with the results for *rpoB* mutation detection by reference methods, i.e., high specificity and sensitivity for detecting rifampin resistance.

Capabilities for detecting resistance to isoniazid and fluoroquinolones

At the prototype stage, the test system fully implemented only the detection of *rpoB* gene mutations.

However, the methodological approaches incorporated into the system allow for similar detection of other drug resistance mutations in *M. tuberculosis*. The principle is based on the amplification of specific regions of the mycobacterial genome, followed by analysis of the products using specific oligonucleotide probes. Specifically, for isoniazid, such targets are mutations in the *katG* gene (position Ser315Thr) and the *inhA* promoter, while for fluoroquinolones, these are mutations in *gyrA* (the so-called QRDR region).

In the future, it is planned to supplement the cartridge with reagents (primers and probes) for detecting these mutations, which will transform the system into a multi-test system, similar in functionality to the best foreign models (like Xpert MTB/XDR or hybridization analysis).

Our system was designed from the ground up to be modular and flexible: an optical unit with five detection channels allows for the parallel amplification of multiple targets with the appropriate reagents. Adding one or two more PCR reactions (e.g., for the *katG* and *gyrA* genes) to the cartridge presents no significant difficulties, given the available number of PCR wells and detection channels. Thus, the device can be further developed into a platform for tuberculosis diagnostics with a broad panel of drug resistance, including detection of multidrug-resistant and extremely drug-resistant tuberculosis (MDR/XDR-TB) in a single assay. Our preliminary experiments confirm that the developed device and software are ready for panel expansion. Thus, a PCR method using probes targeting other mycobacterial genes (for example, *katG*) has been successfully tested on a prototype device and is expected to be implemented in the next version of the test system. Thus, the developed platform has high potential for the comprehensive diagnosis of drug-resistant tuberculosis.

The technological advantages of the developed system include not only its diagnostic performance but also its ease of use and safety. The device is designed for use directly at the point of care (in examination rooms, treatment rooms, etc.). The operator requires no complex manipulations — simply place the sputum sample into the cartridge and start the analysis. All potentially hazardous steps (lysis, pathogen inactivation, and amplification) occur within a sealed cartridge, minimizing the risk of personnel infection and contamination of the premises with the pathogen or amplicons. After analysis, the used cartridge can be safely disposed of as infectious waste. Built-in disinfection of the instrument compartment tray after cartridge removal is provided (e.g., by UV radiation or disinfectant solution), further ensuring epidemiological safety during serial use of the device.

The device's autonomy and mobility are also significant advantages. The analyzer is relatively small, lightweight, and can be transported in a portable case.

Power consumption is low; it can be powered from either a 220V network or a portable power source (battery), which is important for field use. All reagents are stabilized in the cartridge (lyophilized), with a shelf life of at least several months at room temperature and 1 year or more when refrigerated (these parameters are still being refined). Thus, the system can be used in remote regions, mobile tuberculosis laboratories, for testing migrants, prisoners, and other settings where deploying a full-fledged laboratory is difficult.

CONCLUSION

In this study, a prototype of an automated system for the molecular genetic diagnosis of tuberculosis was developed and manufactured. It includes a portable analyzer and a disposable reagent cartridge. Laboratory testing confirmed the system's operability: it successfully isolates *M. tuberculosis* DNA from native sputum and BAL samples and detects the target fragment using nested real-time PCR, providing sensitivity comparable to traditional methods. Built-in internal controls and protocol optimization enabled highly reliable results, even for complex samples. A molecular detection method for rifampicin resistance in mycobacteria was also implemented—identification of *rpoB* gene mutations by changes in the melting temperature of special probes — which demonstrated full compliance with reference assay data.

The obtained results demonstrate the significant technological advantages of the proposed system. Full automation of all stages — from sample lysis to result delivery — eliminates human error and reduces diagnosis time to 2 hours. The cartridge format ensures maximum ease and safety of operation, and the device's portability allows for diagnostics directly at the patient's bedside or in the field. Thus, this device can be widely used in phthisiological practice: for the rapid detection of tuberculosis in individuals suspected of having the disease, screening for tuberculosis in high-risk populations, rapid determination of drug resistance (which is especially important for MDR-TB), etc.

This platform will continue to be developed. Clinical evaluation in a multicenter study, refinement of the design for industrial production, and expansion of testing capabilities are planned. Additional reactions for determining resistance to isoniazid, fluoroquinolones, and other key drugs are planned for the cartridge, making the system a fully-fledged tool for personalized tuberculosis diagnostics. Given the strategic importance of the fight against tuberculosis and the growing proportion of drug-resistant forms, the proposed domestic development has a significant potential to occupy a niche among advanced diagnostic technologies and contribute to improving the epidemiological situation for tuberculosis. This development demonstrates the profound impact of new scientific knowledge and achievements on the instrumentation industry.