

На правах рукописи

Устинова Вера Витальевна

**Совершенствование молекулярно-генетических методов выявления
нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса**

1.5.11. – Микробиология

Автореферат диссертации
на соискание учёной степени
кандидата биологических наук

Москва — 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»

Научный руководитель

кандидат медицинских наук

Смирнова Татьяна Геннадьевна

Официальные оппоненты:

Макарова Марина Витальевна – доктор биологических наук, Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Московский городской научно-практический центр борьбы с туберкулезом Департамента здравоохранения города Москвы», отдел проблем лабораторной диагностики туберкулеза и патоморфологии, главный научный сотрудник

Ермолова Екатерина Ивановна – кандидат биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, лаборатория анализа геномов, старший научный сотрудник

Ведущая организация:

Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита диссертации состоится «__» _____ 2025 года в __ часов на заседании диссертационного совета 64.1.004.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте Федерального бюджетного учреждения науки «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 125212, г. Москва, ул. Адмирала Макарова, д. 10, <http://www.gabrich.ru>

Автореферат разослан: «__» _____ 2025 г.

Учёный секретарь

диссертационного совета

доктор медицинских наук, профессор

Борисова Ольга Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

В последние 20 лет отмечают рост заболеваемости туберкулезом (World Health Organization, 2021, 2022, 2023) и микобактериозом (Marras T.K., et al., 2002; Отген Т.Ф., 2005; Marras T.K., et al., 2007; Литвинов, В.И., 2008; Sali M. et al., 2016). Как правило, больные микобактериозом поступают в противотуберкулезные учреждения с подозрением на туберкулез ввиду сходства симптоматики и клинической картины заболеваний (Daley C.L., 2010; Gopinath K. et al., 2010). Нетуберкулёзные микобактерии резистентны к большинству противотуберкулёзных препаратов, вызываемые ими заболевания требуют иных схем лечения (Hoffner S.E. et al., 1994; Gopinath K. et al., 2010). Отличаются и схемы лечения заболеваний, вызванных разными видами нетуберкулёзных микобактерий (Shamputa I.C. et al., 2004; Андреевская С.Н. и др., 2006; Piersimoni C. et al., 2009; Brown-Elliott V.A. et al., 2012). Ввиду этого востребованы инструменты их быстрой дифференциации от микобактерий туберкулёзного комплекса и идентификации до вида. Наиболее быстрыми, специфичными и чувствительными методами дифференциации нетуберкулёзных микобактерий от микобактерий туберкулёзного комплекса и их видовой идентификации, являются молекулярно-генетические (Елисеев П.И., 2013; Sali M. et al., 2016; Sevilla I. et al., 2017). На данный момент на территории Российской Федерации зарегистрирована одна молекулярно-генетическая тест-система для выявления и дифференциации нетуберкулёзных микобактерий от микобактерий туберкулёзного комплекса (ООО «ТестГен», 2023), а тест-системы для их видовой идентификации не представлены. Таким образом, разработка отечественных молекулярно-генетических методов выявления и видовой идентификации нетуберкулёзных микобактерий экономически целесообразна и актуальна для противотуберкулёзной лабораторной службы Российской Федерации.

Степень разработанности темы исследования

Молекулярно-генетическая диагностика микобактериоза интенсивно развивается. Первые способы выявления и видовой идентификации нетуберкулёзных микобактерий были основаны на методе обратной гибридизации специфических участков ДНК, наработанных посредством полимеразной цепной реакции, с зондами, иммобилизованными на твердом носителе или мембране (De Veenhouwer H. et al., 1995; Кох L.F., 1995). Принцип обратной гибридизации также использовали для разработки стеклянных микрочипов высокой плотности (Fukushima M. et al., 2003) и гидрогелевых чипов низкой плотности (Zimenkov D.V. et al., 2015). На территории России для выявления и видовой идентификации нетуберкулёзных микобактерий до 2022 года были зарегистрированы и доступны наборы реагентов серии GenoType *Mycobacterium* (Hain Lifescience, Germany), принцип работы которых основан на методе обратной гибридизации ПЦР-продуктов. Для идентификации нетуберкулёзных микобактерий также используют метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (Butler W.R. et al., 2001; Макарова М.В. и др., 2009; Sebastian G. et al., 2018), применение которого предполагает закупку дорогостоящего оборудования и расходных материалов и многочасовой анализ. В ряде лабораторий для определения вида микобактерий использовали метод времяпролётной масспектрометрии (Shitikov E. et al., 2012; Chen J.H. et al., 2013). Достоверность идентификации этим методом высока, но его использование предполагает закупку дорогостоящего крупногабаритного оборудования при отсутствии готовых решений для клиники. Перспективным направлением в

области развития молекулярно-генетических методов выявления и идентификации нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса является разработка тест-систем, основанных на ПЦР в режиме реального времени (Keerthirathne T.P. et al., 2016; Chen J.H. et al., 2017; Sawatpanich A. et al., 2022). В настоящее время доступен ряд коммерческих тест-систем для выявления микобактерий туберкулезного комплекса, основанных на этой технологии, немногие из них позволяют выявлять одновременно нетуберкулезные микобактерии (Perry M., et al. 2014; Abdeldaim G. et al., 2016; Sali M. et al. 2016; Sawatpanich A. et al., 2022). При этом тест-систем, основанных на ПЦР-РВ, дающих возможность выявлять случаи ко-инфекции нетуберкулезными микобактериями и микобактериями туберкулезного комплекса, не существует. Ряд тест-систем для видовой идентификации нетуберкулезных микобактерий имеет ограничение по количеству выявляемых видов (Sevilla I. et al., 2015; Abdeldaim G. et al., 2016), либо обеспечивает возможность работы только с ДНК, выделенной из культур (Richardson E.T. et al, 2009). Единственная зарегистрированная и производящаяся в России тест-система, основанная на технологии ПЦР-РВ, для выявления нетуберкулезных микобактерий и их дифференциации от микобактерий туберкулезного комплекса не позволяет выявлять ко-инфекции этими микобактериями, что может привести к некорректной постановке теста на лекарственную чувствительность и, как следствие, неэффективной антибиотикотерапии.

Цель исследования

Разработка тест-систем, основанных на технологии ПЦР в режиме реального времени, для быстрого одновременного дифференциального выявления нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса в одной пробирке и для идентификации нетуберкулезных микобактерий до вида.

Задачи исследования

1. Разработка дизайна тест-системы для одновременного выявления ДНК нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса, поиск мишеней в геномах нетуберкулезных микобактерий, дифференцирующих их от микобактерий туберкулезного комплекса и родственных кислотоустойчивых бактерий
2. Дизайн праймеров и зондов, обеспечивающих выявление выбранных мишеней
3. Оценка стандартных характеристик разработанной тест-системы для одновременного выявления нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса
4. Испытание тест-системы для одновременного выявления нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса на образцах культур/диагностического материала от больных
5. Разработка дизайна тест-системы для идентификации нетуберкулезных микобактерий до вида, выбор идентифицируемых видов
6. Поиск генетических мишеней для разработки тест-системы для видовой идентификации нетуберкулезных микобактерий
7. Испытание тест-системы для видовой идентификации нетуберкулезных микобактерий на образцах культур/диагностического материала от больных

Научная новизна

Выявлены новые, не использовавшиеся ранее для детекции группы нетуберкулезных мико-

бактерий ДНК-мишени, локализующиеся в генах *metH* (4263878 – 4263784 нуклеотиды на референсном геноме *M. smegmatis* NC_008596.1) и *tuf* (785442 – 785495 референсный геном *M. tuberculosis* H37Rv NC_000962.3), позволяющие дифференцировать нетуберкулезные микобактерии от микобактерий туберкулезного комплекса и родственных кислотоустойчивых бактерий.

Выявлены новые, не использовавшиеся ранее ДНК-мишени, позволяющие идентифицировать 12 видов нетуберкулезных микобактерий, лежащие в локусах, соответствующих 101820-102392 нуклеотидам на референсном геноме *M. abscessus* NZ_FVOX01000008.1 и 29992-30393 нуклеотидам на референсном геноме *M. avium* NZ_LMVV01000015.

Разработана тест-система, основанная на ПЦР-РВ, для одновременного выявления и дифференциации нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса в одной пробирке, позволяющая идентифицировать нетуберкулезные микобактерии в образцах клинического материала с чувствительностью 74,2%, в образцах культур – с чувствительностью 100%. Чувствительность выявления микобактерий туберкулезного комплекса для образцов клинического материала - 93,5% и для образцов культур - 100%.

Разработана тест-система для идентификации нетуберкулезных микобактерий до вида в образцах культур и клинического материала от больных, позволяющая идентифицировать 12 клинически значимых видов нетуберкулезных микобактерий: *M. abscessus*, *M. avium*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. lentiflavum*, *M. mucogenicum*, *M. peregrinum*, *M. smegmatis*, *M. xenopi*. Чувствительность тест-системы для видовой идентификации нетуберкулезных микобактерий в образцах диагностического материала - 99,71%, чувствительность в образцах культур - 99,67% при специфичности 100%. Чувствительность и специфичность для определения микобактерий туберкулезного комплекса из культур составляет 100%.

Теоретическая и практическая значимость работы

Предложенные для видовой идентификации нетуберкулезных микобактерий генетические мишени, лежащие в локусах, соответствующих 101820-102392 нуклеотидам на референсном геноме *M. abscessus* NZ_FVOX01000008.1 и 29992-30393 нуклеотидам на референсном геноме *M. avium* NZ_LMVV01000015, могут рассматриваться в качестве дополнительной основы в систематике нетуберкулезных микобактерий для построения более совершенных филогенетических деревьев.

Обоснована возможность применения мишеней, использованных для разработки тест-системы для идентификации до вида *M. abscessus*, *M. avium*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. lentiflavum*, *M. mucogenicum*, *M. peregrinum*, *M. smegmatis*, *M. xenopi*, для дальнейшего расширения списка идентифицируемых видов нетуберкулезных микобактерий.

Разработанные ПЦР-РВ тест-системы могут быть использованы в лабораторной диагностике, что существенно сократит время анализа образцов клинического материала и культур от больных. Отсутствие большого количества ручных манипуляций в протоколе исследования снижает вероятность возникновения ошибок, связанных с человеческим фактором.

Возможность выявления ко-инфекции нетуберкулезными микобактериями/микобактериями туберкулезного комплекса в образцах клинического материала и культур от больных с использованием разработанной тест-системы обеспечивает возможность применения корректного алгоритма определения лекарственной чувствительности и, как следствие, назначения больным с ко-инфекцией эффективного режима антибиотикотерапии.

Разработанная ПЦР-РВ тест-система для видовой идентификации позволяет выявлять ко-инфекцию штаммами разных видов нетуберкулезных микобактерий, что особенно важно в случае ко-инфекции штаммами медленно растущих и быстро растущих нетуберкулезных микобактерий, т.к. обнаружение такой ко-инфекции культуральным методом затруднено значительной разницей в скорости роста штаммов. Отсутствие информации о наличии второго штамма в культуре, так же как в случае ко-инфекции нетуберкулезными микобактериями и микобактериями туберкулезного комплекса, может привести к назначению больному неэффективного режима антибиотикотерапии.

Результаты настоящей работы внедрены в алгоритм проведения исследований образцов от пациентов лаборатории молекулярно-генетических методов исследования отдела микробиологии ФГБНУ «Центрального НИИ Туберкулёза», а также используются в цикле лекций курса повышения квалификации врачей-бактериологов, врачей клинической лабораторной диагностики и врачей-фтизиатров учебного центра ФГБНУ «ЦНИИТ» (Акт внедрения ФГБНУ «ЦНИИТ» от 14.01.2023). Материалы настоящей работы использованы в разработке набора реагентов для выявления генетических маркеров ДНК микобактерий туберкулезного комплекса и нетуберкулезных микобактерий, а также дифференциальной диагностики видов нетуберкулезных микобактерий методом ПЦР-РВ и подготовке регистрационного досье в Росздравнадзор, на основе которого получено регистрационное удостоверение № РЗН 2024/21973 от 12 февраля 2024 года (Акт внедрения ООО «НПФ Синтол» от 20.02.2024).

Методология и методы исследования

Методология исследования спланирована согласно поставленной цели. Предмет исследования - разработка молекулярно-генетических методов выявления и видовой идентификации нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулёзного комплекса, основанных на технологии ПЦР в режиме реального времени. В качестве методологической основы диссертационной работы выступали общепринятые протоколы и методики, описанные в специализированных источниках информации. Проведение исследований осуществлялось на основе общенаучных и специфических методов: микробиологических, молекулярно-генетических, биоинформатических и статистических. Исследование было выполнено в рамках НИР «Геномное секвенирование клинически значимых видов нетуберкулезных микобактерий, распространенных в РФ» (уникальный номер 0515-2015-0011) и одобрено локальным Этическим комитетом ФГБНУ «ЦНИИТ».

Материалы исследования

Штаммы микроорганизмов

Проанализированы 18 штаммов НТМБ, 16 штаммов МБТК, 13 штаммов МО, не относящихся к МБ, из коллекции отдела микробиологии ФГБНУ «ЦНИИТ»; 500 штаммов *M.tuberculosis*; 46 штаммов МО, не принадлежащих к роду *Mycobacterium*; 1123 штамма НТМБ из диагностического материала от больных.

Образцы клинического материала от больных

Выборка образцов клинического материала от больных представлена в таблице 1.

Таблица 1 - Диагностический материал от больных, использованный для оценки клинической чувствительности и специфичности тест-системы для выявления и дифференциации МБТК и НТМБ

Диагноз	Респираторный материал, число образцов	Операционный материал, число образцов	Всего образцов	Всего больных	
Туберкулёз лёгких	3410	347	3757	1416	
Микобактериоз лёгких	573	36	609	190	
Другие болезни лёгких	Бронхоэктатическая болезнь легких	106	2	108	77
	Хроническая обструктивная болезнь легких	91	1	92	65
	Пневмония	179	1	180	125
Общий объём исследования	4359	387	4746	1887	

Методы исследования

Культуральные методы исследования, первичная и видовая идентификация культур

Культуры микобактерий (МБ) получали в модифицированной жидкой питательной среде (ЖПС) Middlebrook 7H9 в автоматизированной системе учёта роста МБ ВАСТЕС MGIT960 по стандартному протоколу производителя (Becton Dickinson, США). Первичную идентификацию культур проводили согласно протоколу производителя, используя посев на кровяной агар, тест на наличие антигена МРТ64 и люминесцентную микроскопию с окраской мазков по Цилю-Нильсену.

Молекулярно-генетические методы

Выделение ДНК проводили на роботизированной раскапывающей станции Freedom Evo 150 (Tecan, Швейцария) набором реагентов «М-Сорб-Туб Автомат» (НПФ Синтол, Москва) согласно протоколу производителя. Концентрацию дцДНК определяли с использованием набора реагентов QuantiFluor ONEdsDNA System (Promega, США) на флуориметре Quantus (Promega, США) согласно рекомендациям производителя. Количество ДНК человека в образцах клинического материала определяли с помощью набора реагентов «ХУ-Детект» («Синтол», Москва). Циклическое секвенирование по Сэнгеру проводили с использованием набора ABI PRISM BigDye Terminator v.1.3 («Applied Biosystems», США). Полученные фрагменты разделяли капиллярным гель электрофорезом на генетическом анализаторе ABI Prism 3130xl («Applied Biosystems», США). Видовую идентификацию культур нетуберкулезных микобактерий (НТМБ) и микобактерий туберкулезного комплекса (МБТК) проводили с помощью наборов реагентов серии GenoType *Mycobacterium* (Hain Lifescience, Германия) по протоколу производителя. В случае, если вида не оказывалось в панели набора, секвенировали фрагменты генов 16S рРНК и *hsp65*. ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием приборов CFX96 (BioRad Laboratories, Inc, США); ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия), и АНК-32М (ФГБУН ИАП РАН, Россия). Протоколы проведения реакций описаны в результатах диссертационного исследования.

Биоинформатические методы

Поиск локусов для разработки тест-систем проводили с использованием программного обеспечения Artemis ([//www.webact.org/WebACT/generate](http://www.webact.org/WebACT/generate)). Гомологи отобранных белковых последовательностей анализировали алгоритмом protein-protein blast (NCBI, США). Выравнивания соответствующих им нуклеотидных последовательностей проводили с

использованием алгоритма Muscle в программном пакете Ugene UniPro (Россия). Подбор праймеров и зондов проводили программным пакетом Primer3 (Rozen S., Skaletsky H., 2000). Их специфичность оценивали с использованием алгоритма PrimerBLAST (NCBI, США), интернет ресурсов The DINAMelt Web Server (Markham N.R., Zuker M., 2005) и Multiple Primer Analyzer (Thermo Fisher Scientific, США).

Расчет содержания геном-эквивалентов в образцах ДНК

Расчет количества геном-эквивалентов (ГЭ) в образцах ДНК проводили по формуле $N[\Gamma\text{-}\varepsilon] = C[\text{г/л}] \times V[\text{л}] \times N_A \times M_w[\text{Да}] \times L[\text{Кб}] \times 10^3$, где $C[\text{г/л}]$ – концентрация дцДНК, $V[\text{л}]$ – объём, в котором растворена дцДНК; N_A – число Авогадро; $M_w[\text{Да}]$ – средний молекулярный вес пары оснований; $L[\text{Кб}]$ – длина молекулы ДНК. Использовали значения длин геномов, представленные в базе данных KEGG (Kanehisa M. et al., 2016).

Методы статистической обработки результатов

Чувствительность, специфичность, прогностическую ценность положительного результата, прогностическую ценность отрицательного результата проводили по стандартным формулам (Петри А., Сэбин К., 2010). Среднее значение величины порогового цикла амплификации C_p и стандартное отклонение (СО) порогового цикла амплификации рассчитывали с помощью программного обеспечения амплификаторов CFX96 (BioRad Laboratories, Inc, США); ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ»), и АНК-32М (ФГБУН ИАП РАН, Россия). Коэффициент вариации значений пороговых циклов амплификации $CV(\%)$ рассчитывали по формуле $CV = \text{СО}/\text{среднее} \times 100\%$, где среднее – среднее значение порогового цикла. Значение предела обнаружения ДНК при вероятности обнаружения 95% - $LoD_{95\%}$ - оценивали путём применения лог-логистической модели к данным, полученным в ходе исследования, характеризующим вероятность обнаружения, согласно (Georgiou G.A., 2007).

Отбор культур и клинического материала от больных

Отбор клинического материала и культур для дальнейшего анализа выполняли согласно алгоритмам, утвержденным в Приказах МЗ РФ № 109 от 21 марта 2003 года «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации» и № 951 от 29 декабря 2014 года «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения органов дыхания», регламентирующим диагностику туберкулёза в РФ, согласно схеме, представленной на рисунке 1.

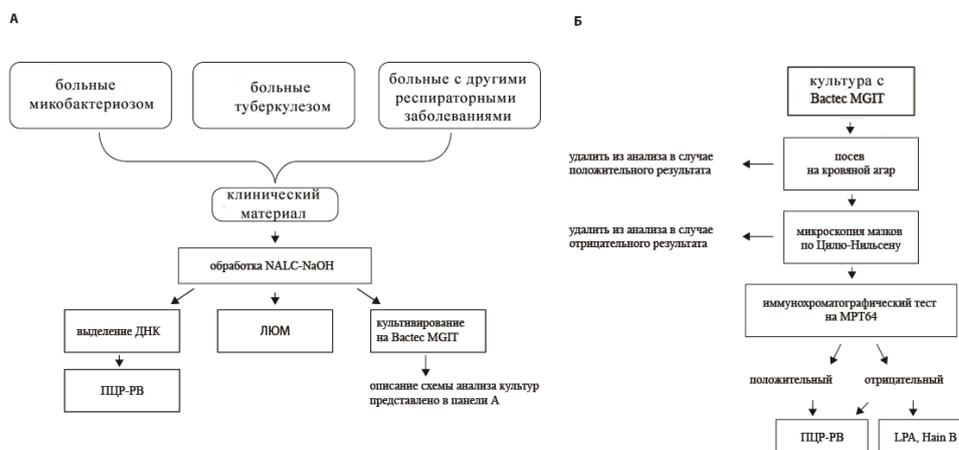


Рисунок 1 – Схема отбора клинического материала от больных (А) и образцов культур (Б)

Личное участие автора в получении результатов

Автор лично участвовал в выборе темы исследования, формулировке цели и задач исследования. Автором лично проведён биоинформатический анализ геномов НТМБ и МБТК и разработка праймеров и зондов для выявления и дифференциации НТМБ и МБТК и идентификации НТМБ до вида. Биоматериал получен при участии сотрудников ФГБНУ «ЦНИИТ»: врача консультативного отделения, к.м.н. Гордеевой О.М.; врача первого терапевтического отделения, к.м.н. Поляковой А.С.; заведующей второго терапевтического отделения, д.м.н. Макарьянц Н. Н.; врача третьего терапевтического отделения, к.м.н., Черных Н.А.; заведующей четвертого терапевтического отделения, к.м.н. Зайцевой А.С. Отбор биоматериала для исследования проведён автором совместно с сотрудниками отдела микробиологии ФГБНУ «ЦНИИТ»: старшим научным сотрудником, к.м.н. Смирновой Т.Г. и научным сотрудником Андриевской И.Ю.. Клиническая предобработка диагностического материала проведена лаборантом отдела микробиологии ФГБНУ «ЦНИИТ» Василенко Д. В. Испытания тест-систем, разработанных в ходе диссертационного исследования, проведены автором совместно с сотрудниками отдела микробиологии ФГБНУ «ЦНИИТ»: старшим научным сотрудником, к.м.н. Смирновой Т.Г. и лаборантом-исследователем Киселевой Е.А..

Автор обобщил полученные результаты исследования, научно обосновал выводы и представил результаты работы на научно-практических конференциях. Совместно с главным научным сотрудником отдела микробиологии, профессором, д.б.н. Черноусовой Л.Н. и старшим научным сотрудником отдела микробиологии, к.м.н. Смирновой Т.Г. автор внедрил их в практическую работу отдела микробиологии ФГБНУ «ЦНИИТ».

Положения, выносимые на защиту

1. Разработан молекулярно-генетический способ одновременного выявления и дифференциации НТМБ и МБТК в одной пробе диагностического материала или культуры от больного с подозрением на ТБ/микобактериоз, основанный на технологии ПЦР-РВ.

2. Разработан метод идентификации 12 клинически значимых видов НТМБ: *M. abscessus*, *M. avium*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. lentiflavum*, *M. mageritensis*, *M. neoaurum*, *M. peregrinum*, *M. smegmatis*, *M. xenopi*, основанный на технологии ПЦР-РВ. Разработанный метод является достоверным, простым и быстрым методом идентификации 12 видов НТМБ.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов обеспечена использованием в работе современных и адекватных биоинформатических, молекулярно-биологических и микробиологических методов, достаточной биологической повторностью, учётом и анализом результатов с использованием методов статистической обработки данных. О достоверности полученных результатов свидетельствует достаточный объем выборки исследованных штаммов НТМБ и МБТК и образцов диагностического материала от больных.

Диссертация апробирована на заседании секции ученого совета Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза» (протокол №1 от 20 декабря 2023 г.).

Полученные в работе данные были представлены на научных конференциях и форумах всероссийского и международного уровней, включая конференции молодых ученых с

международным участием, посвященные Международному Дню борьбы с туберкулезом (Москва, 2016, 2017), IV Конгресс Национальной ассоциации фтизиатров (Санкт-Петербург, 2016), Заседание Межрегиональной общественной организации «Московское общество фтизиатров» (Москва, 2017), Международный конгресс Европейского респираторного общества ERS international congress 2017 (European Respiratory Society, Милан, 2017); 2-й Санкт-Петербургский Симпозиум по туберкулезу и микобактериям (Санкт-Петербург, 2018).

Публикации

По материалам диссертации опубликованы 10 печатных работ: 5 статей в рецензируемых изданиях, 5 - в материалах конференций.

Объем и структура диссертации

Текст работы изложен на 200 страницах машинописного текста и состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, четырех глав результатов собственных исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, перспективы дальнейшей разработки, списка сокращений, списка литературы и семи приложений. Диссертация иллюстрирована 21 таблицами и 8 рисунками. Список литературы содержит 325 источников, из которых 60 – отечественные и 265 – зарубежные.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Разработка тест-системы ПЦР-РВ(д) на основе ПЦР-РВ для одновременного выявления ДНК МБТК и НТМБ в одной пробе диагностического материала/культуры

Разработка праймеров и Таq-Маn зондов для выявления НТМБ и их дифференциации от МБТК, оценка стандартных характеристик тест-системы ПЦР-РВ(д) и взаимного влияния амплификации фрагментов ДНК НТМБ и МБТК в одной пробирке

За основу для создания тест-системы, с согласия производителя, был взят набор реагентов «Амплитуб-РВ-Скрин» (НПФ «Синтол», Россия) для быстрого выявления микобактерий туберкулезного комплекса (регистрационное удостоверение № ФСР 2010/07635 от 6 мая 2010 года), основанный на технологии ПЦР-РВ, который был модифицирован и оптимизирован в ходе представленного исследования с целью обеспечения возможности одновременного выявления набором ДНК МБТК и НТМБ в одном образце культуры или диагностического материала. Для этого в реакционную смесь набора, позволяющую детектировать амплификацию многокопийной вставки IS6110 МБТК по каналу FAM, участка однокопийного гена *TBCbp* МБТК по каналу ROX и ДНК внутреннего положительного контроля (ВПК) по каналу R6G, добавили разработанные в результате диссертационного исследования праймеры и зонды, специфичные к ДНК НТМБ, позволяющие детектировать амплификацию фрагментов ДНК НТМБ по каналу Cy5. Для подбора праймеров и зондов, дифференцирующих НТМБ от МБТК, была выбрана консервативная область гена *metH*, не использовавшегося ранее для выявления МБ. Кодированный им белок кобаламин-зависимая метионинсинтаза не был обнаружен в аннотациях сборок геномов *M.xenopi*, *M.kansasii*, *M.malmoense*, представленных в базе данных Genome NCBI. Для выявления этих видов НТМБ и дифференциации от МБТК был выбран участок гена *tuf*, другой фрагмент которого использовали ранее в качестве филогенетического маркера и мишени для видовой идентификации в пределах рода *Mycobacterium* методом ПЦР с последующим анализом методом полиморфизма длин рестриктных фрагментов (Mignard S., Flandrois J.P., 2007; Shin J.H. et al., 2009). На основе выравниваний полных нуклеотидных последовательностей гена *metH* для

геномов НТМБ, депонированных в базу данных Genome NCBI и гена *tuf* для геномов *M.gastri*, *M.kansasii*, *M.malmoense*, *M.xenopi*, были подобраны праймеры для секвенирования фрагментов этих генов в штаммах НТМБ из коллекции ФГБНУ «ЦНИИТ» с целью дальнейшего подбора праймеров и зондов для разработки тест-системы ПЦР-РВ(д). На основе итоговых выравниваний, включающих последовательности штаммов из базы данных NCBI и последовательности, полученные в результате секвенирования коллекционных штаммов, были подобраны праймеры и Taq-Man зонды, позволяющие проводить специфическую амплификацию участков генов *metH* для выявления *M.avium*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M.fortuitum*, *M.peregrinum*, *M.gordonae*, *M.intracellulare*, *M.interjectum*, *M.mucogenicum*, *M.nonchromogenicum*, *M.scrofulaceum*, *M.simiae*, *M.smegmatis*, *M.szulgai* и *tuf* - для выявления *M.gastri*, *M. kansasii*, *M.xenopi* и *M.malmoense*. Их последовательности, характеристики и количество, в котором они были добавлены в РС «Амплитуб-РВ-Скрин», представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результат подбора праймеров и Taq-Man зондов для выявления НТМБ и их дифференциации от МБТК

Название	Последовательность 5'-3'	Tm	Количество в 25 мкл РС, пмоль	Координаты нуклеотидов на референсном геноме <i>M.smegmatis</i> NC_008596.1
Праймеры и зонды, специфичные к участку гена <i>metH</i>				
MeSy_up1	gagcgcaccaaacatcacgg	1,6	4	4263878 - 4263896
MeSy_up2	gagcgcaccaaacatcacgg	1,6	2	4263878 - 4263896
MeSy_low	cctcgtccatgttgatgctga	1,2	6	4263764 - 4263784
MeSy_Pb_C	Cy5-ctgatcaaggccgaggactacgacacc-BHQ2	2,7	2,5	4263879 - 4263905
MeSy_Pb_T	Cy5-ctgatcaaggccgaggattacgacacc-BHQ2	1,5	2,5	4263831 - 4263857
Праймеры и зонды, специфичные к участку гена <i>tuf</i>				Координаты нуклеотидов на референсном геноме <i>M. tuberculosis</i> H37Rv NC_000962.3
Tuf_up	accgacaagccgttctctg	8,4	5	785442-785459
Tuf_low1	cgatctcgacctcctcgttg	2,5	5	785559-785540
Tuf_low2	tggtgctgtcgcttctgat	9,5	6	785585-785562
Tuf_Pb_1up	Cy5-atcgaagacgtgtccatcacacc-BHQ2	7,4	2,5	785466-785490
Tuf_Pb_2up	Cy5-tcttcacgatcacggccgc-BHQ2	4,4	2,5	785476-785495

ПЦР-РВ с полученной смесью проводили в 25 мкл, содержащих 60 пмоль мультиплексируемых праймеров и зондов, 5 мкл концентрированного 5X мастер-микса для проведения ПЦР (НПФ «Синтол», Россия), 10 е.а. модифицированной ДНК-полимеразы (НПФ «Синтол», Россия) и 20 мкл образца ДНК. Амплификацию проводили на приборе CFX-96 (Bio-Rad, США) в следующих условиях: активация фермента - 95°C, 15 мин, далее 45 циклов: денатурация - 95°C – 15 сек, отжиг - 63°C - 45 сек с последующей детекцией флуоресценции.

Оценку эффективности работы праймеров, специфичных к ДНК НТМБ, в присутствии остальных компонентов смеси набора реагентов «Амплитуб-РВ-Скрин» проводили с использованием серии 6 последовательных разведений ДНК, выделенных из штаммов коллекции ФГБНУ «ЦНИИТ» *M.avium*, *M.kansasii*, *M.malmoense*, *M.xenopi*, содержащих 10⁵; 10⁴; 10³; 10²; 20 и 10 геном-эквивалентов. Геномы этих видов представляют четыре варианта последовательностей НТМБ в областях посадки подобранных праймеров и зондов на основании выравнивания нуклеотидных последовательностей фрагментов генов *metH* и *tuf*. Каждое разведение тестировали в 3-х повторях. Значение коэффициента корреляции R² для всех реакций находилось в диапазоне 0.997–0.998, эффективности реакции - 98,8 – 103,5%, а наклона линейной области зависимости порогового цикла от логарифма концентрации ДНК матрицы (Slope) - -3,351 – -3,241, что соответствует диапазонам, рекомендуемым для проведения ПЦР-РВ с любыми стартовыми количествами ДНК (Taylor S. et al., 2010).

Для оценки взаимного влияния амплификации фрагментов геномов НТМБ и МБТК в итоговой смеси проводили амплификацию образцов ДНК НТМБ и МБТК в одной пробирке и рассчитывали разницу пороговых циклов ΔC_t для ДНК смешанных образцов и образцов, содержащих ДНК одной МБ. ДНК *M. avium*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. xenopi* добавляли в пробирку с РС одновременно с ДНК *M. tuberculosis* H37Rv в следующих количествах и соотношениях в ГЭ: $10^6:10^6$; $10^3:10^6$; $10^2:10^6$; $10^6:10$ соответственно. Те же количества ДНК каждого из тех же четырёх видов НТМБ и *M. tuberculosis* H37Rv добавляли в РС итоговой тест-системы по отдельности. ДНК МБТК и НТМБ для этого эксперимента были выделены из коллекционных штаммов ФГБНУ «ЦНИИТ». Амплификацию проводили на приборе CFX96 (Biorad, США) в двух повторах. Разницу пороговых циклов ΔC_t рассчитывали по формуле $\Delta C_t = C_t (NTM+MBT) - C_t (MB)$, где NTM+MBT — смешанный образец ДНК, MB — чистый образец ДНК НТМБ или МБТ. Результаты эксперимента представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты исследования взаимного влияния амплификации фрагментов генома НТМБ и МБТК в одной пробирке

Образец/количество ГЭ в одной ПЦР			Результаты ПЦР		
			Среднее ΔC_t	Среднее ΔC_t	Среднее ΔC_t
НТМБ	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv		Sy5 (НТМБ)	FAM (МБТ)	ROX (МБТ)
<i>M. avium</i>	10^6	10	0,09	0,33	-0,4
	10^6	10^6	1,33	0,28	0,9
	10^3	10^6	1,2	0,15	0,15
	10^2	10^6	1,7	0,1	0,46
<i>M. kansasii</i>	10^6	10	-0,12	-0,2	-0,4
	10^6	10^6	1,77	0,05	0,98
	10^3	10^6	1,38	0,14	0,09
	10^2	10^6	1,6	0,19	0,15
<i>M. malmoense</i>	10^6	10	0,31	0,7	0
	10^6	10^6	0,15	-0,09	0,9
	10^3	10^6	0,4	0,06	0
	10^2	10^6	-0,2	0,15	0,2
<i>M. xenopi</i>	10^6	10	-0,1	0,6	-0,6
	10^6	10^6	1,36	0,14	1,1
	10^3	10^6	2	0,06	0,1
	10^2	10^6	1,9	0,2	0,1

Значение ΔC_t по каналам FAM и ROX для образцов, содержащих 10^6 ГЭ ДНК НТМБ, смешанной с 10 ГЭ ДНК *M. tuberculosis* H37Rv, и образцов, содержащих только 10 ГЭ ДНК *M. tuberculosis* H37Rv была меньше или равна 0,7. Разница пороговых циклов амплификации пробы, содержащей 10 ГЭ ДНК МБТ в присутствии 10^6 ГЭ ДНК НТМБ и в их отсутствии, составила от -0,4 до 0 циклов для канала ROX, по которому регистрировали амплификацию однокопийного участка генома МБТК, что свидетельствует об отсутствии влияния добавления праймеров и зондов ДНК НТМБ на амплификацию ДНК МБТК.

Эффективность реакции амплификации ДНК НТМБ в смешанных образцах была ниже, чем в образцах, содержащих только ДНК НТМБ. Для всех образцов ДНК НТМБ, использованных в эксперименте, кроме ДНК *M. malmoense*, значение ΔC_t по каналу Sy5 было наибольшим при содержании 10^2 - 10^3 ГЭ ДНК НТМБ и 10^6 ГЭ ДНК *M. tuberculosis* H37Rv и варьировало от 1,7 цикла для *M. avium* до 2,0 циклов для *M. xenopi* (Таблица 3). Значение ΔC_t между смешанными с ДНК *M. tuberculosis* H37Rv и чистыми образцами ДНК *M. malmoense* было незначительно и составило 0,4 цикла и меньше (Таблица 3). Это можно объяснить

большей специфичностью реакции амплификации для *M.malmoense* ввиду того, что один из обратных праймеров, использованных в дизайне тест-системы, специфичен только к этому виду НТМБ, следовательно, отжигается на менее консервативную последовательность. Таким образом, показана возможность одновременной детекции ДНК НТМБ и ДНК МБТК в соотношении 1:10000 и ДНК МБТК в смеси с ДНК НТМБ при соотношении 1:100000 (Таблица 3). Пример обнаружения ДНК *M.avium* на фоне ДНК *M.tuberculosis* представлен на рисунке 2 Б, пример обнаружения ДНК *M.tuberculosis* на фоне *M.avium* представлен на рисунке 2 Г. На рисунке 2 А представлена кривая амплификации 100 ГЭ ДНК *M.avium*, на рисунке 2 В – кривая амплификации 10 ГЭ ДНК *M.tuberculosis*.

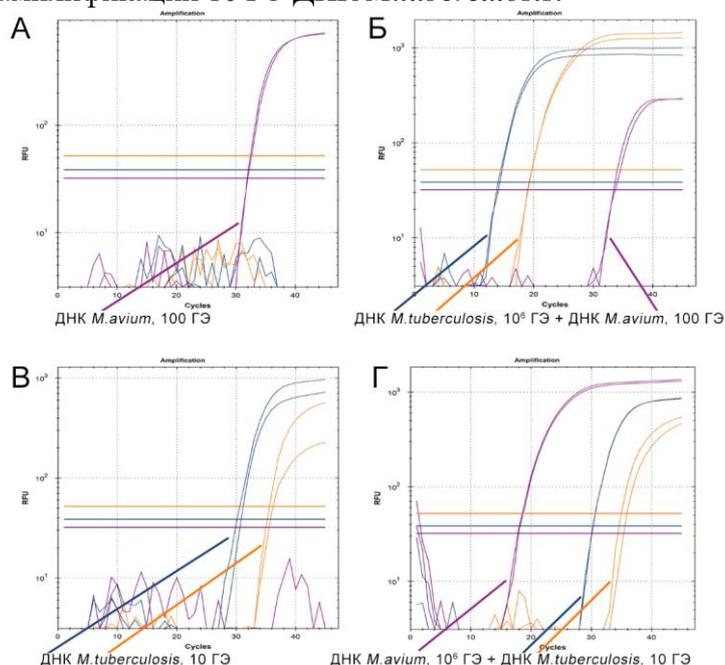


Рисунок 2 – Взаимное влияние амплификации специфических участков геномов НТМБ и МБТК на примере *M.avium* и *M.tuberculosis*

Примечание: ГЭ – геном-эквиваленты; RFU – ОЕФ, относительные единицы флуоресценции. А – амплификация 100 ГЭ ДНК *M.avium*; Б - амплификация 100 ГЭ ДНК *M.avium* в присутствии 10^6 ГЭ ДНК *M.tuberculosis*; В – амплификация 10 ГЭ ДНК *M.tuberculosis*; Г - амплификация 10 ГЭ ДНК *M.tuberculosis* в присутствии 10^6 ГЭ ДНК *M.avium*

Оценка чувствительности и специфичности тест-системы ПЦР-РВ(д) для одновременного выявления ДНК МБТК и НТМБ на ДНК, выделенной из культур МО

Предварительную оценку аналитической специфичности и чувствительности тест-системы ПЦР-РВ(д) проводили на штаммах МО из коллекции ФГБНУ «ЦНИИТ». 18 штаммов 18 видов НТМБ, 5 штаммов *M. tuberculosis*, 5 штаммов *M. bovis BCG* и 6 штаммов *M. bovis Bovinus* были выявлены по специфичным для них каналам. 14 штаммов 14 видов микроорганизмов (МО), не относящихся к роду *Mycobacterium*, не дали положительного сигнала ни на одном из каналов детекции.

Оценку чувствительности и специфичности проводили с использованием 847 культур, полученных на ЖПС Bactec MGIT 960 из респираторного материала от больных из ФГБНУ «ЦНИИТ». По результатам первичной идентификации 301 культура принадлежала кислотоустойчивым микроорганизмам (КУМ), 500 культур - МБТК и 46 культур - МО, не принадлежащих к роду *Mycobacterium*. Культуры были проанализированы с использованием тест-системы ПЦР-РВ(д) и референсного метода – наборами реагентов CM/AS/MTB (Hain Lifescience, Германия). Ни одна из 46 культур МО, не принадлежащих к МБТК и КУМ, не была

детектирована тест-системой ПЦР-РВ(д) ни по одному из каналов флуоресценции, все культуры НТМБ и МБТК были детектированы корректно по соответствующим каналам флуоресценции. Необходимо отметить, что среди культур НТМБ было выявлено 4 смешанных образца, один из которых содержал смесь *M. tuberculosis* и *M. avium*, а три другие – смеси *M. tuberculosis* и *M. abscessus*. Результаты анализа культур НТМБ и МБТК тест-системой ПЦР-РВ(д) и референсным методом представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Штаммы НТМБ и МБТК, использованные для оценки аналитической чувствительности и результаты их видовой идентификации и анализа с использованием тест-системы ПЦР-РВ(д) и референсного метода

Вид, Genotype CM/AS/MTB	Число культур	Результат ПЦР-РВ на выявление НТМБ/МБТК			
		Положительные по каналу Су5 (НТМБ)	Положительные по каналу FAM (МБТК)	Положительные по каналу ROX (МБТК)	Положительные по каналу R6G (ВПК)
<i>M.abscessus</i> + <i>M.tuberculosis</i>	3	+	+	-	+
<i>M.avium</i> + <i>M.tuberculosis</i>	1	+	+	-	+
<i>M.abscessus</i>	10	+	-	-	+
<i>M.avium</i>	107	+	-	-	+
<i>M.chelonae</i>	8	+	-	-	+
<i>M.fortuitum</i>	25	+	-	-	+
<i>M.gordonae</i>	54	+	-	-	+
<i>M.intracellulare</i>	38	+	-	-	+
<i>M.kansasii</i>	23	+	-	-	+
<i>M.lentiflavum</i>	14	+	-	-	+
<i>M.mucogenicum</i>	1	+	-	-	+
<i>M.peregrinum</i>	2	+	-	-	+
<i>M.scrofulaceum</i>	1	+	-	-	+
<i>M.xenopi</i>	14	+	-	-	+
Всего штаммов НТМБ	301				
<i>M.tuberculosis</i>	494	-	+	+	+
<i>M.bovis Bovinus</i>	3	-	+	+	+
<i>M.bovis BCG</i>	3	-	+	+	+
Всего штаммов МБТК	500				

Т.о. была показана 100% чувствительность и специфичность тест-системы к ДНК МБТК и НТМБ, выделенных из культур, а также возможность выявления смешанных образцов культур, содержащих одновременно МБТ и НТМБ.

Оценка чувствительности и специфичности тест-системы ПЦР-РВ(д) для одновременного выявления ДНК МБТК и НТМБ на ДНК, выделенной из образцов диагностического материала

Для оценки диагностической специфичности и чувствительности тест-системы ПЦР-РВ(д) были проанализированы 3757 образцов диагностического материала от 1416 пациентов с диагнозом ТБ лёгких, 609 образцов диагностического материала от 190 пациентов с подтверждённым диагнозом микобактериоз и 380 образцов от 267 пациентов с другими заболеваниями лёгких – бронхоэктатическая болезнь, хроническая обструктивная болезнь легких, пневмония. Схема анализа образцов диагностического материала представлена на рисунке 1. Для взятых в исследование больных диагноз ТБ был подтвержден культуральным методом. Для всех больных с диагнозом микобактериоз были получены культуры НТМБ на ЖПС в ВАСТЕС MGIT 960 из 2х или более собранных в разные дни образцов мокроты, либо одного образца БАЛ, либо образца операционного материала согласно (Griffith D.E. et al., 2007). Результаты анализа с использованием тест-системы ПЦР-РВ(д) сравнивали с результатами

культивирования анализируемого материала в ЖПС на ВАСТЕС MGIT 960 и люминесцентной микроскопии мазков, приготовленных из того же материала. В 12 образцах от 6 пациентов с диагнозом ТБ при анализе полученных культур была выявлена смесь НТМБ и МБТК, ввиду этого все образцы от этих больных в количестве 53 были исключены из выборки для оценки диагностической чувствительности и специфичности тест-системы. Чувствительность разработанной тест-системы ПЦР-РВ(д) в отношении образцов диагностического материала, рассчитанная, исходя из количества больных, положительных по результатам анализа, составила 93,3% к ДНК МБТК и 72,4% - к ДНК НТМБ. Прогностическая ценность положительного результата теста на выявление ДНК МБ составляет 100%, отрицательного – 89,2%. Результаты оценки диагностической чувствительности и специфичности представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты оценки диагностической чувствительности и специфичности тест-системы ПЦР-РВ(д)

Диагноз	Всего, число		ВАСТЕС MGIT960		ПЦР-РВ		ЛЮМ*
			МБТ	НТМБ	МБТ (%)	НТМБ (%)	КУМ (%)
Туберкулёз	образцы	3685	3685	0	3387 (91,9)	0	1867 (50,7)
	пациенты	1403	1403	0	1309 (93,3)	0	814 (58)
Микобактериоз	образцы	600	0	600	0	311 (51,8)	289 (48,2)
	пациенты	185	0	185	0	134 (72,4)	118 (63,8)
Другие заболевания	образцы	358	0	0	0	0	2 (0,53)
	пациенты	256	0	0	0	0	2 (0,75)

*Примечание: ЛЮМ – люминесцентная микроскопия

Оценка 95% предела обнаружения (LoD95%) ДНК МБ в пробе клинического материала.

Для оценки LoD95% ДНК МБТ к образцам мокроты, отрицательной на МБ, добавляли культуру *M.tuberculosis* H37Rv таким образом, чтобы количественное содержание МБТ в полученной панели модельных образцов составляло 20, 10, 5, 2 и 0 КОЕ/мл. Образцы, содержавшие 20, 10, 5 и 2 КОЕ/мл были проанализированы в 20 повторах, образец, содержавший 0 КОЕ/мл – в 16 повторах. Для оценки LoD95% ДНК *M.avium* готовили панель модельных образцов из мокроты, отрицательной на МБ, и культуры штамма *M.avium* из коллекции ФГБНУ «ЦНИИТ» с количественным содержанием *M.avium* в итоговых образцах 10000, 1000, 500, 300, 150 и 0 КОЕ/мл. Образцы, содержащие 10000 и 0; 1000; 150, 300, 500 КОЕ/мл, были проанализированы в 8, 16 и 20 повторах соответственно.

Полученные панели образцов анализировали тест-системой ПЦР-РВ(д) (Таблица 6).

Таблица 6 - Результаты анализа смешанных модельных образцов мокроты, содержащих культуры *M.tuberculosis* H37Rv и *M.avium*, использованные для расчёта предела обнаружения ДНК МБТ и *M.avium* с вероятностью 95% тест-системой ПЦР-РВ(д)

Штамм МБ	Количественное содержание в образце, КОЕ/мл	Число повторов	Количество положительных результатов (%)		
			IS6110, FAM, детекция МБТК	<i>TbChp</i> , ROX детекция МБТК	<i>metH</i> (Cy5), детекция НТМБ
<i>M.tuberculosis</i> H37Rv	20	20	20 (100)	13 (65)	0
	10	20	20 (100)	5 (25)	0
	5	20	14 (70)	2 (10)	0
	2	20	11 (55)	1 (5)	0
	0	16	0 (0)	0 (0)	0
<i>M. avium</i>	10000	8	0	0	8 (100)
	1000	16	0	0	16 (100)
	500	20	0	0	17 (85)
	300	20	0	0	13 (65)
	150	20	0	0	10 (50)
	0	8	0	0	0 (0)

LoD95% ДНК *M. tuberculosis* H37Rv составил 58 КОЕ/мл для однокопийного участка генома МБТК (фрагмента гена *TBCp*) и 16 КОЕ/мл для участка многокопийной вставки *IS6110*. Предел обнаружения LoD95% для ДНК *M. avium* составил 1200 КОЕ/мл.

Разработка тест-системы ПЦР-РВ(и) на основе ПЦР-РВ для видовой идентификации НТМБ в образцах диагностического материала/культур от больных

Выбор видов НТМБ для идентификации тест-системой ПЦР-РВ(и)

Для отбора видов НТМБ для создания тест-системы для видовой идентификации НТМБ в образцах диагностического материала/культур нами были проанализированы эпидемиологические данные по распространённости НТМБ на территории РФ, полученные в ходе мониторинга видового разнообразия НТМБ в ряде областей РФ с использованием ДНК-стрипов Genotype Mycobacterium CM/AS (hain lifescience, Германия), и видовая принадлежность штаммов от больных с подозрением на ТБ и микобактериоз лёгких, проходивших диагностику в ФГБНУ «ЦНИИТ» и лабораториях 17 региональных центров РФ (Таблица 7).

Таблица 7 - Результаты анализа штаммов НТМБ, полученных от больных с подозрением на ТБ и микобактериоз лёгких

Вид НТМБ	Больные, n	Больные, %
<i>M.avium</i>	223	27,6
<i>M.lentiflavum</i>	127	15,4
<i>M.intracellulare</i>	111	13,5
<i>M.gordonae</i>	77	9,4
<i>M.fortuitum</i>	76	9,2
<i>M.abscessus</i>	62	7,5
<i>M.kansasii</i>	53	6,4
<i>M.xenopi</i>	39	4,7
<i>M.chelonae</i>	18	2,2
<i>M.peregrinum</i>	10	1,2
<i>M.malmoense</i>	8	1
<i>M.smegmatis</i>	4	0,5
<i>M.mucogenicum</i>	3	0,4
<i>M.szulgai</i>	2	0,2
<i>M.interjectum</i>	2	0,2
<i>M.scrofulaceum</i>	1	0,1
<i>M.simiae</i>	1	0,1
<i>M.arupense*</i>	1	0,1
<i>M.kumamotoense*</i>	1	0,1
Всего	822	

*Примечание: Вид НТМБ был определён секвенированием последовательностей переменных участков гена 16S рРНК и *hsp65*, т.к. не входит в панель видов, определяемых наборами Genotype CM/AS

На основе проведённого анализа для разработки тест-системы были отобраны следующие виды НТМБ: *M.abscessus*, *M.chelonae*, *M.avium*, *M.gordonae*, *M.fortuitum*, *M.fortuitum peregrinum*, *M.intracellulare*, *M.kansasii*, *M.lentiflavum*, *M.malmoense*, *M.mucogenicum*, *M.smegmatis*, *M.xenopi*.

Для разработки праймеров и зондов для видовой идентификации НТМБ были отобраны ДНК-мишени – одна для быстрорастущих (101700 - 102400 нуклеотиды на референсном геноме *M.abscessus*, NZ_FVOX01000008.1, NCBI) и одна – для медленно растущих НТМБ (29579 – 30403 нуклеотиды на референсном геноме *M.avium* NZ_LMVV01000015, NCBI), кодирующие белки с неизвестной функцией, содержащие консервативные домены. На основе выравниваний нуклеотидных последовательностей этих локусов в геномах, доступных в базе данных NCBI, были подобраны праймеры для прямого секвенирования в клинических штаммах НТМБ. Для

секвенирования было отобрано максимальное число штаммов каждого вида НТМБ от разных больных (Таблица 8).

Таблица 8 - Штаммы НТМБ, использованные для оценки внутривидовой вариабельности локусов, отобранных для разработки тест-системы для видовой идентификации НТМБ

№	Название вида	Число штаммов	№	Название вида	Число штаммов
1	<i>M.avium</i>	25	9	<i>M.kansasii</i>	25
2	<i>M.abscessus</i>	22	10	<i>M.lentiflavum</i>	25
3	<i>M.chelonae</i>	21	11	<i>M.mucogenicum</i>	3
4	<i>M.fortuitum</i>	19	12	<i>M.peregrinum</i>	4
5	<i>M.gastri</i>	1	13	<i>M.smegmatis</i>	2
6	<i>M.gordonae</i>	24	14	<i>M.scrofulaceum</i>	1
7	<i>M.intracellulare</i>	25	15	<i>M.simiae</i>	1
8	<i>M.interjectum</i>	1	16	<i>M.xenopi</i>	16
Всего			214		

Гомологичные последовательности, включенные в выравнивание, были найдены в GenBank NCBI для следующих целевых видов: *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.gordonae*, *M.kansasii*, *M.lentiflavum*, *M.xenopi*, *M.abscessus*, *M.chelonae*, *M.fortuitum*, *M.mucogenicum*, *M.smegmatis*. Также были проанализированы геномы *M.scrofulaceum* и *M.interjectum*, встречающихся на территории РФ с меньшей частотой, и геномы *M.gastri*, *M.simiae*, по одному штамму которых содержатся в коллекции ФГБНУ «ЦНИИТ». Для всех взятых в анализ штаммов были получены и секвенированы ПЦР-продукты ожидаемой длины. Для оценки внутривидовой вариабельности секвенированных локусов были составлены их выравнивания для каждого исследованного вида НТМБ с включением штаммов, депонированных в базу данных Genbank NCBI. На основании полученных выравниваний было определено количество генотипов (вариантов последовательности проанализированной области генома, несущих одинаковые единичные замены относительно консенсуса) исследуемых участков геномов для каждого вида. Количество штаммов и генотипов в пределах исследованных локусов для проанализированных видов НТМБ представлено в таблице 9.

Таблица 9 - Внутривидовая вариабельность исследованных штаммов НТМБ

№	Название вида	Число штаммов	Число генотипов
1	<i>M.avium</i>	125	1
2	<i>M.gastri</i>	2	1
3	<i>M.gordonae</i>	30	5
4	<i>M.intracellulare</i>	35	6
5	<i>M.interjectum</i>	3	2
6	<i>M.kansasii</i>	29	2
7	<i>M.lentiflavum</i>	26	1
8	<i>M.xenopi</i>	22	1
9	<i>M.simiae</i>	2	1
Всего, медленнорастущие НТМБ		274	20
10	<i>M.abscessus</i>	50	4
11	<i>M.chelonae</i>	26	4
12	<i>M.fortuitum</i>	38	4
13	<i>M.mucogenicum</i>	6	4
14	<i>M.peregrinum</i>	11	4
15	<i>M.smegmatis</i>	7	1
Всего, быстрорастущие НТМБ		138	21
Исследовано штаммов		412	

Т.к. на момент проведения исследования в противотуберкулезной лабораторной службе в основном использовали амплификаторы, оборудованные четырехканальной системой детекции, в дизайне тест-системы ориентировались на использование 4х каналов флуоресценции. В качестве ВПК ПЦР использовали синтетическую последовательность ДНК, соответствующую 1619 - 2287

нуклеотидам митохондриального гена *cox2* тихоходки *Hypsibius dujardini* (NC_014848.1, GenBank NCBI), и систему праймеров и зонда к ней. Для идентификации НТМБ использовали 3 флуорофора в одной РС для обеспечения возможности выявления 3 видов НТМБ в одной пробирке. На основе полученных выравниваний, были подобраны специфичные пары праймеров. Проверка всех возможных их комбинаций в пределах одной группы выявляемых видов с помощью он-лайн ресурса Primer blast (NCBI, США) не выявила возможности посадки на геномы МО из близкородственных семейств *Corynebacteriaceae*, *Nocardiaceae* и встречающихся у больных муковисцидозом, являющихся группой риска для развития микобактериоза и ТБ, *Pseudonadaceae* и *Burkholderiaceae* (Поликарпова С.В. и др., 2016; Шагинян И.А. и др., 2017). Последовательности праймеров, специфичные к ДНК целевых видов НТМБ и ДНК ВПК, представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Праймеры и зонды, специфичные к 12 видам НТМБ, вошедшими в дизайн тест-системы ПЦР-РВ(и), последовательность ВПУ и специфичные к ней праймеры

№*	Название праймера/зонда	Последовательность 5'-3'	Tm*	C*	Детектируемая мишень
1	Последовательность ВПК	ccttctaaaacccccacacaaatTTTTTTtcttctactgatgta cttcattgctgaacaatcccttagactaggggtaaaagcaga ctcaacccccaggacgtctaa	88,4	3	
	Hybs_F	ccttctaaaacccccacaca	58,4	3	
	Hybs_R	ttagacgtcctgggggtgag	60,5	3	
	Hybs_Pb	(Cy5)tcatgcttgaacaatcccttagactagg(BHQ2)	66,6	5	ДНК ВПК
2	Pup_F_intra	gcgaatcgaattgctctacagc	62,1	3	
	Pup_F_xenopi	gcgaatcgaattgctctacagc	64,2	5	
	Pup_F_avium	gcgcatcgaactgctctacag	63,2	3	
	Pup_R_intra_avium	gcgcatgatgccccgctc	62,9	5	
	Pup_R_xenopi	gcgcatgatgccccgttc	60,8	5	
	M_avium_Pb	(R6G)gcctcgctgcagcaccgc(BHQ2)	70,7	10	ДНК <i>M.avium</i>
	M_intra_Pb_1	(FAM)cgcgtcacgctgcacctccgc(RTQ1)	71	3	ДНК <i>M.intracellulare</i>
	M_intra_Pb_2	(FAM)cgcgtcacgctgcacgctggc(RTQ1)	71	3	
M_xenopi_Pb	(ROX)gcacgcgctgcacccgcg(BHQ2)	70,7	5	ДНК <i>M.xenopi</i>	
3	Pup_F_1	gggctgttcggcgacga	59,8	5	
	Pup_F_kansasii	gggctgttcgacgacga	57,3	5	
	Pup_F4_TT_gord	tcgctgttcggtgacgaacc	60,5	5	
	Pup_F_lenti	ggaattgttcggcgacga	56,3	3	
	Pup_R_kansasii	ggtagatccgcccgcgact	62,5	5	
	Pup_R_go_new1	gcgacgcgcaaataccgc	63,6	5	
	Pup_R_go_new2	gcgacgcgcaagtaccgc	62,9	5	
	Pup_kan_Pb_low1	(FAM)tcgcccggcgacatcgggttc(RTQ1)	69	2	ДНК <i>M.kansasii</i>
	Pup_kan_Pb_low2	(FAM)tcgcccggcgacgctgagttc(RTQ1)	69	2	
	Pup_gord_Pb_v1_2	(ROX)accgacgagatcgggcatgt(BHQ2)	66,6	1,8	ДНК <i>M.gordoniae</i>
	Pup_gord_Pb_v2_2	(ROX)ctcaccgacgaatcggtcagct(BHQ2)	62,5	1,8	
Pup_Pb_lenti_new	(R6G)gacgagctggccatgctggta(RTQ1)	68,3	5	ДНК <i>M.lentiflavum</i>	
4	Abft_f_absc_mucog	ccgctgaacctgcagatcga	62,5	5	
	Abft_f_chelonae	ccgctgaacctgcagataga	60,5	0,2	
	Abft_r_che_abs_1	gccagcgcgaacggc	60,9	0,2	
	Abft_r_che_abs_2	caccagcgcgaacggc	61,8	0,2	
	Abft_r_mucog	cgccagcgcgaacgg	60,9	0,12	
	Abft_abs_Pb_v2	(FAM)ttggcatgccgggtgaattggcg(RTQ1)	68,3	0,12	ДНК <i>M.abscessus</i>
	Abft_che_up3	(ROX)gaaccggaagtgggctggc(BHQ2)	66,6	0,08	ДНК <i>M.chelonae</i>
	Abft_Pb_mucog	(R6G)tgcgaggtgctgtggtggg(RTQ1)	66,6	0,12	ДНК <i>M.mucogenicum</i>
5	Abft_F_fort_pereg	aaccttcagatcgagcccga	60,5	0,2	
	Abft_F_smegm	ctgcagatcgaacccgaggt	62,5	0,2	
	Abft_R_fort_per_smg	gtcgtgaaggccgacgag	60,8	0,2	
	Abft_fort_Pb_up	(FAM)caccgtgcgcggttgaacc(RTQ1)	69	0,12	ДНК <i>M.fortuitum</i>
	Abft_pereg_Pb_up	(R6G)ccgtggtgcggtggagcc(BHQ2)	68,1	0,16	ДНК <i>M.peregrinum</i>
	Abft_smegm_Pb_up	(ROX)gacacggtgccccgctcga(BHQ2)	68,7	0,08	ДНК <i>M.smegmatis</i>

*Примечание: № - номер смеси праймеров и зондов (СПЗ); Tm – температура плавления, °C; C – концентрация олигонуклеотидов в мМ

Виды НТМБ были сгруппированы так, чтобы максимально сократить количество специфических праймеров и зондов. Были разработаны 4 смеси праймеров и зондов (СПЗ), каждая из которых позволяет выявлять ДНК 3х видов НТМБ и ДНК ВПК. Итоговый дизайн тест-системы представляет собой 5 пробирок объёмом 0,2 мл, соединённых в стрип. Четыре из них содержат каждая по 5 мкл 5X мастер-микса для проведения ПЦР (НПФ «Синтол», Россия), праймеры и зонды, специфичные для ДНК ВПК и 3-х видов НТМБ, и 10 е.а. ДНК-полимеразы (НПФ «Синтол», Россия). Контрольная пробирка содержит РС тест-системы ПЦР-РВ(д). Дизайн тест-системы ПЦР-РВ(и) представлен в таблице 11.

Таблица 11 – Итоговый дизайн тест-системы ПЦР-РВ(и)

Канал детекции	Номер пробирки в стрипе				
	1 (К*)	2	3	4	5
FAM	МБТК	<i>M.intracellulare</i>	<i>M.kansasii</i>	<i>M.abscessus</i>	<i>M.fortuitum</i>
ROX	НТМБ	<i>M.xenopi</i>	<i>M.gordonae</i>	<i>M.chelonae</i>	<i>M.smegmatis</i>
R6G	МБТК	<i>M.avium</i>	<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.mucogenicum</i>	<i>M.peregrinum</i>
Cy5	ВПК	ВПК	ВПК	ВПК	ВПК

*Примечание: К - Контрольная пробирка – необходима для того, чтобы культуры, принадлежащие к видам, не определяемым тест-системой, не выбраковывались из анализа

Оценка аналитической чувствительности и специфичности тест системы ПЦР-РВ(и) для видовой идентификации НТМБ в образцах культур

Для предварительной оценки специфичности разработанных СПЗ использовали ДНК, выделенную из штаммов НТМБ, представленных в таблице 7, а также ДНК, выделенную из коллекционных штаммов НТМБ (18 штаммов 18ти видов), МБТК (16 штаммов 2х видов) и МО, не относящихся к МБ (14 штаммов 14 видов). Все реакции проводили в объеме 25 мкл, содержащем 5 мкл концентрированного 5X мастер-микса для проведения ПЦР (НПФ «Синтол», Россия), 10 е.а. модифицированной ДНК-полимеразы (НПФ «Синтол», Россия), 2 мкл образца ДНК, праймеры и зонды в концентрациях, указанных в таблице 10 и воду для проведения ПЦР. Амплификацию проводили на приборе CFX-96 (Bio-Rad, США) в следующих температурных условиях: активация фермента - 95°C, 15 мин, далее 45 циклов: денатурация - 95°C – 15 сек, отжиг - 61°C - 45 сек с последующей детекцией флуоресценции. Все проанализированные образцы НТМБ были корректно идентифицированы до вида, ни для одного из них не было получено ложноположительных сигналов. Для видов НТМБ, не определяемых тест-системой (*M.gastri*, *M.interjectum*, *M.malmoense*, *M.nonchromogenicum*, *M.scrofulaceum*, *M.simiae*, *M.szulgai*), был получен результат *Mycobacterium* sp. благодаря наличию контрольной пробирки (таблица 11). Для МО, не принадлежащих роду *Mycobacterium*, во всех случаях были получены отрицательные результаты ПЦР по каналам детекции ДНК МБ. Т. о., предварительная оценка показала 100% аналитическую чувствительность и специфичность тест-системы ПЦР-РВ(и). Примеры результатов амплификации ДНК некоторых видов, детектируемых и идентифицируемых тест-системой, представлены на рисунке 3. На панелях А, Б, В представлены кривые амплификации видоспецифических и специфических для группы НТМБ фрагментов ДНК НТМБ. Панель Г иллюстрирует возможность выявления смеси двух штаммов НТМБ, принадлежащих к разным видам (*M. abscessus* и *M. intracellulare*), панель Д – одновременное выявление ДНК НТМБ и МБТК (*M.avium* и *M.tuberculosis* complex) с идентификацией НТМБ до вида.

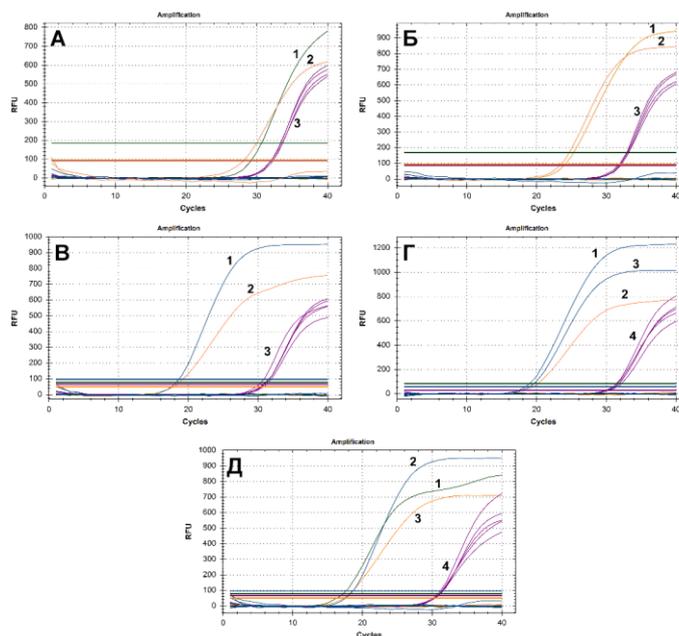


Рисунок 3 - Примеры идентификации некоторых видов НТМБ с использованием тест-системы ПЦР-РВ(и)

Примечания: А - детекция и идентификация ДНК *M. avium*: 1 – кривая амплификации специфического фрагмента ДНК *M. avium*, канал R6G (зелёный); 2 - кривая амплификации специфического фрагмента ДНК НТМБ, канал ROX (оранжевый); 3 - кривая амплификации ДНК ВПК, канал Cy5 (фиолетовый); Б – детекция и идентификация ДНК *M. xenopi*: 1 - кривая амплификации специфического фрагмента ДНК *M. xenopi*, канал ROX (оранжевый); 2 - кривая амплификации специфического фрагмента ДНК НТМБ, канал ROX (оранжевый); 3 - кривая амплификации ДНК ВПК, канал Cy5 (фиолетовый); В - детекция и идентификация ДНК *M. intracellulare*. 1 - кривая амплификации специфического фрагмента ДНК *M. intracellulare*, канал FAM (голубой); 2 - кривая амплификации специфического фрагмента ДНК НТМБ, канал ROX (оранжевый); 3 - кривая амплификации ДНК ВПК, канал Cy5 (фиолетовый); Г - детекция и идентификация смеси ДНК *M. intracellulare* и *M. abscessus*. 1 - кривая амплификации специфического фрагмента ДНК *M. intracellulare*, канал FAM (голубой); 2 - кривая амплификации специфического фрагмента ДНК НТМБ, канал ROX (оранжевый); 3 - кривая амплификации специфического фрагмента ДНК *M. abscessus*, канал FAM (голубой); 4 - кривая амплификации ДНК ВПК, канал Cy5 (фиолетовый); Д - детекция и идентификация смеси ДНК *M. avium* и *M. tuberculosis complex*. 1 - кривая амплификации специфического фрагмента ДНК *M. avium*, канал R6G (зелёный); 2 – кривая амплификации специфического фрагмента ДНК МБТК, канал FAM (голубой); 3 - кривая амплификации специфического фрагмента ДНК НТМБ, канал ROX (оранжевый); 4 - кривая амплификации ДНК ВПК, канал Cy5 (фиолетовый).

Оценка чувствительности и специфичности тест-системы ПЦР-РВ(и) для видовой идентификации НТМБ в образцах клинического материала культур

Анализ 343 образцов клинического материала от 185 пациентов с подозрением на микобактериоз тест-системой ПЦР-РВ(и) показал наличие ДНК НТМБ во всех 343 образцах. Вид НТМБ был идентифицирован для 342 образцов. Образец, вид для которого не был идентифицирован, был детектирован по каналу ROX в контрольной пробирке как *Mycobacterium* sp.. Наиболее часто встречающимся видом среди медленно растущих НТМБ по результатам анализа был *M. avium*, среди быстрорастущих – *M. abscessus*. Для 6 образцов было показано наличие двух видов МБ в диагностическом материале. Анализ 513 образцов диагностического материала от больных с верифицированным диагнозом ТБ лёгких тест-системой ПЦР-РВ(и) показал наличие ДНК МБТ и отсутствие ДНК НТМБ. Для 117 образцов от пациентов с заболеваниями лёгких немикобактериальной этиологии было показано отсутствие ДНК НТМБ и МБТК. Результаты анализа образцов клинического материала с помощью тест-системы ПЦР-РВ(и) отражены в таблице 12.

Таблица 12 - Результаты анализа образцов диагностического материала с использованием тест-системы ПЦР-РВ(и) для видовой идентификации НТМБ

Результат ПЦР по используемым в тест-системе ПЦР-РВ(и) каналам флуоресценции					Результат идентификации	Количество образцов	Количество пациентов	*Доля пациентов, %
Номер пробирки в стрипе								
1	2	3	4	5				
+/-	+/-	+/-	+/-	ROX	НТМБ	343	185	100,00
R6G	-	-	-	ROX	<i>M. avium</i>	133	76	41,08
-	-	FAM	-	ROX	<i>M. abscessus</i>	72	27	14,59
-	FAM	-	-	ROX	<i>M. kansasii</i>	31	17	9,19
FAM	-	-	-	ROX	<i>M. intracellulare</i>	27	14	7,57
ROX	-	-	-	ROX	<i>M. xenopi</i>	20	9	4,86
-	-	-	FAM	ROX	<i>M. fortuitum</i>	16	8	4,32
-	ROX	-	-	ROX	<i>M. gordonae</i>	14	11	5,95
-	-	ROX	-	ROX	<i>M. chelonae</i>	11	10	5,41
R6G	-	-	-	ROX, FAM	<i>M. avium</i> + МБТК	1	1	0,54
FAM	-	FAM	-	ROX	<i>M. intracellulare</i> + <i>M. abscessus</i>	5	2	1,08
-	R6G	-	-	ROX	<i>M. lentiflavum</i>	6	6	3,24
-	-	R6G	-	ROX	<i>M. mucogenicum</i>	6	3	1,62
-	-	-	-	ROX	<i>Mycobacterium sp.</i>	1	1	0,54
-	-	-	-	FAM	МБТК	513	513	100,00
-	-	-	-	-	МО, не принадлежащие к роду <i>Mycobacterium</i>	117	117	-
Всего						973	815	

*Примечание: доля пациентов, положительных на наличие микобактерий по результатам анализа с использованием тест-системы ПЦР-РВ(и)

Образцы, полученные от пациентов с заболеваниями легких немикобактериальной этиологии, не дали рост в системе ВАСТЕС. Из 343 образцов от пациентов с подозрением на микобактериоз было получено 305 культур, первичная идентификация которых показала их принадлежность к КУМ, не относящимся к МБТК. Результаты видовой идентификации с использованием тест-системы ПЦР-РВ(и) и референсной тест-системы GenoType CM/AS (Hain, Германия) показали высокую сходимость (Таблица 13).

Таблица 13 - Сравнение результатов видовой идентификации культур НТМБ, полученных с использованием тест-системы ПЦР-РВ(и) и референсной тест-системы GenoTypeCM/AS

Результат видовой идентификации, ПЦР-РВ	Результат видовой идентификации, GenoTypeCM/AS	Число культур
<i>M. avium</i>	<i>M. avium</i>	127
<i>M. abscessus</i>	<i>M. abscessus</i>	66
<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>	31
<i>M. intracellulare</i>	<i>M. intracellulare</i>	21
<i>M. fortuitum</i>	<i>M. fortuitum</i>	16
<i>M. xenopi</i>	<i>M. xenopi</i>	15
<i>M. gordonae</i>	<i>M. gordonae</i>	12
<i>M. chelonae</i>	<i>M. chelonae</i>	4
<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. lentiflavum</i>	3
<i>M. mucogenicum</i>	<i>M. mucogenicum</i>	3
<i>Mycobacterium sp.</i>	<i>M. malmoense</i>	1
<i>M. avium</i> + <i>M. tuberculosis</i>	<i>M. avium</i> + <i>M. tuberculosis</i>	1
<i>M. intracellulare</i> + <i>M. abscessus</i>	<i>M. intracellulare</i> + <i>M. abscessus</i>	5
Всего культур НТМБ		818

Полученные с помощью тест-системы ПЦР-РВ(и) результаты видовой идентификации МБ из диагностического материала от больных совпали с результатами для соответствующих этим образцам культур. Наличие в 6 образцах смеси штаммов, принадлежащих к разным видам НТМБ, было подтверждено результатами анализа культур с использованием тест-системы ПЦР-РВ(и) и референсной тест-системы Genotype CM/AS (Hain, Германия). 513 образцов от больных ТБ дали рост в системе ВАСТЕС MGIT960, все 513 культур были определены обеими тест-системами как МБТ. Т.о., чувствительность тест-системы ПЦР-РВ(и) для видовой идентификации НТМБ в образцах клинического материала составила 99,71% при специфичности 100%, чувствительность для видовой идентификации НТМБ в образцах культур - 99,67% при специфичности 100%; чувствительность и специфичность для определения МБТ из культур составила 100%. Образец мокроты, давший рост на ВАСТЕС MGIT960 и не определенный до вида с использованием ПЦР-РВ(и), был идентифицирован из полученной культуры тест-системой GenoTypeCM/AS (Hain Lifescience, Германия) как *M.malmoense*, определение которого не было предусмотрено дизайном разработанной тест-системы. Включение в дизайн тест-системы контрольной пробирки, позволило выявить наличие НТМБ в этом образце. Следует отметить, что из 343 образцов мокроты, положительных на КУМ по результатам люминесцентной микроскопии, рост на питательной среде дали 305. Т.о., для 38 образцов мокроты, содержащих КУМ, удалось дифференцировать НТМБ от МБТК и определить вид НТМБ только с использованием тест-системы ПЦР РВ(и). Результаты идентификации для этих образцов считали валидными, т.к. ранее в образцах от этих же пациентов выявляли НТМБ с той же видовой принадлежностью.

ВЫВОДЫ

1. Найдены новые, не использовавшиеся ранее для выявления группы НТМБ генетические мишени, дифференцирующие НТМБ от МБТК и родственных кислотоустойчивых бактерий, лежащие в генах *meth* (4263878 – 4263784 нуклеотиды на референсном геноме *M. smegmatis* NC_008596.1) и *tuf* (785442 – 785495 референсный геном *M. tuberculosis* H37Rv NC_000962.3).
2. Разработанная тест-система ПЦР-РВ(д) на основе мультиплексной ПЦР-РВ для одновременной дифференциации НТМБ и МБТК характеризуется 100% чувствительностью и специфичностью при выявлении ДНК из культур микобактерий.
3. Показано, что тест-система ПЦР-РВ(д) обладает 74,2% чувствительностью для ДНК НТМБ и 93,5% чувствительностью для ДНК МБТК, выделенной из диагностического материала при 100% специфичности и прогностической ценности положительного результата 100%.
4. На модельных диагностических образцах, содержащих различное число КОЕ *M. tuberculosis* H37Rv и *M. avium*, показано что предел обнаружение LoD-балл 95% (LoD95%) тест-для системы ПЦР-РВ(д) для *M.avium* составляет 1200 КОЕ/мл, для *M. tuberculosis* H37Rv - 16 КОЕ/мл.
5. Найдены не использованные ранее ДНК-мишени, позволяющие идентифицировать 12 видов НТМБ, лежащие в локусах, соответствующих 101820-102392 нуклеотидам на референсном геноме *M. abscessus* NZ_FVOX01000008.1 и 29992-30393 нуклеотидам на референсном геноме *M. avium* NZ_LMVV01000015.
6. Разработанная тест-система ПЦР-РВ(и) позволяет одновременно идентифицировать *M. avium*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. lentiflavum*, *M. mucogenicum*, *M. peregrinum*, *M. smegmatis*, *M. xenopi*.

7. Чувствительность тест-системы ПЦР-РВ(и) для идентификации 12 видов НТМБ в образцах ДНК, выделенных из культур, составила 99,67% при специфичности 100%, специфичность видовой идентификации НТМБ с помощью ПЦР-РВ(и) в образцах диагностического материала составила 100%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В целях повышения эффективности выявления микобактериоза рекомендуется использовать разработанную тест-систему ПЦР-РВ(д) для одновременного выявления и дифференциации НТМБ от МБТК в диагностических лабораториях при лечебных учреждениях соответствующего профиля.
2. В целях повышения эффективности лечения микобактериоза рекомендуется использовать разработанную тест-систему ПЦР-РВ(и) для видовой идентификации *M. avium*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. lentiflavum*, *M. mucogenicum*, *M. peregrinum*, *M. smegmatis*, *M. xenopi* в диагностических лабораториях при лечебных учреждениях соответствующего профиля.
3. Рекомендуется использовать генетические локусы, отобранные в результате разработки тест-системы ПЦР-РВ(и), для расширения панели выявляемых видов нетуберкулёзных микобактерий.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

1. Дальнейшее проведение клинических испытаний разработанной тест-системы ПЦР-РВ(д) для одновременной дифференциации НТМБ и МБТК с целью последующей регистрации медицинского изделия для диагностики *in vitro*.
2. Расширение панели видов НТМБ, выявляемых разработанной тест-системой ПЦР-РВ(и), для видовой идентификации.
3. Дальнейшее проведение клинических испытаний разработанной тест-системы ПЦР-РВ(и) для видовой идентификации НТМБ и регистрации медицинского изделия для диагностики *in vitro*.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Устинова, В. В.** Разработка ПЦР тест-системы для ускоренной дифференциации нетуберкулёзных микобактерий и микобактерий туберкулёзного комплекса / В.В. Устинова // Сборник трудов Российской научно-практической конференции молодых ученых с международным участием, посвященной всемирному дню борьбы с туберкулезом. – Москва, 2016. – С. 108-110.
2. **Устинова, В. В.** Выявление и дифференциация нетуберкулёзных микобактерий и микобактерий туберкулёзного комплекса методом ПЦР в режиме реального времени / В. В. Устинова, Т. Г. Смирнова, Д. А. Варламов, И. Ю. Андриевская, Е. Е. Ларионова, Л. Н. Черноусова // *Туберкулёз и болезни лёгких*. - 2016. – Т. 94, № 9. – С. 80-94.
3. Черноусова, Л. Н. Двухэтапная дифференциация микобактерий туберкулёзного комплекса и нетуберкулёзных микобактерий / Т.Г. Смирнова, С.Н. Андреевская, И.Ю. Андриевская, **В. В. Устинова**, Е. Е. Ларионова, А.Э. Эргешов // Инфекционные болезни (Материалы IX Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием, 27-29 марта 2017 года, Москва). – 2017. – Том 15, Приложение №1. – С. 309.

4. Ergeshov, A. Express detection and differentiation of *M. tuberculosis* and nontuberculous mycobacteria in samples / A. Ergeshov, T. Smirnova, **V. Ustinova**, I. Andrievskaya, S. Andreevskaya, E. Larionova, L. Chernousova // Materials of ERS International Congress, 9 – 13 September 2017, Milan. – 2017. - p. 3501.
5. Смирнова, Т. Г. Мониторинг видового разнообразия нетуберкулезных микобактерий в ряде областей РФ с использованием ДНК-стрипов GenoType Mycobacterium CM/AS (Hain Lifescience, Германия) / Т. Г. Смирнова, С. Н. Андреевская, Е. Е. Ларионова, И. Ю. Андреевская, В. В. Устинова, Л. Н. Черноусова // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2017. – Т. 95, №5. – С. 54-59.
6. **Ustinova, V.** Prevalence and diversity of nontuberculous mycobacteria in different regions of the Russian Federation / **V. Ustinova**, T. Smirnova, E. Larionova, I. Andrievskaya, E. Kiseleva, S. Andreevskaya, L. Chernousova // Russian Journal of Infection and Immunity (Proceedings of International conference, dedicated to the 110th anniversary of St. Petersburg Pasteur Institute and to the 95th anniversary of naming the Institute after Pasteur. Molecular bases of epidemiology, diagnostics, prevention and treatment of infectious diseases). – 2018. - Vol. 8, №4. - P.583.
7. **Устинова, В. В.** Разработка тест-системы на основе технологии ПЦР в режиме реального времени для видовой идентификации НТМБ / В. В. Устинова // Вестник Центрального научно-исследовательского института туберкулеза. – 2019. - № 1. - С. 78.
8. **Ustinova, V. V.** New assay to diagnose and differentiate between *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria / **V. V. Ustinova**, T. G. Smirnova, D. G. Sochivko, D. A. Varlamov, E. E. Larionova, S. N. Andreevskaya, I. Y. Andrievskaya, E. A. Kiseleva, L. N. Chernousova, A. Ergeshov // Tuberculosis (Edinb). – 2019. – Vol. 114. – P. 17-23.
9. **Smirnova, T.** Evaluation of a new assay for nontuberculous mycobacteria species identification in diagnostic material and cultures / T. Smirnova, V. Ustinova, S. Andreevskaya, E. Larionova, E. Kiseleva, L. Chernousova, D. Varlamov, D. Sochivko, A. Ergeshov // Tuberculosis (Edinb). – 2021. – Vol.130: 102124.
10. Смирнова, Т. Г. Дискриминирующая способность метода мультиплексной ПЦР при выявлении микобактериальной коинфекции / Т. Г. Смирнова, С. Н. Андреевская, В. В. Устинова, Е. Е. Ларионова, Е. А. Киселева, Л. Н. Черноусова, А. Эргешов // Bulletin of Russian State Medical University / Вестник Российского Государственного Медицинского Университета. - 2024. - №4. - С. 40–45.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГЭ	геном-эквиваленты
дцДНК	двухцепочечная ДНК
МБ	микобактерии
МБТК	микобактерии туберкулёзного комплекса
НТМБ	нетуберкулёзные микобактерии
ПЦР	полимеразная цепная реакция
РС	реакционная смесь
СПЗ	смесь праймеров и зондов
Су5	Индодикарбоцианин
ФАМ	Карбоксифлуоресцеин
РОХ	Карбокси-Х-родамин
R6G	6-Карбоксиродамин

