

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»

На правах рукописи

Устинова Вера Витальевна

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

1.5.11. - микробиология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат медицинских наук
Смирнова Татьяна Геннадьевна

Москва – 2024

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
Актуальность темы исследования	6
Степень разработанности темы исследования	8
Цель исследования	11
Задачи исследования	11
Научная новизна исследования	12
Теоретическая и практическая значимость работы	13
Методология и методы исследования	14
Материалы исследования	15
Объект исследования, материал, пробоподготовка образцов	15
Штаммы микроорганизмов, использованные для разработки тест-системы для выявления и дифференциации МБТ и НТМБ	15
Штаммы микроорганизмов, использованные для разработки тест-системы для видовой идентификации НТМБ	17
Образцы клинического материала от больных, использованные в исследовании, и их предобработка	17
Методы исследования	18
Микробиологические методы исследования	18
Молекулярно-генетические методы исследования	19
Отбор культур и клинического материала от больных	21
Программное обеспечение и базы данных	23
Расчет содержания геном-эквивалентов в образцах ДНК	24
Методы статистической обработки результатов	24
Личное участие автора в получении результатов	25
Основные положения диссертации, выносимые на защиту	26
Степень достоверности и апробация результатов	26
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	28
1.1 Микобактерии	28

1.2 Возбудитель туберкулёза	29
1.3 Возбудители микобактериоза	33
1.4 Лабораторная диагностика туберкулёза и микобактериоза	41
1.4.1 Микробиологические методы выявления и идентификации микобактерий и определения их лекарственной чувствительности	42
1.4.2 Ускоренные методы выявления и идентификации микобактерий	51
РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ..	74
ГЛАВА 2. Разработка тест-системы ПЦР-РВ(д) на основе ПЦР-РВ для одновременного выявления ДНК МБТК и НТМБ в одном образце диагностического материала/культуры	74
2.1 Разработка праймеров и Taq-Map зондов для выявления НТМБ и их дифференциации от МБТК.....	74
2.2 Оценка чувствительности и специфичности тест-системы ПЦР-РВ(д) для одновременного выявления ДНК МБТК и НТМБ на ДНК, выделенной из культур микроорганизмов.....	82
2.3 Оценка чувствительности и специфичности тест-системы ПЦР-РВ(д) для одновременного выявления ДНК МБТК и НТМБ на ДНК, выделенной из образцов клинического материала	84
2.4 Оценка 95% предела обнаружения (LoD95%) ДНК микобактерий в пробе клинического материала.....	90
2.6 Оценка внутритестовой сходимости и межпостановочной воспроизводимости результатов выявления микобактерий для тест-системы ПЦР-РВ(д)	91
ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ПЦР-РВ(И) НА ОСНОВЕ ПЦР-РВ ДЛЯ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ НТМБ В ОБРАЗЦАХ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА/КУЛЬТУР ОТ БОЛЬНЫХ	93
3.1 Отбор видов НТМБ для разработки тест-системы ПЦР-РВ(и) для видовой идентификации НТМБ в образцах диагностического материала/культур от больных	93

3.2 Разработка праймеров и Taq-Map зондов и дизайна тест-системы ПЦР-РВ(и) для видовой идентификации НТМБ	95
3.3 Оценка аналитической чувствительности и специфичности тест-системы ПЦР-РВ(и) для видовой идентификации НТМБ в образцах культур	105
3.4 Оценка эффективности ПЦР для видов НТМБ, идентифицируемых разработанной тест-системой ПЦР-РВ(и)	108
3.5 Оценка чувствительности и специфичности тест-системы ПЦР-РВ(и) для видовой идентификации НТМБ в образцах клинического материала и образцах культур, полученных из этого клинического материала	109
3.6 Оценка внутритестовой сходимости и межпостановочной воспроизводимости результатов идентификации НТМБ для тест-системы ПЦР-РВ(и)	112
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	114
ВЫВОДЫ	124
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	126
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	127
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	128
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	130
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	173
Приложение №1.....	173
Приложение №2.....	175
Приложение №3.....	177
Приложение №4.....	181
Приложение №5.....	185
Приложение №6.....	197
Приложение №7.....	198

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Изучение нетуберкулезных микобактерий началось вскоре после открытия Р. Кохом в 1882 году туберкулезной палочки [181], однако, их клиническое значение первое время недооценивалось. НТМБ считали не патогенными для человека до второй половины XX века, когда стали появляться первые упоминания о единичных случаях микобактериоза - заболевания, вызываемого этими микроорганизмами [37].

Нетуберкулезные микобактерии составляют самую многочисленную по видовому разнообразию группу микобактерий, которая насчитывает в настоящее время более 200 видов [118]. Большая их часть сапрофиты, однако, более 50 из них патогенны для человека и могут служить этиологическим фактором заболеваний различной степени тяжести [39, 155, 156, 210, 255].

Изучение нетуберкулезных микобактерий в России активно велось в 50-70е годы XX века целым рядом исследователей [16, 27, 28], однако, в течение нескольких последующих десятилетий интерес к заболеваниям, вызванным нетуберкулезными микобактериями, был потерян, и исследования в этой области продолжались лишь в некоторых регионах России, главным образом – в Санкт-Петербурге Т.Ф. Оттен [11, 36, 37, 38].

Проблема микобактериоза человека впервые встала остро и привлекла внимание врачей и учёных в начале эпидемии СПИДа – стало очевидно повсеместное распространение нетуберкулезных микобактерий, т.к. среди пациентов со СПИД было зарегистрировано большое количество смертельных исходов от диссеминированной инфекции, вызванной микобактериями, принадлежащими к комплексу *Mycobacterium avium* (MAC) [118, 155, 163, 267]. Начиная с 90х годов XX века значительный рост заболеваемости микобактериозом отмечают во всём мире [25, 37, 208, 210, 252, 261, 286]. С ним связан интерес к диагностике заболеваний, вызываемых нетуберкулезными микобактериями в США [65, 208, 280], Канаде [66, 208], Франции [77], Швейцарии [121], Таиланде [102], Японии [225, 230], Корее [179, 189].

Согласно результатам ряда ретроспективных исследований, для 90% регионов Канады, США, Великобритании, Чехии, Швеции, Дании, Японии, Греции показана корреляция снижения заболеваемости туберкулезом со значительным ростом заболеваемости микобактериозом. В экономически неблагополучных странах также отмечают рост числа случаев микобактериоза, актуальна эта проблема и для России [18, 25, 29, 60].

Также увеличению частоты регистрации случаев микобактериоза способствовало совершенствование методов лабораторной диагностики [131, 302], в частности, внедрение культивирования в автоматизированных системах ВАСТЕС MGIT, подразумевающее обязательную идентификацию выросших культур; метода высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [91]; масс-спектрометрического анализа рибосомальных белков [274], молекулярно-генетических методов [96, 136, 317].

Благодаря схожести клинико-рентгенологической картины заболеваний [118, 147] больных микобактериозом с лёгочной локализацией, как правило, направляют на диагностику в противотуберкулезные учреждения с подозрением на туберкулёз. Имеют место случаи постановки ложного диагноза туберкулёз больным микобактериозом, особенно в странах, для которых туберкулёз является эндемичным заболеванием [147], что недопустимо, т.к. нетуберкулезные микобактерии обладают резистентностью к большинству противотуберкулёзных препаратов (ПТП), и заболевания, вызываемые ими, требуют других схем лечения [147, 160]. Поэтому важно иметь инструмент для быстрой дифференциации нетуберкулезных микобактерий от микобактерий туберкулезного комплекса. Помимо этого, схемы лечения для заболеваний, вызванных разными видами нетуберкулезных микобактерий также отличаются [85, 297, 249, 271], что обуславливает востребованность быстрых и точных методов их идентификации до вида в бактериологических лабораториях.

На данный момент наиболее быстрыми методами, позволяющими выявлять и дифференцировать нетуберкулезные микобактерии от *M.tuberculosis* complex (МБТК), а также идентифицировать микобактерии до вида с

максимальными специфичностью и чувствительностью являются молекулярно-генетические. Однако, единственная зарегистрированная и производящаяся в России молекулярно-генетическая тест-система для детекции нетуберкулезных микобактерий и их дифференциации от микобактерий туберкулезного комплекса, не позволяет выявлять смешанные штаммы нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса [40]. Тест-системы для видовой идентификации нетуберкулезных микобактерий в РФ не производят.

Зарубежные тест-системы для дифференциации нетуберкулезных микобактерий от микобактерий туберкулезного комплекса и идентификации нетуберкулезных микобактерий до вида ранее были представлены на отечественном рынке тест-системами Genotype Mycobacterium CM/AS немецкой компании Hain Lifescience, основанными на технологии Line Probe Assay (LPA) [18, 190]. Определение вида нетуберкулезных микобактерий с использованием этой технологии – трудоёмкий многоэтапный процесс, требующий около 4х часов работы оператора при минимальном общем времени анализа 5 часов. Описываемая технология имеет ограничения для работы с клиническим материалом от больных [140], а цена одного теста очень высока для отечественных лабораторий, кроме того, к настоящему времени компания Hain Lifescience ушла с российского рынка. Таким образом, разработка отечественных молекулярно-генетических методов выявления и видовой идентификации нетуберкулезных микобактерий экономически целесообразна и актуальна для противотуберкулёзной лабораторной службы РФ.

Степень разработанности темы исследования

В последние 20 лет молекулярно-генетическая диагностика микобактериоза бурно развивается во всем мире. Первые методы выявления и идентификации до вида нетуберкулезных микобактерий, распространенных среди больных ВИЧ, были основаны на ПЦР видоспецифичных фрагментов гена, кодирующего 16S рРНК, с последующей гибридизацией амплифицирующегося со встраиванием диоксигенина специфического фрагмента с биотинилированными видоспецифичными зондами и гибридизацией этих комплексов со

стрептавидиновой плашкой [120] или кросс-блоттом продуктов амплификации на мембранах, несущих видоспецифичные зонды [185]. Принцип обратной гибридизации также использовали для разработки стеклянных микрочипов высокой плотности [136] и гидрогелевых чипов низкой плотности [324] с переменным фрагментом гена *groV* в качестве мишени. Перечисленные методы требуют большого количества ручных манипуляций, времязатратны, не обеспечивают возможность работы с образцами, выделенными из клинического материала, и недоступны на территории РФ в качестве готового продукта. Большой популярностью пользовались разработанные для внутрилабораторного использования – “домашние” - тест-системы, основанные на полиморфизме длин рестриктных фрагментов (ПДРФ) генов 16S рРНК, *groV*, *hsp65* и др. [96, 157, 273, 299] их по-прежнему используют в развивающихся странах [237]. Для идентификации нетуберкулезных микобактерий также применяют метод высокоэффективной жидкостной хроматографии [30, 91, 268], однако, этот подход подразумевает большие затраты времени (полное время анализа не менее 24 часов) и закупку дорогостоящего оборудования и расходников к нему. В ряде лабораторий для определения вида микобактерий используют метод времяпролётной массспектрометрии (MALDI-TOF MS) [98, 274]. Следует отметить, что пробоподготовка образцов в случае микобактерий осложняется ввиду особенностей строения их клеточной стенки, а специализированные базы данных спектров, необходимые для идентификации, содержат информацию об ограниченном спектре видов. Достоверность идентификации нетуберкулезных микобактерий этим методом высока, однако, его использование предполагает закупку дорогостоящего и крупногабаритного оборудования, которую могут себе позволить лишь немногие учреждения.

Успешную коммерческую реализацию получили технологии, основанные на обратной гибридизации ПЦР-продуктов с видоспецифичными олигонуклеотидными зондами, нанесенными на твёрдый носитель – ДНК-стрипы - INNO-LiPA-Mycobacteria (Innogenetics, Ghent, Бельгия) и GenoType Mycobacterium (Hain Lifescience, Nehren, Germany) [193, 240]. На территории РФ

для видовой идентификации нетуберкулезных микобактерий были зарегистрированы только тест-системы Genotype Mycobacterium компании HainLifescience (Германия). Главными ограничениями для их использования в лабораторной практике являются длительность и трудоёмкость анализа (минимальное время анализа без выделения ДНК 5 часов) и высокая стоимость одного теста.

Наиболее перспективным направлением в области развития молекулярно-генетических методов выявления и идентификации нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса в последние 10 лет является разработка тест-систем, основанных на технологии ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ), т.к. эта технология позволяет получить результат в наиболее сжатые сроки (время анализа без выделения ДНК 1,5 – 2,5 часа) и позволяет добиться высокой чувствительности и специфичности [61, 99, 174, 180, 247, 261, 270]. Выявление микобактерий туберкулезного комплекса с помощью ПЦР-РВ проводят, начиная с 2000х [130, 219], в настоящее время доступен целый ряд коммерческих тест-систем, как импортных, так и отечественных производителей, при этом разработка новых ПЦР-РВ тест-систем для выявления микобактерий туберкулезного комплекса с целью повышения чувствительности и специфичности анализа не прекращается [254]. Ряд существующих ПЦР-РВ тест-систем для выявления и видовой идентификации нетуберкулезных микобактерий имеет ограничение по количеству выявляемых видов [270] и возможности выявления ко-инфекции нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса [61, 247, 261], либо обеспечивает возможность работы только с ДНК, выделенной из культур микобактерий [256]. ПЦР-РВ тест-системы для одновременного выявления в одной пробе нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса представлены единственной отечественной тест-системой, информация о характеристиках которой не представлена нигде кроме инструкции производителя [40]. Эта система не позволяет выявлять наличие в образце смешанных штаммов нетуберкулезных

микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса. Тест-системы, сонованные на технологии ПЦР-РВ для видовой идентификации нетуберкулезных микобактерий не представлены на российском рынке ни отечественными, ни зарубежными производителями.

Цель исследования

Разработка тест-систем, основанных на технологии ПЦР в режиме реального времени, для быстрого одновременного дифференциального выявления нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулёзного 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 НТМБ на образцах культур/диагностического материала от больных

Научная новизна исследования

Выявлены новые, не использовавшиеся ранее для детекции группы нетуберкулезных микобактерий 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. mageritensis*, *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 нетуберкулезных микобактерий/микобактерий туберкулезного комплекса в образцах клинического материала и культур от больных с использованием разработанной тест-системы для одновременного выявления нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса обеспечивает возможность применения правильного алгоритма определения лекарственной чувствительности и, как следствие, назначения больным с ко-инфекцией корректного 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-растущей и быстро-растущей нетуберкулезной микобактерии, т.к. обнаружение такой ко-

инфекции культуральным методом затруднено тем, что быстрорастущие микобактерии вырастают быстрее. Отсутствию информации о присутствии второго штамма в полученной культуре, может привести к неправильному определению лекарственной чувствительности и, как следствие, назначению больному некорректного 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 данной 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

Объект исследования, материал, пробоподготовка образцов

Объект настоящего исследования – МБТ, НТМБ, их культуры, ДНК МБТ и НТМБ, выделенная как из культур, так и из клинического материала от больных с подозрением на туберкулез и микобактериоз лёгких.

Биоматериал получен при участии сотрудников ФГБНУ «ЦНИИТ»: врача консультативного отделения, к.м.н. Гордеевой Ольги Михайловны; врача первого терапевтического отделения, к.м.н. Поляковой Анжелы Сергеевны; заведующей второго терапевтического отделения, д.м.н. Макарьянц Натальи Николаевны; врача третьего терапевтического отделения, к.м.н., Черных Натальи Александровны; заведующей четвертого терапевтического отделения, к.м.н. Зайцевой Анны Сергеевны.

Штаммы микроорганизмов, использованные для разработки тест-системы для выявления и дифференциации МБТ и НТМБ

Для выполнения работы были использованы коллекционные и клинические штаммы МБТК и НТМБ, а также штаммы микроорганизмов, не относящихся к микобактериям. Коллекционные штаммы микобактерий были выделены сотрудниками отдела микробиологии ФГБНУ «ЦНИИТ» от больных с подозрением на туберкулез, микобактериоз и осложнением после вакцинации BCG. Их видовая принадлежность была определена тремя методами параллельно: с использованием коммерческих наборов GenoTypeCM и GenoTypeAS (Hain Lifescience, Германия), секвенированием переменных участков гена 16S rRNA и методом времяпролётной масс-спектрометрии (MALDI-TOF MS). Видовую принадлежность микроорганизмов, не относящихся к роду *Mycobacterium*, была определена с помощью системы идентификации микроорганизмов BBL™ Crystal™

Identification Systems (Becton Dickinson, США).

Список коллекционных штаммов, использованных в работе, представлен в таблице 1.

Таблица 1 - Коллекционные штаммы НТМБ, МБТК и микроорганизмов, не относящихся к микобактериям, использованные в работе

Штаммы НТМБ		Штаммы МБТК		Штаммы бактерий, не относящихся к роду <i>Mycobacterium</i>	
№	Вид микроорганизма, название штамма	№	Вид микроорганизма, название штамма	№	Вид микроорганизма
1	<i>M. avium</i> , CTRI-NTM-3	1	<i>M. bovis</i> Bovinus An-1, CTRI-40	1	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>
2	<i>M. abscessus</i> , 15-0131	2	<i>M. bovis</i> Bovinus An-2, CTRI-41	2	<i>Bukholderia cenocepacia</i>
3	<i>M. chelonae</i> , CTRI-NTM-9	3	<i>M. bovis</i> Bovinus An-5, CTRI-42	3	<i>Candida ablicans</i>
4	<i>M. peregrinum</i> , CTRI-NTM-206	4	<i>M. bovis</i> Bovinus An-6, CTRI-43	4	<i>Corynebacterium sp.</i>
5	<i>M. fortuitum</i> , CTRI-NTM-318	5	<i>M. bovis</i> Vallee, CTRI-38	5	<i>Gordonia polyisoprenivorans</i>
6	<i>M. gastri</i> , CTRI-NTM-6	6	<i>M. bovis</i> Bovinus 8, M-12	6	<i>Nocardia farcinica</i>
7	<i>M. gordonae</i> , 14-8773	7	<i>M. bovis</i> BCG_1878, CTRI-45	7	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
8	<i>M. intracellulare</i> , CTRI-NTM-29	8	<i>M. bovis</i> BCG у-361, GISK	8	<i>Moraxella catarrhalis</i>
9	<i>M. interjectum</i> , CTRI-NTM-143	9	<i>M. bovis</i> BCG у-367, GISK	9	<i>Proteus vulgaris</i>
10	<i>M. kansasii</i> , CTRI-NTM-7	10	<i>M. bovis</i> BCG у-368, GISK	10	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
11	<i>M. malmoense</i> , CTRI-NTM-256	11	<i>M. bovis</i> BCG GFP	11	<i>Rhodococcus bronchialis</i>
12	<i>M. mucogenicum</i> , CTRI-NTM-378	12	<i>M. tuberculosis</i> W186, R-101	12	<i>Staphylococcus aureus</i>
13	<i>M. nonchromogenicum</i> , CTRI-NTM-65	13	<i>M. tuberculosis</i> AI73, R-485	13	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
14	<i>M. scrofulaceum</i> , CTRI-NTM-203	14	<i>M. tuberculosis</i> W221, R-477	14	
15	<i>M. smegmatis</i> , 14-0313	15	<i>M. tuberculosis</i> AI60, R-434	15	
16	<i>M. simiae</i> , CTRI-NTM-155	16	<i>M. tuberculosis</i> BJ27, R-487	16	
17	<i>M. szulgai</i> , CTRI-NTM-164	17		17	
18	<i>M. xenopi</i> , CTRI-NTM-14	18		18	

Для оценки аналитической чувствительности разрабатываемой тест-системы для выявления и дифференциации МБТ и НТМБ были использованы 500 штаммов *M.tuberculosis*, полученные из респираторного материала от больных туберкулёзом лёгких, и 301 штамм нетуберкулезных микобактерий из респираторного материала от больных с подозрением на туберкулёз и микобактериоз лёгких, проходящих диагностику и лечение в ФГБНУ «ЦНИИТ».

Штаммы микроорганизмов, использованные для разработки тест-системы для видовой идентификации НТМБ

Для разработки тест-системы для видовой идентификации НТМБ было проанализировано 822 штамма НТМБ, полученных от больных с подозрением на туберкулёз и микобактериоз лёгких, проходивших диагностику в ФГБНУ «ЦНИИТ» и лабораториях 17 региональных центров РФ.

Для каждого взятого в исследование вида НТМБ было отобрано максимальное количество штаммов от разных больных для изучения внутривидовой вариабельности отобранных для дизайна тест-системы локусов. В выборку включали больных, диагностическая картина заболевания которых соответствовала критериям микобактериоза Американского торакального общества: «наличие затемнения лёгочного поля, причину которого не удалось установить при тщательном клиническом и лабораторном исследовании в сочетании с неоднократным выделением большого числа микобактерий одного и того же вида, из мокроты, однократном выделении из бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ) или бронхоальвеолярного смыва» [150].

Образцы клинического материала от больных, использованные в исследовании, и их предобработка

Для оценки клинической чувствительности и специфичности разрабатываемой тест-системы для выявления и дифференциации МБТК и НТМБ были проанализированы образцы респираторного и хирургического материала от больных, проходивших диагностику в ФГБНУ «ЦНИИТ»: 609 образцов предварительно обработанного диагностического материала от 190 пациентов с подтверждённым диагнозом микобактериоз, 3757 образцов от 1416 пациентов с

подтверждённым диагнозом туберкулёз лёгких и 380 образцов от 267 пациентов с другими заболеваниями лёгких: пневмонией, бронхоэктатической болезнью (БЭБ) и хронической обструктивной болезнью лёгких (ХОБЛ) (Таблица 2).

Таблица 2 – 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 заболевания лёгких	БЭБ	106	2	108	77
	ХОБЛ	91	1	92	65
	пневмония	179	1	180	125
Общий объём исследования		4306	378	4684	1887

Методы исследования

Микробиологические методы исследования

Выделение культур микобактерий и их идентификация микробиологическими методами

Культуры микобактерий получали из респираторного материала от больных, проходящих диагностику и лечение в ФГБНУ «ЦНИИТ» на плотной яичной питательной среде Левенштейна-Йенсена (Л-Й) и в модифицированной жидкой питательной среде Middlebrook 7H9 в автоматизированной системе учёта роста микобактерий BACTEC MGIT 960. Респираторный материал подвергали предварительной обработке по стандартному протоколу Becton Dickinson с раствором NALC-NaOH. Первичную идентификацию культур, выделенных на плотной питательной среде Л-Й, проводили в соответствии с приказом МЗ РФ № 951 от 29 декабря 2014г. «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулёза органов дыхания». Первичную идентификацию культур, выделенных в жидкой модифицированной среде Middlebrook 7H9, подвергали первичной идентификации согласно протоколу Becton Dickinson с использованием следующих тестов:

- посев на кровяной агар, как тест на наличие в культуре неспецифической

флоры;

- иммунохроматографический тест на наличие специфичного для МБТК антигена MPT64 (MPT64TB Ag Kit, Standard Diagnostics, Корея);
- приготовление мазка с окрашиванием на КУМ по Цилю-Нильсену и последующей микроскопией - в случае получения отрицательного результата иммунохроматографического теста.

В дальнейший анализ включали культуры, идентифицированные, как МБТК, по результатам иммунохроматографического теста на наличие антигена MPT64, и культуры микроорганизмов, отрицательные на наличие антигена MPT64, содержащие при этом КУМ по результатам микроскопии с окраской по Цилю-Нильсену.

Видовая идентификация микроорганизмов, не относящихся к роду *Mycobacterium*

Микроорганизмы, не относящиеся к роду *Mycobacterium*, идентифицировали до вида с использованием системы BBL™ Crystal™ Identification Systems (Becton Dickinson, США) согласно протоколу производителя.

Молекулярно-генетические методы исследования

Выделение ДНК

Перед выделением ДНК из деконтаминированных осадков NALC-NaOH, культур микобактерий, полученных в жидкой среде Middlebrook 7H9 и на плотной яичной питательной среде Л-Й, а также из культур микроорганизмов, не относящихся к роду *Mycobacterium*, предоставленных на кровяном агаре, проводили инактивацию образцов реагентом «Амплитуб-Преп» (НПФ Синтол, Москва) по протоколу производителя. Выделение ДНК проводили на роботизированной раскапывающей станции Freedom Evo 150 (Tescan, Швейцария) с использованием набора для автоматизированного выделения ДНК микобактерий на магнитном сорбенте «М-Сорб-Туб Автомат» (НПФ Синтол, Москва) согласно протоколу производителя.

Измерение концентрации ДНК в образцах, выделенных для экспериментов по оценке активности праймеров и эффективности реакций

Концентрацию ДНК определяли с помощью набора для измерения концентрации дцДНК QuantiFluor ONE dsDNA System (Promega, США) на флуориметре Quantus (Promega, США) согласно рекомендациям производителя.

Секвенирование фрагментов генов *metH*, *tuf* и локусов, отобранных для создания тест-системы на идентификацию НТМБ

Секвенирование отобранных для разработки тест-системы на выявление и дифференциацию НТМБ и МБТК фрагментов генов НТМБ *metH* и *tuf* и локусов, отобранных для разработки тест-системы на идентификацию НТМБ, проводили с подобранных в ходе исследования праймеров с использованием программы, представленной в разделе «Собственные результаты исследования» в приборе CFX96-Touch (Biorad, США). Нарботанные для секвенирования продукты подвергали электрофорезу в 1,7% агарозном геле и очистке из него с использованием «Набора реагентов для очистки ДНК» (Омникс, Санкт-Петербург). Циклическое секвенирование по Сэнгеру проводили на базе ЦКП «Биотехнология» Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии с использованием набора ABI PRISM BigDye Terminator v.1.3 («Applied Biosystems», США) согласно инструкции производителя. Полученные фрагменты разделяли капиллярным геле-электрофорезом на генетическом анализаторе ABI Prism 3130xl («Applied Biosystems», США).

Видовая идентификация культур НТМБ и МБТК

Видовую идентификацию культур НТМБ и МБТК (в случае необходимости подтверждения *M.bovis* или *M.bovis* BCG) проводили с помощью наборов реагентов серии GenoType Mycobacterium, основанных на технологии LPA, по протоколу производителя. Выделенную из культур ДНК подвергали мультиплексной амплификации с биотилинированными праймерами, продукты амплификации гибридизовали с зондами, иммобилизованными на стрептавидиновом носителе, и проявляли реакцию. ДНК, выделенную из

культур НТМБ, анализировали с использованием набора реагентов GenoType CM (Hain Lifescience, Германия). В случае, если вида не оказывалось в панели набора, использовали набор реагентов GenoType Mycobacterium AS (Hain Lifescience, Германия). В случае, если вид не удавалось определить с использованием обоих наборов, секвенировали фрагменты генов 16S рРНК и *hsp65*. Видовую идентификацию культур МБТК проводили с помощью набора реагентов GenoType MTBC (Hain Lifescience, Германия).

ПЦР в режиме реального времени для выявления НТМБ и МБТК и видовой идентификации НТМБ

Все реакции ПЦР-РВ проводили в объёме 25мкл на приборах CFX-96 (Bio-Rad, США) и ДТ-48 («ДНК-технология», Россия). Подробные описания состава реакционных смесей и программ амплификации приведены в главах 3 и 4.

Определение количественного содержания ДНК человека в образцах диагностического материала от больных

Количественное содержание ДНК человека в образцах, выделенных из диагностического материала от больных, определяли с помощью набора реагентов «ХУ-Детект» («Синтол», Москва) согласно инструкции производителя.

Отбор культур и клинического материала от больных

Клинический материал и культуры для дальнейшего анализа с использованием разрабатываемых тест-систем и референсного метода 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.

Схема отбора образцов представлена на рисунке 1.

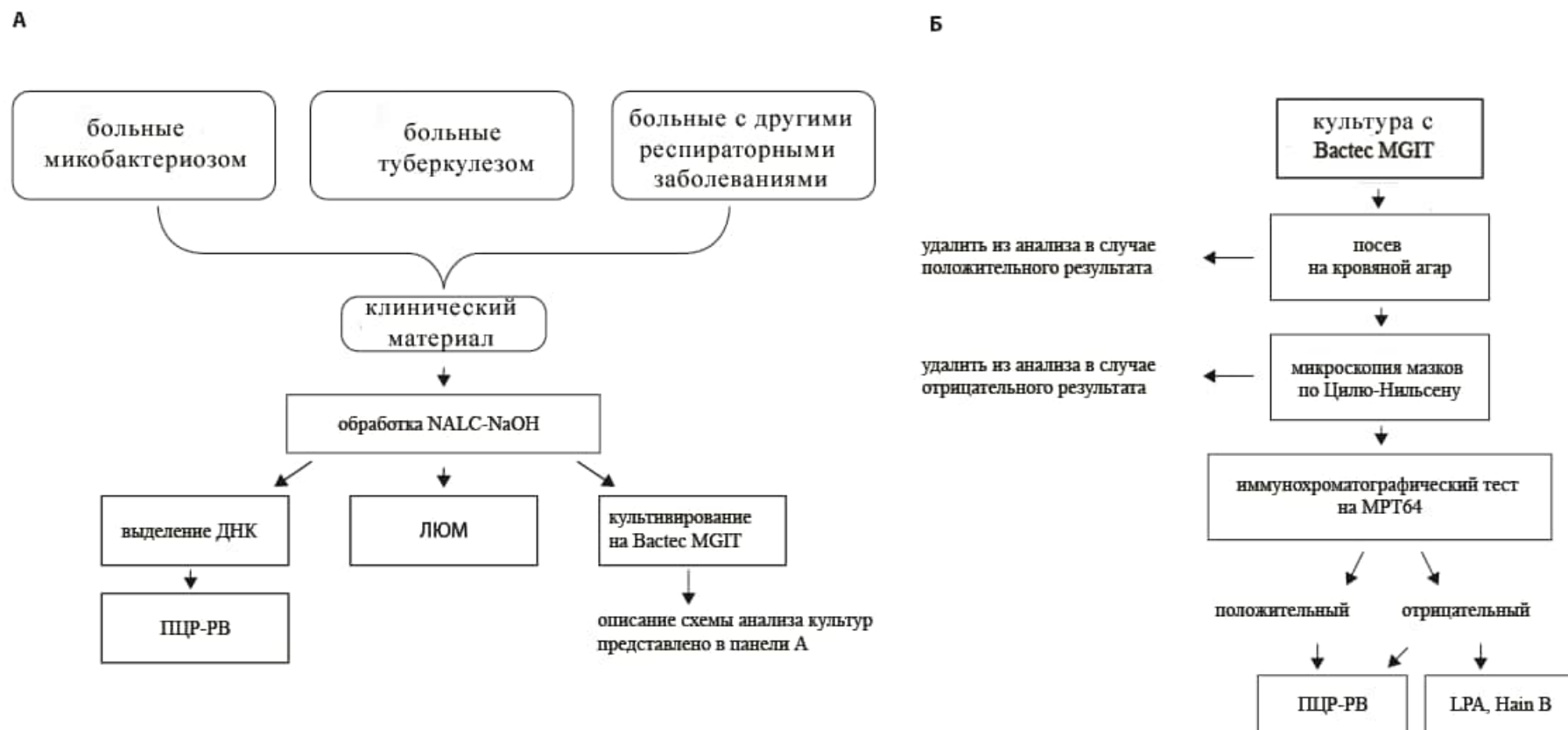


Рисунок 1 - Схема отбора клинического материала от больных (А) и образцов культур (Б)

Программное обеспечение и базы данных

Выбор локусов для разработки тест-систем на выявление и дифференциацию НТМБ и МБТК и видовую идентификацию НТМБ

Последовательности ДНК, дифференцирующие НТМБ от МБТК и других филогенетически близких микроорганизмов, выявляли путём анализа консервативных белковых последовательностей, найденных с помощью попарного сравнения геномов НТМБ, представленных в базе данных NCBI (США), с использованием ПО Artemis ([//www.webact.org/WebACT/generate](http://www.webact.org/WebACT/generate)). Гомологи отобранных белковых последовательностей анализировали с использованием алгоритма protein-protein blast (NCBI) для всех представленных на момент проведения исследования в базе данных Genome NCBI штаммов НТМБ и МБТК. Для белковых последовательностей, которые были консервативны в пределах группы НТМБ, были найдены и выравнены кодирующие их нуклеотидные последовательности и проанализированы против штаммов родственных кислотоустойчивых бактерий: представителей родов *Nocardia* и *Rhodococcus*.

Для разработки тест-системы для видовой идентификации НТМБ с использованием того же алгоритма действий были отобраны локусы, нуклеотидные последовательности которых отличаются для быстрорастущих и медленно растущих НТМБ, и при этом обладают консервативностью в пределах видов НТМБ, представленных в базе данных Genome NCBI большим количеством геномов: *M.avium* – для медленно растущих НТМБ и *M.abscessus* – для быстрорастущих. Геномы, использованные для выбора локусов, представлены в приложении 1. Выравнивание нуклеотидных последовательностей отобранных участков геномов проводили с помощью алгоритма Muscle в ПО Ugene UniPro [239]. На их основе были подобраны праймеры для секвенирования последовательностей выбранных областей геномов для дальнейшей разработки видоспецифичных праймеров и зондов.

Подбор праймеров и Taq-Man зондов

Для разработки тест-систем была выбрана технология ПЦР-РВ Taq-Man [203]. Подбор праймеров и зондов проводили с использованием ПО Primer3 [259]. Оценку специфичности отобранных олигонуклеотидов проводили с использованием алгоритма PrimerBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Возможность образования праймерами и зондами вторичных структур, оценку их конформации, силу связей и температуру плавления осуществляли с использованием интернет ресурса The DINAMelt Web Server [207]. Вероятность образования праймер-димеров оценивали с помощью ресурса Multiple Primer Analyzer (<https://www.thermofisher.com/ru/ru/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>).

Расчет содержания геном-эквивалентов в образцах ДНК

Расчет количества геном-эквивалентов в образцах ДНК для экспериментов по изучению взаимного влияния активности праймеров и зондов, специфичных к НТМБ и МБТК, и оценке эффективности реакций амплификации НТМБ проводили по формуле $N[\text{г-э}] = C[\text{г/л}] \times V[\text{л}] \times N_A \times M_w[\text{Да}] \times L[\text{Кб}] \times 10^3$, 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 (649 Да); $L[\text{Кб}]$ – длина ДНК. Использовали значения длин геномов, представленные в базе данных KEGG [172].

Методы статистической обработки результатов

Расчёт чувствительности, специфичности, прогностической ценности положительного результата (PPV – positive prognostic value) и прогностической ценности отрицательного результата (NPV – negative prognostic value) проводили по стандартным формулам [41].

Расчёт рангового коэффициента корреляции Спирмена проводили с помощью ПО Statistica 5.

Среднее значение величины порогового цикла амплификации - C_p и

стандартное отклонение порогового цикла амплификации – CO - рассчитывали автоматически с помощью ПО амплификаторов CFX96 (BioRad Laboratories, Inc, США); ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ», и АНК 32 М (ФГБУН ИАП РАН, Россия). Коэффициент вариации значений пороговых циклов амплификации - CV(%) – рассчитывали по формуле $CV = CO/\text{среднее} \times 100\%$, где CO – стандартное отклонение, среднее – среднее значение порогового цикла.

Значение предела обнаружения ДНК при вероятности обнаружения 95% (LoD95%) оценивали путём применения лог-логистической модели к данным, характеризующим вероятность обнаружения, представленным в таблице 12 в разделе «Результаты собственных исследований и их обсуждения» согласно [141].

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.б.н. Смирновой Т.Г. автор внедрил их в практическую работу отдела микробиологии ФГБНУ «ЦНИИТ».

Основные положения диссертации, 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 туберкулёз/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. mucogenicum*, *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 туберкулёза» (протокол № от 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).

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Микобактерии

Микобактерии - кислотоустойчивые неподвижные бактерии, характеризующиеся в первую очередь высоким содержанием липидов и воскоподобных веществ в клеточной стенке. Род *Mycobacterium* (от лат. грибовидные бактерии) был выделен в 1896 году К. Леманом и Р. Нойманом (К. Lehmann и R. Neumann). Согласно современной классификации он входит в состав семейства *Mycobacteriaceae* порядка *Actinomycetales*. Наиболее близкими к микобактериям организмами являются представители семейств *Corynebacteriaceae* и *Nocardiaceae*, входящие вместе с семейством *Mycobacteriaceae* в подпорядок *Corynebacterinae*. К роду *Mycobacterium* относятся облигатно-патогенные бактерии и свободноживущие сапрофитные микроорганизмы, ряд видов которых признаны условно-патогенными. Выделяют три группы микобактерий: вызывающие туберкулёз МБТК, *M. leprae*, вызывающие лепру (проказу) и нетуберкулёзные микобактерии НТМБ - самая многочисленная из групп, включающая в свой состав сапротрофные бактерии, которые могут выступать возбудителями оппортунистических инфекций и самостоятельных нозологических форм.

Микобактерии обладают высокой адаптивностью во многом ввиду уникального строения клеточной стенки. Оно было детально изучено сравнительно недавно благодаря появлению криоэлектронной микроскопии [159, 324]. На *M. bovis* BCG и *M. smegmatis* (относится к НТМБ) показано, что наружная мембрана микобактерий функционально эквивалентна клеточной стенке грамм-отрицательных бактерий и состоит из липидного бислоя, внутренняя сторона которого представлена длинными разветвленными миколовыми кислотами, а наружная – гликолипидами и воскоподобными веществами. Между внутренней и наружной мембраной микобактерий формируется периплазматическое пространство, в которое погружен пептидогликановый слой, ковалентно связанный с арабиногалактаном и липоарабиноманнаном, которые в свою очередь связаны с миколовыми кислотами. Липоарабиноманнан заякорен на

плазматической мембране, и выходит на поверхность клеточной стенки, пронизывая её. Его терминальные фрагменты определяют способность микобактерий специфически связываться с рецепторами макрофагов. Такое строение клеточной стенки обуславливает кислото-спирто-щёлоче-устойчивость микобактерий, их тинкториальные свойства, делает её непроницаемой для большинства антибиотиков [111, 122]. Липиды клеточной стенки могут составлять до 60% сухой массы микобактерий, но процентное соотношение и количество различных липидных соединений в клетках микобактерий меняется в зависимости от их возраста и физико-химических характеристик окружающей среды.

Предпочтительным источником углеводов для микобактерий является глицерин, поэтому он входит в состав всех питательных сред для их культивирования. Основные углеводы, входящие в состав клеток микобактерий - арабиноза, манноза, мальтоза [53].

В качестве источника азота микобактерии предпочитают аспарагин, его добавление в питательные среды значительно улучшает рост колоний. Скорость утилизации микобактериями нитратов, нитритов, гидроксиламинов лежит в основе биохимических тестов, применяющихся для идентификации некоторых видов [53]. Микобактерии обладают каталазной и пероксидазной активностью. Их каталаза термолабильна и неактивна при 56°C. Это свойство используется в биохимических тестах на принадлежность к группе микобактерий.

1.2 Возбудитель туберкулёза

Систематика

Возбудителями туберкулёза являются МБТК. К этой группе относятся бактерии-возбудители туберкулёза человека и животных. *M.tuberculosis* вызывает туберкулёз человека и животных. *M.africanum* также вызывает туберкулёз человека, но распространён только в центральных регионах Африки. *M.canettii*, описанный впервые у пациента-африканца [298], распространён преимущественно на территории Африканского Рога, вызываемое им заболевание соответствует по клинической картине туберкулёзу с лёгким течением, но

встречается редко, этот вид интересен тем, что считается наиболее близким к гипотетическому предку МБТК [80]. *M.bovis*, вызывает туберкулёз крупного рогатого скота и может передаваться человеку, главным образом при употреблении молока больных коров [112, 148, 228]. К *M.bovis* относится и вакцинный штамм *M.bovis* БЦЖ с ослабленной вирулентностью. *M.caprae*, считавшийся раньше подвигом *M.bovis*, также вызывает туберкулёз скота и контактирующих с ним людей, но преимущественно на территории Европы [114, 228]; *M.pinnipedii* поражает ластоногих, но известны и случаи заражения людей, работающих с морскими котиками [176]. *M.microti* вызывает туберкулёз у грызунов и не представляет медицинского интереса. Все микобактерии туберкулёзного комплекса относятся к медленнорастущим (около 1 деления в 24 часа) и дают видимый рост на плотных питательных средах через 3-4 недели культивирования. Вырастающие колонии, как правило, кремовые, беловатые, сухие. Исключением является *M.canettii*: они дают рост на плотных питательных средах на 4-5й день культивирования, колонии при этом гладкие и выпуклые [248].

Туберкулёзная инфекция

Туберкулёз – медленно развивающаяся бактериальная инфекция человека и животных, передающаяся чаще всего аспирационным путём, реже – при энтеральном проникновении микобактерий или через поврежденную слизистую оболочку и кожу. Больной выделяет МБТ с капельками мокроты при кашле. Для инфицирования и развития заболевания важны массивность инфекции, доза и длительность поступления МБТ, состояние естественной устойчивости и факторов адаптивного иммунитета организма на момент воздействия инфекции [51]. Заболевание характеризуется гранулематозным некротическим поражением лёгких (85% случаев), реже - других тканей и органов [126].

При попадании в нижние дыхательные пути и альвеолы, клетки микобактерий начинают делиться и частично фагоцитируются нейтрофилами и альвеолярными макрофагами – это один из важнейших механизмов уничтожения туберкулёзной инфекции [51]. Заражённые нейтрофилы представляют

благоприятную среду для жизни микобактерий, однако в случае взаимодействия возбудителя с TLR2-рецепторами, запускается механизм апоптоза [129, 144], который, в свою очередь, инициирует фагоцитоз нейтрофилов макрофагами с выделением противовоспалительных цитокинов, играющих важную роль в защите организма от МБТ. При неполном фагоцитозе МБТ могут продолжать жить и размножаться внутри фагосом макрофагов, что может провоцировать разрушение макрофагов, выход МБТ и их фагоцитоз другими макрофагами. Ответом макрофагов на заражение *M.tuberculosis* является запуск апоптоза, как одного из основных компонентов эффективной антимикобактериальной защиты [223, 238]. Избегая этой защиты, микобактерии способны индуцировать некроз [173]. Описанные события происходят в период активного воспаления.

Следующим этапом защиты организма от туберкулезной инфекции является формирование специфических гранулём в тканях лёгких и лимфатических узлах, ограничивающих пораженные участки от интактных [51, 49]. В некоторых случаях МБТ могут разноситься по организму с током крови и лимфы и оседать в тканях различных органов, хорошо снабжающихся кислородом, и инфекция приобретает генерализованный характер. Успех *M.tuberculosis* как патогена обусловлен высокой адаптивностью этих бактерий к меняющимся во время инфекционного процесса условиям: они способны переносить длительное отсутствие питательных веществ, гипоксию, стрессовые условия экзогенного характера, пребывание в агрессивной внутрифагосомальной среде [111].

Развитие симптомов заболевания возникает по разным оценкам у 10-15% впервые инфицированных индивидов [51, 301]. Некоторые авторы рассматривают взаимоотношения МБТ с организмом человека в случае отсутствия симптомов заболевания как симбиотические [241].

Наиболее распространённая локализация туберкулёза – органы дыхания, реже заболевание поражает другие органы и их системы: центральную нервную систему, оболочки мозга, кости и суставы, мочеполовую систему, кишечник, брюшину, брыжеечные лимфатические узлы, кожу и подкожную клетчатку, периферические лимфатические узлы, глаза [42]. Основные симптомы

туберкулеза органов дыхания - кашель с выделением мокроты, боль в грудной клетке, кровохарканье, одышка; симптомы интоксикации - повышение температуры тела, тахикардия, потливость (особенно обильное ночное потоотделение), ознобы, повышенная утомляемость, слабость, снижение или отсутствие аппетита, уменьшение массы тела, депрессия, гипоманиакальные состояния [43]. Лечение больных туберкулёзом включает химиотерапию (этиотропную противотуберкулезную терапию), хирургическое лечение, патогенетическую терапию и лечение сопутствующих заболеваний [42]. При этом для назначения режима химиотерапии необходимо охарактеризовать лекарственную чувствительность штамма МБТ, чтобы исключить туберкулёз с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) и широкой лекарственной устойчивостью (ШЛУ), схема лечений которых значительно отличается [10, 42, 43, 51, 55, 103, 117].

По данным Всемирной Организации Здравоохранения (ВОЗ) туберкулёз является одной из 10 ведущих причин смерти в мире и первым по вызываемой смертности среди инфекционных заболеваний [312, 313, 314, 315].

Эпидемиология

В развитых странах на протяжении второй половины 20го века наблюдалось снижение заболеваемости туберкулёзом, что привело к уменьшению исследований и ослаблению контроля за ситуацией, поэтому во время вспышки эпидемии СПИДа в начале 90х, противотуберкулёзные организации не были готовы к сопутствовавшему ей распространению туберкулёзной инфекции [110], туберкулез стал одной из самых часто встречающихся инфекций, сочетанных с ВИЧ [231, 267]. В России с началом кризиса 90-х также произошло резкое ухудшение эпидемической ситуации в отношении туберкулёза [31], в 2015 наступила её стабилизация, однако, в отдельно взятых регионах заболеваемость продолжает расти, в основном среди ВИЧ-инфицированных лиц [33].

Несмотря на то, что к настоящему времени ситуация стабилизировалась во многих странах, число случаев заболевания ежегодно увеличивается [311, 312, 313, 314, 315]. В 2017 году по оценкам ВОЗ туберкулёз стал причиной 1,3 млн

смертельных исходов среди ВИЧ-отрицательных больных и 30 0000 – среди ВИЧ-положительных [312], а в 2020 году в связи с пандемией COVID-19 и перебоями с оказанием помощи – 1, 5 млн, из которых 214 000 – ВИЧ-положительных [313]. Согласно докладу ВОЗ 2022 численность заболевших туберкулёзом продолжила расти и выросла в 2021 году на 4,5% по сравнению с 2020, численность умерших составила 1,6 млн человек [315].

Кроме того, как в России, так и во всём мире, острой проблемой является туберкулёз с лекарственной устойчивостью (ЛУ туберкулёз) [10,14, 117, 311, 312, 313, 314, 315]. Частота возникновения мутаций, обуславливающих резистентность к противотуберкулёзным препаратам первого ряда изониазиду и рифампицину, составляет около 1 случая на 108-109 клеток - это число совпадает со средним количеством клеток в очаге, т.о. возникновение спонтанных мутаций, обеспечивающих устойчивость к этим препаратам высоко вероятно и необходима комбинированная терапия туберкулёза [242, 277].

1.3 Возбудители микобактериоза

Систематика

К группе НТМБ относят все бактерии, не относящиеся к МБТК и *M.leprae*. Эта группа микобактерий самая многочисленная и насчитывает на настоящий момент более 200 видов [118].

Первая классификация НТМБ была предложена А. Timre и Е. Runyon в 1954 году [287]. С некоторыми изменениями она используется микробиологами и сейчас. Главные признаки, лежащие в её основе, это скорость роста колоний и способность микобактерий к образованию пигмента. По этим признакам НТМБ делят на 4 группы. К первым трём группам относят медленнорастущие микобактерии. Скорость роста на средах колоний этих НТМБ примерно соответствует скорости роста *M. tuberculosis*. Медленнорастущие НТМБ делят на три группы по способности к формированию пигмента: бактерии, принадлежащие к первой группе, образуют на свету жёлтый пигмент – их называют фотохромогенными НТМБ (например, *M.kansasii*). Ко второй группе

относятся НТМБ, способные образовывать жёлтый пигмент безотносительно воздействия света – скотохромогенные микобактерии (например, *M.gordoniae*). Третья группа медленнорастущих НТМБ не образует пигмент – это нефотохромогенные микобактерии (например, *M.avium*). Четвёртая группа – быстрораствующие НТМБ, дающие видимый рост на плотных питательных средах в среднем в течение недели (например, *M.abscessus*).

Инфекции, вызываемые нетуберкулёзными микобактериями, патогенез

Большинство НТМБ – сапрофиты, распространенные в основном в почве и воде, однако, более 50 из них патогенны для человека и могут служить этиологическим фактором заболеваний различной степени тяжести, поражая желудочно-кишечный тракт [221], мочеполовые пути [171, 250, 308], кожу и мягкие ткани [135, 290, 302, 308], дыхательную систему [59, 69, 118, 212, 226, 285, 290, 304] и вызывая диссеминированные инфекции. Источниками заражения НТМБ для человека и животных могут служить вдыхаемые аэрозоли, образующиеся над почвой или водой, вода естественных и искусственных водоёмов и резервуаров, питьевая вода [131, 132, 156, 289].

Распространённые в воде (в том числе и питьевой) представители быстрораствующих микобактерий *M. abscessus*, *M.chelonae* и *M.fortuitum* являются оппортунистическими патогенами и могут быть возбудителями заболеваний лёгких, кожных и нозокомиальных инфекций [131]. В литературе описан ряд случаев, когда кожные инфекции у больных были вызваны микобактериями *M.kansasii*, *M.chelonae*, *M.abscessus*, *M.xenopi*, местообитанием которых служили вода бассейнов, джакузи, аквариумов, водопроводная вода [37, 184, 199, 294, 311]. Увеличивается количество зафиксированных случаев заражения микобактериозом лёгких при контакте с аэрозолями и водой из леек душа, на внутренних поверхностях которых микобактерии формируют биоплёнки [132, 139, 285]. Описаны случаи инъекционного заражения быстрораствующими НТМБ во время косметических процедур: татуажа, липосакции, мезотерапии [73]. В последние несколько лет описано заражение *M.chimaera* жидкостей в системах подогрева растворов для

массивной инфузии производства компании LivaNova (London, UK). Были зарегистрированы случаи инфицирования пациентов из Швейцарии, Германии, Голландии, Великобритании, США и Австралии во время хирургических операций на сердце [101, 292, 295].

Ряд видов НТМБ являются возбудителями заболеваний животных. Представители *M. avium paratuberculosis* (МАР) вызывают болезнь Йоне у жвачных (коров, коз, овец и домашних оленей) и кроликов, наносящую большой урон сельскому хозяйству [32, 58, 133]. Это хроническая инфекция, протекающая в большинстве случаев латентно, поражающая кишечник и мезентериальные лимфатические узлы, характеризующаяся прогрессирующим истощением, сопровождающимся периодической диареей, потерей продуктивности и оканчивающееся летальным исходом при отсутствии лечения. Наиболее вероятный путь передачи МАР среди животных алиментарный - через навоз, молозиво, молоко [127]. Передача инфекции от животных человеку может также происходить алиментарным путём через воду и при употреблении в пищу мяса и молока зараженных особей, заболевание развивается преимущественно у детей и иммунокомпрометированных лиц [138]. Существует гипотеза о том, что МАР является также этиологическим агентом патогенеза болезни Крона у людей [149, 214]. Было показано, что штаммы МАР, выделенные из кишечника больных, генетически близки штаммам МАР, вызывающим болезнь Йоне у сельскохозяйственных животных [143], характеризующуюся сходными гистологическими изменениями кишечника. Однако, строгого доказательства этой теории не существует [25, 67].

По Оттен и Васильеву [37] источником инфицирования человека и свиней с большой вероятностью являются домашние птицы. В работах по генотипированию штаммов *Mycobacterium avium hominissuis* (МАН), принадлежащего к МАС, выделенных в Японии, Корее, Португалии, Франции, Финляндии, Голландии, Германии, от пациентов с микобактериозом лёгких, свиней и из водопроводной воды, была показана генетическая близость

штаммов МАН, выделенных из свиней и полученных от пациентов-европейцев [167, 169, 192]. Напротив, штаммы, выделенные от пациентов из Кореи и Японии, были генетически ближе к штаммам МАН, выделенным из водопроводной воды [167, 169]. Это показывает, что преобладающие штаммы МАН и источники заражения ими могут отличаться в зависимости от географического региона.

Распространён микобактериоз у рыб, особенно аквариумных. Его вызывает, как правило, *M.marinum* [154]. Нередки случаи заражения людей, при этом чаще возникают поражения кожных покровов, мягких тканей, связок [154, 199].

До недавнего времени считалось, что НТМБ передаются от человека к человеку крайне редко, либо не передаются [29, 109, 150, 158], однако, в ходе крупного исследования полных геномов 1080 клинических штаммов, выделенных от 517 больных муковисцидозом, была доказана передача штаммов *M.abscessus* между исследованными больными [88]. Получены также косвенные доказательства возможности передачи от человека к человеку *M.kansasii* [257]. Л. Хейфетц в обзоре 2004 года [156] привёл сведения о вариантах локализации инфекций, вызванных медленно- и быстрорастущими НТМБ, суммировав результаты ряда исследований [145, 187, 290, 308] и выделив основные группы заболеваний, вызываемых ими: диссеминированные поражения, лёгочные инфекции, поражения кожи, лимфатических узлов, мягких тканей, раневые инфекции, бурситы и синовиты костей (Таблица 3).
Таблица 3 - Наиболее распространённые локализации инфекций, вызванных НТМБ по Heifetz, 2004

Вид НТМБ	Локализация инфекции							
	Бактеремия	Лёгкие	Кожа	Лимфоузлы	СПЖ*	Кости и суставы	Мягкие ткани	Раневые инфекции
<i>Mycobacterium avium</i>	+	+	-	+	-	+	-	-
<i>Mycobacterium asiaticum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Mycobacterium bohemicum</i>	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Mycobacterium branderi</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Mycobacterium celatum</i>	+	+	-	-	-	+	-	-
<i>Mycobacterium conspicuum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mycobacterium doricum</i>	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Mycobacterium genavense</i>	+	-	+	+	-	-	-	-

Продолжение таблицы 3

Вид НТМБ	Локализация инфекции							
	Бактеремия	Лёгкие	Кожа	Лимфоузлы	СПЖ*	Кости и суставы	Мягкие ткани	Раневые инфекции
<i>Mycobacterium abscessus</i>	-	+	-	-	-	+	+	-
<i>Mycobacterium chelonae</i>	+	+	+	-	-	+	-	-
<i>Mycobacterium fortuitum</i>	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>Mycobacterium mucogenicum</i>	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>Mycobacterium peregrinum</i>	+	+	-	-	-	-	+	-
<i>Mycobacterium porcinum</i>	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Mycobacterium senegalense</i>	-	-	-	-	-	-	+	-
<i>Mycobacterium alvei</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Mycobacterium brumae</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Mycobacterium confluentis</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Mycobacterium elephantis</i>	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>Mycobacterium goodii</i>	-	+	-	-	-	+	-	-
<i>Mycobacterium holsaticum</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Mycobacterium immunogenum</i>	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>Mycobacterium mageritense</i>	+	+	-	-	-	-	-	+
<i>Mycobacterium novocastrense</i>	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>Mycobacterium septicum</i>	+	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	-	-	-	+	-	-	-	-
<i>Mycobacterium thermoresistibile</i>	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Mycobacterium wolinskyi</i>	-	-	-	-	-	+	-	-

Примечание:

*СПЖ – спинномозговая жидкость

- вид НТМБ не выявляли в указанной локализации

+ вид НТМБ выявляли в указанной локализации

Стоит отметить, что медленнорастущие составили в этом исследовании большую часть патогенных для человека НТМБ и были представлены 30 видами.

К настоящему времени список патогенных НТМБ пополнился, что связано не только с описанием новых видов, как, например, *M.chimerae* [291], но и с тем, что в последние годы регистрируют случаи заболеваний, вызванных микобактериями, которые ранее не считались патогенными. Так, выделение в материале от пациентов *M.gordonaе* относили к контаминации, однако, отмечены случаи диссеминированных инфекций [305], поражений желудочно-кишечного тракта [221], заболеваний мочеполовых путей [171, 250], кожи и мягких тканей [135], а также респираторных и лёгочных инфекций [212, 226, 285], вызванных этим микроорганизмом.

Лёгочные формы микобактериоза являются одними из наиболее

распространённых на сегодняшний день [29, 66, 83, 118, 156] и активно исследуются на протяжении последних 20 лет в связи со сходством их патогенеза и клинической картины с туберкулезом [279]. Сходна и рентгенологическая картина микобактериоза лёгких и туберкулёза [15, 59, 118], наиболее распространёнными рентгенологическими формами являются кавернозная (сходна с кавернозным туберкулёзом), бронхоэктатическая и солитарная [118]. При этом рентгенологические проявления микобактериоза отличаются многообразием [7], и, несмотря на то, что некоторые специалисты выделяют характерные рентгенологические особенности поражений лёгких при микобактериозе [5], точная дифференциальная диагностика туберкулёза и микобактериоза на основе результатов рентгенографических исследований невозможна. Отсутствуют характерные признаки микобактериоза и на гистологическом уровне [45].

Ввиду сходства клинической картины заболеваний быстрая дифференциальная диагностика туберкулёза и микобактериоза представляет собой важную проблему.

Факторы предрасположенности к микобактериозу

Факторами предрасположенности к микобактериозу являются заболевания, которым сопутствуют приобретенные иммунодефицитные состояния, это в первую очередь ВИЧ-инфекция, а также диабет, лейкоз ворсистых клеток (ВКЛ), реже – хронические миелолейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз и лейкомия у детей [302]. Генетическими факторами предрасположенности к заболеванию микобактериозом считают нарушения клеточного иммунного ответа и секреции ИЛ-12, ИЛ-23 и ИНФ- γ ввиду мутаций в генах IFN- γ R1 [255], IFN- γ R2, IL-12p40, IL-12R- β 1, STAT-1 [196, 255], а также генах, кодирующих факторы врожденного иммунитета Nf-K β , I κ B [196]. Фактором риска развития микобактериоза и туберкулёза является ревматоидный артрит при лечении ингибиторами фактора некроза опухолей TNF- α [307]. Долговременный приём ингаляционных кортикостероидов при хронических респираторных заболеваниях, например, хронической обструктивной болезни лёгких (ХОБЛ) и

бронхоэктатической болезни лёгких также определяет предрасположенность к микобактериозу [60, 82, 235]. Муковисцидоз также входит в число заболеваний, обуславливающих повышенный риск микобактериоза, в связи со сниженным местным иммунитетом органов дыхания [134, 255].

Следует отметить, что даже более чем однократное выявление НТМБ не всегда означает болезнь по последним данным, оно может свидетельствовать о контаминации средств забора материала или условно-патогенном носительстве [72, 178, 183, 288]. Поэтому диагностировать микобактериоз может только врач, исходя из клинической картины, результатов рентгенологических, микробиологических, молекулярно-генетических исследований.

Эпидемиология

В настоящее время отмечают рост заболеваемости микобактериозом лёгких во всём мире [25, 37, 84, 225, 280].

Исследования заболеваемости микобактериозом в последних лет в США, Канаде, Корее, Японии показывают интенсивный рост числа лёгочных форм микобактериоза, при том, что ситуация по внелёгочным формам остаётся стабильной [65, 66, 179, 189, 230]. Так, в Онтарио (Канада) в период с 1998 по 2010 НТМБ, выделенные из лёгких, составили 96% всех случаев выявления НТМБ, а число случаев лёгочного микобактериоза росло ежегодно, в то время как внелегочные формы составили 4% и частота их выявления не менялась на протяжении всего 12-летнего периода исследования [83]. Броуд и соавторы провели метаанализ динамики частоты выявления МБТ и НТМБ в период с 1946–2014 гг в 16 экономически развитых регионах на всех континентах мира на основе данных статей из базы Medline, исключив из анализируемой выборки больных микобактериозом, сочетанным с муковисцидозом и ВИЧ [84]. Были рассмотрены как лёгочные, так и внелёгочные локализации микобактериоза и туберкулёза. Для 75% регионов (Канада, США, Юго-Восточная часть Англии, Швейцария, Юго-Западная часть Ирландии, Греция) было показано увеличение числа случаев микобактериоза, в 12,5% показатели были стабильны, в остальных регионах показано уменьшение числа случаев (Дания и Австралия). В то же

время для 81% регионов было отмечено падение частоты случаев туберкулеза. В целом установлена обратная зависимость частот заболеваемости микобактериозом и туберкулёзом в развитых странах мира. Авторы объясняют сокращение числа случаев туберкулёза успехами местных программ здравоохранения, улучшением условий жизни, эффективным ведением больных и отслеживанием контактов. По их мнению, НТМБ постепенно занимают нишу микобактерий туберкулёза в регионах с высоким экономическим доходом.

В последние 10 лет нередки случаи постановки ложного диагноза туберкулез с МЛУ больным микобактериозом, этиологическим фактором которого являются НТМБ, в большинстве случаев обладающие резистентностью к ПТП [37, 45, 147, 205, 264, 318]. Так, развивающихся странах, где туберкулёз является эндемичным заболеванием, ввиду недостаточно развитой системы диагностики и слабой оснащённости лабораторий, дифференциация между туберкулёзом и микобактериозом часто проводится некорректно и больным микобактериозом лёгких ставят диагноз туберкулез с МЛУ [147, 175, 205, 318]. Помимо этого, в странах с высокой туберкулёзной нагрузкой встречаются случаи ко-инфекции МБТ/НТМБ, которые важно выявлять для назначения пациентам адекватного режима химиотерапии [147].

В Российской Федерации официальная статистическая регистрация и учет заболеваний, вызванных НТМБ, не ведется, не разработаны алгоритмы тактики и длительности лечения больных [25, 47], однако всё больше исследователей интересуются проблемой микобактериоза, в ряде лабораторий внедрены молекулярно-генетические протоколы идентификации НТМБ до вида и ведётся постановка тестов на лекарственную чувствительность [6, 17, 60]. Следует отметить, что в Приказе МЗ РФ №951 «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания» от 29 декабря 2014 года регламентировано использование быстрых молекулярно-генетических методов определения до вида НТМБ и постановка тестов на лекарственную НТМБ, что отличает этот приказ от предыдущего, и свидетельствует о положительных тенденциях в области

диагностики микобактериоза в РФ.

1.4 Лабораторная диагностика туберкулёза и микобактериоза

Диагностика туберкулёза и микобактериоза основана на сходных принципах, однако, диагностика микобактериоза имеет ряд особенностей, связанных с тем, что НТМБ не являются специализированными паразитами, как МБТК, и широко встречаются как сапрофиты в различных природных биотопах.

В России диагностика туберкулёза регламентируется Приказами 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”. Т.к. собственные критерии в области диагностики микобактериоза в РФ не разработаны, врачи пользуются критериями Американского торакального общества [150], как клиническими, так и микробиологическими. Методы исследования, регламентированные для использования на территории РФ для диагностики микобактериоза и определения лекарственной чувствительности НТМБ, вошли в Приказ МЗ РФ № 951 от 29 декабря 2014 года.

Основным диагностическим материалом для лабораторных исследований при туберкулёзе и микобактериозе лёгких является мокрота. При отсутствии возможности собрать мокроту или подозрении на другие формы заболевания в качестве материала используют экссудат, аспирационный материал, промывные воды бронхов, жидкость бронхоальвеолярного лаважа, хирургический материал, кровь, мочу, кал и другие виды материала.

В лабораторной диагностике туберкулёза и микобактериоза используют преимущественно микробиологические и молекулярно-генетические методы исследования, но важное место занимают и иммунологические и биохимические методы.

1.4.1 Микробиологические методы выявления и идентификации микобактерий и определения их лекарственной чувствительности

Основные микробиологические методы выявления микобактерий - микроскопия диагностического материала и бактериологический метод, заключающийся в выделении возбудителя заболевания из диагностического материала при его посеве на питательные среды.

Бактериоскопия

Основная задача бактериоскопического метода исследования – быстрое выявление кислотоустойчивых микроорганизмов (КУМ).

Прямая микроскопия в диагностическом материале – метод быстрого выявления КУМ, разработанный более ста лет назад [278]. Не смотря на то, что он не является специфичным для микобактерий, его применяют для выявления наиболее эпидемически опасных больных туберкулёзом с целью своевременного оказания противоэпидемических мероприятий и прекращения трансмиссии возбудителя [21]. Диагностическая чувствительность микроскопии составляет около 50% для всех впервые выявленных больных туберкулёзом [43, 234, 264]. Ввиду экономической доступности и короткого времени анализа, этот метод по-прежнему используют для массовых скринингов в развивающихся странах, не смотря на появление более специфичных и чувствительных молекулярно-генетических методов диагностики [110, 123, 137, 229, 264].

Наиболее распространённый вариант метода прямой микроскопии в диагностическом материале - световая микроскопия с окраской мазков по Цилю-Нильсену [51]. Метод окрашивания назван по фамилиям разработавших его в 1882-1883 гг. немецких врачей [233, 322]. Принцип окрашивания основан на свойствах клеточной стенки КУМ, которая невосприимчива к водным растворам красителей и прокрашивается с трудом, но способна удерживать основной краситель после обработки кислотой. Проводят окрашивание карболовым фуксином Циля при нагревании мазка. Благодаря высокому содержанию липидов и жирных кислот в клеточной стенке, краситель не вымывается слабыми растворами кислот, как это происходит у некислотоустойчивых микроорганизмов.

После обесцвечивания кислотой, мазок докрашивают метиленовым синим. В результате такого окрашивания КУМ приобретают рубиновый цвет, другие микроорганизмы – сине-голубой. Для исследования мазков используют иммерсионные объективы с 90-100X и окуляры с 7-10X увеличением.

Более чувствительным методом микроскопии мазков на КУМ является люминесцентная микроскопия [53]. Её чувствительность выше чувствительности световой микроскопии с окраской по Цилю-Нильсену на 10-15% [43, 51, 53]. Окраска мазков проводится с использованием люминесцентных красителей родамина, ауromaина и др., которые связываются с воскоподобными структурами клеточных мембран КУМ. Окрашенные мазки анализируют в ультрафиолетовом свете, вызывающем флуоресценцию красителей. Яркость и контрастность такой окраски значительно выше, чем окраски по Цилю-Нильсену, что позволяет использовать меньшее увеличение и сократить число просматриваемых полей зрения [75].

Экономически более доступная модификация люминесцентной микроскопии – LED-люминесцентная микроскопия, позволяющая использовать в качестве источника света светодиодную приставку к световому микроскопу. Была показана большая чувствительность этого метода по сравнению с методом микроскопии с окраской по Цилю-Нильсену. Качество, скорость получения результата и стоимость LED-микроскопии имеют преимущества как в отношении световой, так и в отношении классической люминесцентной микроскопии по результатам исследований ВОЗ [310]. На основании этих результатов, LED-микроскопия была рекомендована ВОЗ как альтернативная технология [21]. Большая чувствительность LED-микроскопии [113, 211, 220] объясняется тем, что испускаемый диодом спектр света уже, чем при стандартной люминесцентной микроскопии, а длина волны соответствует максимуму спектра поглощения ауromaиновых красителей [152].

Основными недостатками метода микроскопии в диагностике МБТК и НТМБ является его низкая чувствительность (необходимо наличие 5000-10000 клеток в миллилитре мокроты), отсутствие специфичности к микобактериям и

невозможность с его помощью дифференцировать МБТК от НТМБ. Однако, методы микроскопии остаются незаменимыми ввиду короткого времени анализа, экономической доступности, отсутствия необходимости закупки и использования сложного дорогостоящего оборудования, возможности оценки массивности бактериовыделения и выявления наиболее эпидемически опасных больных. Согласно рекомендациям CDC выявление МБТК методом ПЦР необходимо проводить пациентам с симптомами туберкулёза лёгких, не имеющих подтверждённого диагноза. При этом ПЦР не должна заменять микроскопию мазков с окрашиванием на КУМ и культуральный метод [115].

Однако, алгоритм для первичной лабораторной диагностики у лиц с симптомами, указывающими на туберкулез легких, разработанный европейским региональным бюро ВОЗ и опубликованный в 2017 году [1], предполагает полную замену микроскопии быстрыми молекулярно-генетическими методами выявления туберкулёза (MTB/RIF) и определения лекарственной чувствительности возбудителей (MTB/RIF и тест на основе технологии LPA).

Бактериологический (культуральный) метод

Основная задача бактериологического метода - получение чистой культуры микобактерий для её последующей идентификации до вида и постановки теста на лекарственную чувствительность к препаратам, применяющимся для лечения туберкулёза и микобактериоза. На сегодняшний день этот метод является «золотым стандартом» диагностики [54].

Выделение чистой культуры МБТК и НТМБ из диагностического материала проводят методом посева на питательные среды, состав которых разработан с учётом биологических свойств микобактерий. Перед посевом осуществляют предварительную обработку исследуемого материала с целью его разжижения и гомогенизации, а также для подавления роста микроорганизмов, не относящихся к микобактериям, которыми загрязнено большинство проб, подлежащих анализу [51]. Подавление роста быстрорастущей гноеродной и гнилостной микрофлоры необходимо, т.к. он мешает росту микобактерий и затрудняет их выделение [42]. В зависимости от типа диагностического материала для предпосевной обработки

используют различные деконтаминирующие агенты [53, 54, 21]. Наиболее широкое распространение в мире получил N-ацетил-L-цистеин-гидроксид натрия NALC-NaOH, обработка которым позволяет добиться наибольшей высеваемости микобактерий [21], однако, во многих лабораториях используют менее дорогие деконтаминирующие растворы: 10% раствор трехзамещенного фосфорнокислого натрия (Na_3PO_4); 3% серная кислота; 4% раствор едкого натра. Составы и протоколы приготовления деконтаминирующих растворов подробно описаны в Приложении №11 к приказу МЗ РФ №109 [42].

Для получения культур микобактерий из диагностического материала используют три группы питательных сред: плотные питательные среды (ППС) на яичной основе, жидкие синтетические и полусинтетические питательные среды и плотные или полужидкие питательные среды на агаровой основе.

Из ППС на яичной основе наибольшее распространение получила среда Левенштейна-Йенсена, применяемая во всем мире в качестве стандартной среды для первичного выделения возбудителя туберкулеза и определения его лекарственной чувствительности. Вторая стандартная ППС на яичной основе, рекомендованная в РФ для выделения микобактерий - среда Финн-П. Она близка по составу к среде Левенштейна-Йенсена, однако, имеет более низкую кислотность и большую стабильность, что обуславливает более эффективную высеваемость микобактерий при посеве материала, обработанного щелочными детергентами [42]. При посеве бактериоскопически отрицательного материала рост культуры микобактерий на ППС может продолжаться 20-46 дней, а некоторых штаммов – 60-90 дней, поэтому отрицательные результаты выдают через 12 недель от начала культивирования при обязательном еженедельном просмотре культур [20]. В случае получения роста культуры при наличии колоний характерной морфологии и окраски проводят оценку интенсивности роста. Контроль чистоты культуры осуществляют методом посева на кровяной агар и, дополнительно, микроскопией мазков по Цилю-Нильсену в случае получения культуры, морфологически похожей на НТМБ [25, 37]. Преимуществом ППС является доступность реагентов для их приготовления - культивирование

микобактерий на ППС менее дорогостоящий метод, чем культивирование на жидких питательных средах. Однако, процесс приготовления ППС сложно поддаётся стандартизации, а скорость роста микобактерий на них ниже, чем на жидких питательных средах, кроме того невозможно стандартизировать и автоматизировать учёт результатов, поэтому высок риск ошибок, связанных с человеческим фактором [52].

Среди жидких питательных сред в мире наиболее широко используют модифицированную среду Middle Brook 7H9. Она применяется для ускоренного получения культур микобактерий в комплексе с ростовой добавкой OADC и смесью антибактериальных препаратов PANTA в сочетании со специализированными системами для автоматического учёта роста клеток. Этот подход одобрен международным сообществом как “золотой стандарт” для подтверждения этиологии заболевания [186, 217, 316] и рекомендован к применению в бактериологических лабораториях в виде технологии BACTEC MGIT. MGIT – *Mycobacteria growth indicating tube* – пробирки, содержащие модифицированную жидкую питательную среду Middle Brook 7H9 и флуорохром, закреплённый на дне пробирки и покрытый слоем силикона. Перед посевом в пробирки добавляют ростовую добавку и коктейль антибактериальных препаратов, ингибирующий рост немикобактериальной флоры. Пробирки инкубируют при 37°C в камере специализированного прибора BACTEC MGIT 960. Размножение микобактерий приводит к увеличению потребления кислорода и снижению его концентрации в пробирке, что вызывает усиление флуоресценции флуорохрома. Флуоресценция становится видимой при облучении пробирки ультрафиолетовым светом и автоматически регистрируется фотодатчиком прибора. Регистрация сигнала флуоресценции осуществляется каждые 60 минут, на основе его изменения в специализированном программном обеспечении можно построить кривые роста полученных культур. Преимущество использования автоматизированной системы BACTEC MGIT перед бактериологическим исследованием на ППС заключается в использовании сертифицированных и стандартизированных реагентов и сред и стандартных протоколов исследований,

а также более высокой скорости роста микобактерий (12-22 дня до получения положительного результата) [51, 186]. Отрицательный результат выдают через 42 дня культивирования.

Преимуществами этого метода культивирования являются более высокая скорость роста микобактерий и больший выход МБТ и НТМБ по сравнению с ростом на ППС [54], наличие стандартизированного протокола исследований, возможность автоматизации учета результатов, использование стандартизированных сред [42, 52, 54]. Недостатки – дороговизна сред и оборудования для автоматической детекции роста.

В России среди жидких сред для культивирования микобактерий также применяют среду Школьниковой.

Согласно последним международным рекомендациям для диагностики туберкулеза предпочтительно использовать посевы на жидкие среды [1], однако, результаты сравнительных испытаний и многолетнего опыта выявления микобактерий в специализированных лабораториях РФ показывают, что для культуральной диагностики туберкулеза следует использовать как минимум две разные по составу питательные среды [42].

Методы идентификации культур микобактерий

При получении культуры микобактерий на питательной среде любого типа необходимо провести её идентификацию. Доказательство принадлежности полученной культуры к МБТК/НТМБ с помощью дополнительных лабораторных тестов является обязательным [25, 43, 51, 52, 54]. Для проверки наличия посторонней (не микобактериальной) флоры в полученных культурах проводят их посев на чашки Петри с кровяным агаром. Наличие роста культуры через 24-72 ч инкубации при +37°C свидетельствует о контаминации материала посторонней микрофлорой [43].

Дифференциацию культур МБТК и НТМБ проводят с помощью биохимических, иммунохроматографических и молекулярно-генетических тестов [25, 37, 51, 53].

Для дифференциации МБТК от медленно растущих НТМБ используют

биохимические тесты, для проведения которых необходимы 3-4х недельные культуры микобактерий, полученные на среде Левенштейна-Йенсена:

- ниациновый тест (тест на способность продуцировать никотиновую кислоту)
- нитратредуктазный тест
- каталазный тест
- салициловый тест

Ниациновый тест основан на способности *M.tuberculosis* накапливать в клетках никотиновую кислоту в больших количествах, чем микобактерии других видов. Для его проведения необходима культура, выращенная на среде Левенштейна-Йенсена в течение 3-4 недель. Преимуществом метода относительно других биохимических методов идентификации и дифференциации микобактерий является сравнительно короткое время получения результатов, составляющее 3-4 часа. Однако, некоторые штаммы *M. bovis*, включая *M. bovis* BCG, и некоторые нетуберкулезные микобактерии, например, *M. simiae*, *M. chelonae* chemovar *niacinogenes*, так же способны синтезировать никотиновую кислоту в больших количествах и, как следствие, давать положительную реакцию, поэтому ниациновый тест необходимо использовать в комплексе с другими биохимическими методами дифференциации микобактерий [42].

Нитратредуктазный тест (тест Грисса) основан на детекции роста МБТ по окислению нитрата ферментом нитратредуктазой, продуцируемым МБТ, и окрашивании образовавшегося продукта окисления специальным красителем. Для его проведения необходима 4х недельная культура микобактерий с обильным ростом, выращенная на среде Левенштейна-Йенсена. В сочетании с ниациновым тестом позволяет дифференцировать *M.tuberculosis*, у которого больше всего выражена нитратредуктазная активность, от *M. bovis* и некоторых нетуберкулезных микобактерий, не вырабатывающих нитратредуктазу [20, 42]. Недостатками метода являются длительное время получения результата — до 12–14 дней, отсутствие международных стандартов его проведения [54] и невысокая специфичность: многие виды НТМБ имеют похожую нитратредуктазу, за счёт

работы которой происходит неспецифическое окрашивание среды [35].

Каталазный тест – биохимический тест, направленный на выявление наличия и активности термостабильной каталазы. Почти все виды микобактерий обладают каталазной активностью, за исключением *M.bovis* и некоторых резистентных к изониазиду штаммов *M.tuberculosis*. После прогревания культур при 68 °C и pH = 7,0 каталаза МБТ теряет активность.

Салициловый тест основан на том, что МБТ не способны утилизировать салициловокислый натрий в отличие от нетуберкулёзных микобактерий. Выращивание культуры микобактерий на среде Левенштейна-Йенсена, содержащей салицилат натрия в концентрации 1000 мкг/мл позволяет дифференцировать МБТ от НТМБ. Недостатком метода является длительный рост культур в присутствии салицилата.

Быстрорастущие НТМБ, как правило, дифференцируют от МБТК на этапе получения первичной культуры по скорости роста и морфологии колоний. Стоит отметить, однако, что для оценки этих характеристик культуры выращивают при температуре 37°C при том, что температурный оптимум для разных видов НТМБ варьирует от 22 до 45°C [35].

В случае получения культуры НТМБ необходимо установить видовую принадлежность штамма. Существует ряд предназначенных для этого биохимических тестов, описанных в определители бактерий Берджи, однако, штаммы, относящиеся к одному и тому же виду НТМБ, могут давать на них разную реакцию.

Таким образом, биохимические и микробиологические методы дифференциации МБТК от НТМБ и идентификации микобактерий до вида обладают рядом ограничений: продолжительное время анализа, связанное с необходимостью получения культуры на среде Левенштейна-Йенсена и временем проведения самих тестов; повышенный риск ошибок, связанных с человеческим фактором ввиду большого количества манипуляций; дополнительная опасность для персонала, связанная с работой с культурами; низкая специфичность.

Микробиологические методы определения лекарственной чувствительности микобактерий

Для назначения пациенту корректного режима химиотерапии необходимо определить лекарственную чувствительность (ЛЧ) полученной микобактериальной культуры.

В России для определения ЛЧ МБТ рекомендовано использовать фенотипические методы – изучение роста культуры на питательных средах в присутствии ПТП [43]: широкое распространение получили метод абсолютных концентраций с культивированием исследуемых штаммов на среде Левенштейна-Йенсена, рекомендованный ВОЗ, а также модифицированный метод пропорций на жидкой питательной среде Middle Brook 7H9 в автоматической системе учёта роста культур BACTEC MGIT 960.

В случае получения культуры для определения ЛЧ необходимо сначала идентифицировать НТМБ до вида. Для определения ЛЧ НТМБ рекомендован метод, основанный на определении минимальных ингибирующих концентраций препаратов в жидкой среде. На сегодняшний день в России зарегистрированы системы компании Trek Diagnostic System, Thermo Scientific (США) Sensititre Rapmyco (для определения ЛЧ быстроустойчивых микобактерий) и Sensititre Slowmyco (для определения ЛЧ медленноустойчивых микобактерий, широко используемые во всём мире [6, 68, 93, 97, 202]. Они представляют собой панель ПТП и антибактериальных препаратов, внесённых в разных концентрациях в 96-луночную плашку с жидкой средой. Одна лунка не содержит препаратов и является контрольной. Панель препаратов отличается для быстро- и медленнорастущих НТМБ. Суть теста заключается в сравнении роста культуры в лунках плашки с препаратами и без.

Бактериологический метод диагностики туберкулёза и НТМБ незаменим, т.к. позволяет получить чистую культуру возбудителя для дальнейшего определения её ЛЧ с целью назначения больному корректной антибактериальной терапии. Диагностическая чувствительность методов культивирования микобактерий составляет около 70-80% среди впервые выявленных больных

туберкулёзом [43]. Для получения культуры достаточно 20-100 бактериальных клеток в 1 мл мокроты [51], что на 2,5-3 порядка выше чувствительности микроскопии. Существенным недостатком культуральных методов определения ЛЧ является длительность анализа. В среднем процесс получения культуры и постановки теста на ЛЧ занимает 25 суток при исследовании на жидких средах в системе ВАСТЕС MGIT960 и около 68,4 суток при исследовании на ППС [51]. Важно отметить, что бактериологический метод диагностики МБТК и НТМБ в сочетании с биохимическими или иммунохроматографическими тестами без использования молекулярно-генетических методов не позволяет выявлять смесь МБТК и НТМБ, что может приводить к неправильному определению ЛЧ возбудителя заболевания и, как следствие, неэффективной антибактериальной терапии [37, 147, 205, 264].

1.4.2 Ускоренные методы выявления и идентификации микобактерий

Иммунологические методы диагностики

В настоящее время основными иммунологическими методами диагностики туберкулёза являются туберкулиновые тесты - проба Манту с двумя туберкулиновыми единицами (ТЕ), проба с аллергеном туберкулезным рекомбинантным (Диаскинтест) - и тесты высвобождения гамма-интерферона (ИФН-гамма) - IGRA-тесты [54].

Проба Манту представляет собой тест, при котором раствор туберкулина - сложную смесь антигенов микобактерий, выделенных их клеток культур МБТК (*M.tuberculosis*, *M.bovis*), вводится внутрикожно. Т.к. туберкулин не является антигеном, после его введения в организм не образуются специфические антитела и не происходит иммунизация. Реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) в виде специфического воспаления с инфильтрацией кожи макрофагами туберкулин вызывает только у людей, инфицированных МБТ или привитых БЦЖ [51].

Диаскинтест® – препарат для проведения туберкулиновой диагностики, разработанный в России, представляющий собой рекомбинантный белок CFP10-ESAT6, продуцируемый генетически модифицированным штаммом *Escherichia*

coli BL21(DE3)/pCFP-ESAT [3, 19]. Белок состоит из связанных между собой антигенов CFP10 и ESAT6, присутствующих в вирулентных штаммах МБТК и отсутствующих в штаммах *M.bovis* BCG, из которого готовят вакцины БЦЖ и БЦЖ-М, поэтому в отличие от туберкулина, выделенного из культуры клеток МБТК, Диаскинтест® не вызывает ответную реакцию ГЗТ у лиц, вакцинированных БЦЖ [19, 50].

Привлекательность кожных туберкулиновых тестов определяется простотой их выполнения, низкой стоимостью, доступностью их проведения и учёта результатов [51].

В настоящее время для диагностики туберкулёза в мире широко применяют иммунологические тесты *in vitro*, принцип действия которых основан на выявлении ИФН-гамма Т-лимфоцитами, циркулирующими в крови, в ответ на воздействие антигенов МБТ (Interferon gamma release assay – IGRA) [54]. Их преимуществами являются короткое время анализа (12 - 24ч) и возможность выявления латентной туберкулезной инфекции. На территории РФ зарегистрировано два теста этого типа. Один из них - QuantiFERON®-TB Gold - основан на методе твердофазного иммуносорбентного анализа антиген-специфичной продукции ИФН-γ Т-клетками, циркулирующими в цельной крови, в ответ на антигены ESAT-6, CFP-10, TB7.7, продуцирующиеся МБТ и отсутствующие у рекомбинантных штаммов *M.bovis* BCG [197, 213]. Второй IGRA-тест, зарегистрированный в России - T-SPOT.TB - с помощью техники Elispot определяет количество моноклеарных клеток периферической крови, продуцирующих ИФН-γ [13]. Недостатком тестов IGRA является то, что использующиеся в их дизайне антигены ESAT-6, CFP-10 и TB7.7 помимо МБТ вырабатывают также некоторые виды НТМБ: *M. gastri*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. riyadhense* и *M. szulgai* [142, 296], что сказывается на специфичности анализа. IGRA-тесты являются хорошим инструментом для быстрой диагностики туберкулёза [9, 48] и обладают специфичностью до 99% и чувствительностью около 78% [216], однако, не могут быть использованы для дифференциации между МБТК и НТМБ и выявления смешанных инфекций МБТК/НТМБ.

В протокол идентификации культур, полученных в системе BASTEC MGIT 960 входит постановка иммунохроматографического теста на наличие антигена МБТК МРТ64. Существует несколько коммерческих иммунохроматографических экспресс-тестов, основанных на выявлении фракции белка МРТ64, специфичного для микобактерий туберкулезного комплекса. Это тест-полоски с иммобилизованными на них антителами к МРТ64. Материалом для анализа могут служить культуры микобактерий, полученные как на жидких, так и на плотных питательных средах. При наличии в культуре клеток МБТК, реакция с антигеном к МРТ64 вызывает проявление специфической окрашенной полосы наряду с проявлением контрольной полосы, свидетельствующей о том, что тест выполнен правильно. Главными преимуществами метода являются скорость проведения (5-15 минут от начала теста до получения результата), минимальное количество необходимых манипуляций, высокая специфичность.

Недостатками теста являются отсутствие возможности использования для анализа исходного клинического материала от больных и возможности дифференциации НТМБ от немикобактериальной микрофлоры. Следует также отметить, что тест даёт ложноположительные результаты на некоторых штаммах *S.aureus* и *M.marinum* [63, 104, 182].

Молекулярно-генетические методы диагностики

Молекулярно-генетические исследования занимают важное место в диагностике туберкулёза и микобактериоза, т.к. их использование позволяет поставить диагноз больному, не дожидаясь роста культуры, и определить ЛЧ к ряду ПТП, что даёт возможность начать лечение до получения результатов фенотипической устойчивости. Ввиду того, что туберкулёз – заболевание с большей эпидемической значимостью, чем микобактериоз, в области его диагностики существует большее количество решений для выявления возбудителя и определения его ЛЧ к ряду ПТП молекулярными методами.

Молекулярно-генетические методы выявления ДНК МБТК и НТМБ, определения лекарственной чувствительности МБТ и идентификации НТМБ до вида можно разделить на две группы: методы, основанные на классической ПЦР с

последующей визуализацией продуктов амплификации в агарозном геле либо путём гибридизации продуктов амплификации на твердом носителе (гибридизационные методы) и методы, основанные на ПЦР-РВ.

Молекулярно-генетические методы выявления МБТ и НТМБ

Молекулярно-генетические методы диагностики туберкулёза начали стремительно развиваться в конце 80х – начале 90х годов прошлого столетия. Наряду с коммерческими тест-системами было разработано множество “домашних”, основанных преимущественно на классической ПЦР с визуализацией продуктов амплификации гибридизационными методами и/или на электрофорезе [81, 107, 165, 284]. Самая распространённая мишень для выявления *M.tuberculosis* такими ПЦР-системами – многокопийная вставка *IS6110*, впервые описанная, как последовательность, являющаяся уникальным генетическим маркером *M.tuberculosis* в 1990 году [284]. Число копий *IS6110* в геноме МБТ варьирует от 10 до 12 [92, 284], что увеличивает чувствительность анализа, кроме того, разница количества копий *IS6110* у *M.tuberculosis*, *M.bovis*, *M.bovis* БЦЖ может служить дополнительным диагностическим признаком для дифференциации этих видов.

В качестве мишеней для выявления ДНК МБТ также использовали участки генов, кодирующих микобактериальные антигены, такие как белок теплового шока размером 65 кДа – ген *groEl* (*hsp65*) [81, 243], антиген МРВ 64 [206]. Были найдены участки гена *groEL* (*hsp65*), позволяющие дифференцировать в сочетании с методом полиморфизма длин рестриктных фрагментов (ПДРФ) *M.tuberculosis* от *M.bovis* и НТМБ и идентифицировать НТМБ до вида [29, 116, 125, 299].

Первые коммерческие молекулярно-генетические тест-системы для обнаружения ДНК/РНК МБТ и НТМБ были основаны на классической или ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией) с последующей гибридизацией продуктов амплификации с ДНК- или РНК- зондами и регистрации сигнала гибридизации. Одна из первых тест-систем, одобренных FDA для выявления МБТК из мокроты как БК+, так и БК- больных с подозрением на туберкулёз, E-AMTDT (Gen-ProbeA,

Inc., Сан-Диего, США), была основана на методе изотермической транскрипционно-опосредованной амплификации [94]. Объектом исследования является микобактериальная РНК, которую выделяли из клеток с помощью их экспозиции в ультразвуке, далее получали кДНК и транскрибировали её для увеличения количества РНК-матрицы. Детекцию специфической микобактериальной рРНК проводили с помощью ДНК зондов, меченых эфиром акридиния, реакция гидролиза которых щелочным раствором перекиси водорода проходила с выделением света, регистрируемого люминометром [59, 204]. Чувствительность тест-системы для БК+ (положительных образцов по сравнению с культуральным методом составляла от 85.7% до 97.8%, для БК- от 40 до 92,9% по результатам разных исследований. Основное достоинство этой тест-системы – проведение всего анализа в одной пробирке, что уменьшает возможность контаминации, главный недостаток – отсутствие внутреннего положительного контроля (ВПК), использование которого необходимо для отслеживания ингибирования реакции и даёт возможность избежать ложноотрицательных результатов [271]. В России эта тест-система зарегистрирована не была и для диагностики не применялась.

Появившиеся ненамного позже тест-системы Amplicor (Roche Diagnostics, Швейцария) и COBAS Amplicor MTB тест (Roche Diagnostics, Швейцария) была основана на амплификации и детекции 584 п.н. фрагмента гена, кодирующего 16S рРНК микобактерий. После амплификации денатурированные ампликоны помещали в плашку с иммобилизованными специфичными олигонуклеотидными зондами. Сигнал гибридизации получали с помощью системы конъюгат - пероксидаза хрена с авидином, субстрат - 3',3'-5',5'-тетраметил бензидина, детектировали с помощью спектрофотометра [165]. Cobas Amplicor MTB тест-система – автоматизированный вариант системы Amplicor [78]. В этих тест-системах используется ВПК, позволяющий определять случаи ингибирования реакции. Недостатком является продолжительность анализа 6-7 часов и низкая чувствительность для нереспираторного материала и БК- образцов: для ручного метода 27,3–98,6% в ряде исследований для автоматического – 50 и 57,8% [271],

ввиду которой тест-система рекомендована к использованию только с респираторным материалом. Существует опыт использования этой системы в России, была показана 68,0% чувствительность выявления ДНК МБТ из респираторного материала [34]. В мультицентровых исследованиях было показано, что эффективность и чувствительность коммерческих и домашних тест-систем, основанных на гибридизационной технологии, достоверно не отличалась [236].

В 2004 году было проведено обширное исследование, целью которого было подтверждение надёжности метода ПЦР для выявления ДНК МБТК, в котором приняли участие 82 лаборатории в 23 странах мира. Исследование проводили на 8 образцах мокроты и 4х – натрий-фосфатного буфера, к которым добавляли разведения культуры *M. bovis* BCG, содержащие от 0 до 50000 КОЕ. Суммарно во всех лабораториях были правильно выявлены положительные на *M.bovis* BCG образцы мокроты в 86.3% случаев. Всего было получено 4,3% ложноположительных результата. Между результатами, полученными при использовании коммерческих и “домашних” тест-систем не было достоверных отличий. В целом была показана возможность получения достоверных результатов и высокая чувствительность метода ПЦР для диагностики МБТК [236].

В России в конце 90х - начале 2000х проходила апробация и внедрение в клиническую лабораторную практику метода классической ПЦР для выявления *M.tuberculosis* у больных, проходящих диагностику и лечение в ФГБНУ «ЦНИИТ» [22, 56]. Было показано, что выявляемость МБТ этим методом варьирует от 50 % до 98 % в зависимости от формы туберкулёза и уровня бактериовыделения [56]. Отечественные тест-системы, разработанные к тому времени, были основаны на амплификации участков инсерции IS6110 с визуализацией результатов с помощью электрофореза. В диссертационной работе Ларионовой Е.Е. (2005) были испытаны 3 тест-системы отечественного производства: «МИКО-ГЕН» (Москва, НПФ «ДНК-технология»); GencPak ТМ DNA PCR test (Москва, «БИОКОМ») и «АмплиСенс МБТ» (Москва, ЦНИИ

Эпидемиологии МЗ РФ). Было показано, что эффективность ПЦР для диагностики туберкулеза лёгких превышает эффективность методов микроскопии и посева и может составлять от 63,3 до 100% в зависимости локализации заболевания [22].

Технология, основанная на обратной гибридизации продуктов амплификации ДНК со специфическими ДНК-зондами, комплементарными известным уникальным участкам генома микобактерий, нанесёнными на твёрдый нитроцеллюлозный носитель – ДНК-стрипы, изначально была разработана для видовой идентификации микобактерий и определения лекарственной чувствительности МБТ в культурах, полученных от больных [193, 242]. Наиболее коммерчески успешные наборы, основанные на этой технологии – наборы для определения лекарственной чувствительности МБТ GenoType MTBDR*plus*. Более поздние модификации - GenoType MTBDR*plus* VER2.0 позволяют работать с ДНК, выделенной не только из культур, но и из положительного по результатам люминесцентной микроскопии клинического материала от больных, что позволяет детектировать ДНК МБТ в материале и определять лекарственную чувствительность к ПТП первого ряда с чувствительностью 83,3 – 96,4% и специфичностью 98,6 и 100% [76, 215, 232]. Однако, для ряда образцов ДНК, выделенных из мокроты, особенно, БК- по результатам люминесцентной микроскопии, были получены неинтерпретируемые результаты [215]. Это является несомненным минусом набора, т.к. использовать его только для детекции ДНК МБТ дорого, что верно и для другого способа одновременного выявления и определения лекарственной чувствительности МБТ, основанного на гибридизационной технологии – ДНК-биочипов. ДНК-биочип представляет собой твёрдый носитель с иммобилизованными на нём флуоресцентными зондами, использующимися для гибридизации с ПЦР-продуктами, полученными предварительно путем амплификации фрагментов ДНК анализируемых образцов, видоспецифичных или определяющих возникновение лекарственной устойчивости. В тех случаях, когда первичная структура ДНК-зонда совпадает со структурой исследуемых участков ДНК анализируемого образца, на поверхности

чипа образуются флуоресцирующие ДНК-ДНК гибриды. Последовательность ДНК исследуемого материала детектируют по локализации сигнала флуоресценции на носителе. В России разработку биочипов для диагностики ЛЧ МБТ развивала лаборатория биологических чипов института молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, разработавшая и получившая медицинскую регистрацию на биочипы для определения ЛЧ МБТ к рифампицину, изониазиду и ко фторхинолонам [151, 323].

Преимущество гибридизационной технологии заключается в возможности одновременной детекции большого количества мишеней, однако, её использование предполагает большое количество манипуляций и длительное время анализа (до 14 часов), что делает её использование для детекции ДНК МБТ без проведения дополнительного анализа ЛЧ нецелесообразным.

С развитием технологии ПЦР в режиме реального времени появилась возможность создавать тест-системы, позволяющие получать результат за более короткое время и с меньшими трудозатратами. Миллер и др. разработали тест-систему на основе ПЦР в режиме реального времени, позволяющую выявлять МБТК из образцов мокроты БК+ больных и культур BacT/ALERT MP [219]. Позже эта же группа исследователей показала, что специфичность и чувствительность разработанной ими тест-системы для образцов мокроты от БК+ больных не отличается от таковой для тест-системы Amplicor (Roche Diagnostics, Швейцария), при этом время анализа при использовании диагностики на основе ПЦР-РВ было сокращено до 3 ч при продолжительности анализа с помощью Amplicor 6 ч [108]. Чувствительность выявления МБТК первыми ПЦР-РВ тест-системами из БК+ образцов диагностического материала составляла 71,6 – 98,1% [86, 108, 219], что не отличалось от чувствительности описанных выше гибридизационных ПЦР-технологий. Главное преимущество ПЦР-РВ – скорость исследования – отсутствие дополнительных трудоёмких шагов детекции наработанных ПЦР-продуктов, сокращающее время- и трудозатраты. Также как для разрабатываемых до этого гибридизационных тест-систем, была показана более эффективная работа ПЦР-РВ систем на респираторном материале, чем на

других его видах [86, 108, 219]. Это связано с тем, что эффективность ПЦР напрямую зависит от природы материала, качества его предобработки и способа выделения ДНК микобактерий [22, 34, 119]. Показано, что ингибирование реакции, вызываемое компонентами, входящими в состав диагностического материала, снижает чувствительность реакции, часто обуславливая ложноотрицательные результаты. В связи с этим наибольшей популярностью на рынке обладают коммерческие наборы для детекции ДНК МБТК и МБТК/НТМБ, представляющие собой готовые решения и включающие компоненты для предобработки материала, выделения ДНК и, в некоторых случаях, приборы для автоматизации выделения и внесения ДНК в реакционную смесь (технология “Амплитуб”, Синтол, Россия; технология “RealTime MTB”, Abbott, Великобритания) или автоматизации всего процесса от выделения до амплификации (технология TM MTB/RIF, Cepheid, США).

В качестве быстрого скринингового метода выявления МБТ ВОЗ рекомендует тест-системы TM MTB/RIF. Это автоматизированная технология, основанная на гнездовой ПЦР-РВ, которая позволяет детектировать МБТК и их устойчивость к рифампицину, при этом время анализа составляет около 2х часов. Диагностический образец помещается в специализированный картридж, в котором происходит лизис бактериальных клеток, выделение ДНК и амплификация специфических для МБТК фрагментов гена *rpoB*, мутации в которых ответственны за возникновение лекарственной устойчивости к рифампицину. Выявление специфического участка ДНК и мутаций происходит за счет гибридизации наработанного фрагмента гена *rpoB* с 5ю специфическими флуоресцентными зондами. Картридж также содержит лиофилизированные споры *Bacillus globigii* и специфические праймеры и зонд к ДНК этого микроорганизма, мультиплексированные со смесью для выявления МБТК и ЛЧ к рифампицину, что позволяет контролировать качество лизиса, выделения и ПЦР и избегать ложноотрицательных результатов [79, 191, 253]. Картридж с помещенным в него образцом и лизирующим раствором устанавливают в автоматизированную систему System, которая содержит от 1 до 96 независимых модулей, каждый из

которых предназначен для анализа одного образца и может работать независимо от других. В модуле происходит выделение ДНК и ПЦР-РВ с детекцией результатов и их выводом на персональный компьютер (ПК) с анализом и интерпретацией полученных данных в специализированном программном обеспечении (ПО).

В декабре 2010 года технология была рекомендована ВОЗ для массового скрининга больных с подозрением на туберкулёз [306] и активно используется в мире, особенно, в развивающихся странах с высоким бременем туберкулёза не смотря на высокую себестоимость анализов [124, 128, 300]. Диагностика туберкулеза и ЛЧ к рифампицину с помощью систем GeneXpert™ проводится и в России [2, 8, 23, 188], однако, ввиду высокой себестоимости анализа, предпочтение отдаётся отечественным тест-системам, речь о которых пойдёт ниже.

Главным преимуществом технологии является простота в использовании и высокая скорость анализа, позволяющая за 2 часа выявить возбудителя туберкулёза и определить его ЛЧ к рифампицину и высокие чувствительность и специфичность теста. Чувствительность выявления МБТК составляет по литературным данным 53–95%, специфичность - 96%; чувствительность выявления ЛЧ к рифампицину составляет 96–99%, специфичность - 96% [79, 253]. Предел обнаружения *M.tuberculosis* H37Rv с помощью картриджей первого поколения составляет 131 КОЕ/мл мокроты [191]. Недавно появившаяся обновлённая версия технологии - Xpert® MTB/RIF Ultra - обладает пределом обнаружения 10 КОЕ/мл мокроты для *M.tuberculosis* H37Rv, однако, в одном из последних исследований было показано, что в то время как чувствительность картриджа Xpert Ultra выше чувствительности Xpert G4 на 10-15%, специфичность – значительно ниже, как по сравнению с технологией Xpert G4, так и по сравнению с люминесцентной микроскопией с окраской мазков аурамином [269].

Основными недостатками технологии являются высокая стоимость анализа, отсутствие возможности выявления НТМБ и то, что определение устойчивости к

рифампицину не дает возможности поставить точный диагноз туберкулёз с МЛУ ввиду встречаемости моноустойчивости к изониазиду, поэтому не отменяет необходимости проведения дополнительных тестов на устойчивость к изониазиду и ПТП II ряда.

Вместо гибридизационной ПЦР-системы Cobas Amplicor MTB, описанной выше, для сокращения времени анализа компания Roche Diagnostics разработала тест-систему для выявления МБТК из диагностического респираторного материала, основанную на ПЦР-РВ, Cobas TaqMan MTB. В качестве мишени для выявления МБТК выступает участок гена, кодирующего 16S рРНК [162, 195]. В тест-системе используется один специфический зонд к ДНК *M.tuberculosis*, а также ДНК внутреннего контроля и зонд к ней для детекции возможного ингибирования и избежания ложноотрицательных результатов. К ПЦР-РВ тест-системе также был разработан набор для пробоподготовки и выделения ДНК. Реагенты адаптированы под использование с амплификатором Cobas TaqMan 48 Analyzer. Чувствительность системы составляет 75.8–85%, специфичность 98.1–99.4% [162, 195]. Её недостатками является возможность работы только с респираторным диагностическим материалом, высокая стоимость анализа, невозможность выявления НТМБ. В одном из исследований по оценке работы тест-системы на респираторном диагностическом материале были показаны ложноположительные результаты теста на ДНК *Mycobacterium gordonae* и *Mycobacterium sp.* [319].

Среди ПЦР-РВ тест-систем для диагностики туберкулёза в мире также распространена технология Abbott RealTime MTB Automated Assay, включающая реагент для предобработки диагностического материала и набор реагентов для выделения ДНК, которое выполняют с помощью роботизированной раскапывающей станции закрытого типа Abbott m2000sp с максимальной загрузкой 96 образцов. Для выявления МБТК используется две мишени: фрагмент мультикопийной вставки IS6110 и фрагмент гена *PAB*, кодирующего антиген 38 кДа [100]. Для контроля выделения и ингибирования ПЦР в наборе использована плазмидная ДНК. Чувствительность анализа составляет по литературным данным

81–97%, специфичность - 97%. Предел обнаружения *M.tuberculosis* H37Rv в образцах мокроты составляет 17 КОЕ/мл [281]. Технология не зарегистрирована для использования в медицинских учреждениях РФ. Также как системы MTB/Rif и Cobas TaqMan MTB Abbott RealTime MTB Automated Assay не позволяет детектировать НТМБ.

Тест-система Abbott RealTime MTB Automated Assay имеет отечественный аналог, технологию Амплитуб (НПФ “Синтол”, Москва). Это комплект реагентов, включающий реагент для предобработки диагностического материала, набор реагентов для выделения ДНК, имеющий модификации для ручного выделения и выделения на автоматизированной раскапывающей станции Тесап (Швейцария) с пропускной способностью 96 образцов, и набор для выявления МБТК с помощью ПЦР-РВ. Мишенями для выявления МБТК служат фрагмент инсерции IS6110 и однокопийного гена RegX3. Однокопийный ген используется для количественного определения ДНК МБТК в анализируемом образце. В качестве внутреннего контроля выделения и ингибирования используется плазмидная ДНК. Аналитическая чувствительность для ДНК *M.tuberculosis* H37Rv составляет 100 КОЕ/мл мокроты.

Технология Амплитуб зарегистрирована в государственном реестре медицинских изделий РФ и широко применяется для выявления МБТК на территории РФ [4, 12, 46, 52].

Для выявления МБТК методом ПЦР-РВ на территории РФ также зарегистрирован набор “АмплиСенс® МТС-FL” (ИнтерЛабСервис, Москва) и адаптированные для работы с ним наборы для выделения ДНК из различного материала НР “Рибо-преп”, “ДНК-Сорб-В” и “ДНК-Сорб-С” (ИнтерЛабСервис, Москва). Мишенью для детекции ДНК МБТК является участок инсерции IS6110, для контроля ингибирования ПЦР используется плазмидная ДНК. Определение количества ДНК МБТК в образце невозможно. Аналитическая чувствительность ПЦР-РВ для ДНК *M.tuberculosis* H37Rv составляет от 100 до 1000 КОЕ/мл в зависимости от материала для выделения.

Еще один набор отечественного производства для выявления ДНК МБТ

методом ПЦР-РВ, зарегистрированный, как медицинское изделие - набор реагентов “МИКО-ГЕН” (ДНК-технология, Москва) для выявления ДНК *M.tuberculosis* и *M.bovis* и их дифференциации с адаптированными к нему реагентами для выделения ДНК Проба-НК, Проба-ГС, Проба-РАПИД.

Все описанные коммерческие тест-системы на основе ПЦР-РВ обладают достаточно высокой чувствительностью и специфичностью к ДНК МБТК и обеспечивают возможность быстрого выявления МБТК, однако, существенным их недостатком является отсутствие возможности выявления НТМБ, т.к. показано, что как в странах с высоким бременем туберкулёза, так и в развитых странах, частота встречаемости НТМБ увеличивается [106, 146, 252, 318], например, в Африке 4-15% [264], в Корее – 10% [106] больных с подозрением на туберкулез, поражены НТМБ. В отчете ВОЗ 2016 года было отмечено, что в 2014 году только для 57% больных, получавших противотуберкулёзную терапию, диагноз был подтверждён культуральными методами, остальные 43% были ВИЧ-положительные больные, отрицательные на МБТ по результатам теста Xpert TB/Rif и дети с олигобациллярной формой заболевания [309]. Ложный диагноз туберкулёз в случае микобактериоза приводит к длительному, дорогостоящему и неэффективному лечению больных, отдельную проблему составляют случаи смешанной инфекции МБТ/НТМБ [147, 164, 320]. Это обуславливает необходимость создания тест-систем для быстрого одновременного выявления ДНК МБТ и НТМБ, которая становится очевидна всё большему количеству исследователей [264].

На сегодняшний день существует несколько корейских тест-систем, основанных на технологии ПЦР-РВ для одновременного выявления ДНК НТМБ и МБТ в диагностическом материале от больных. В тест-системе Advansure TB/NTM (LG Life Sciences, Корея) для выявления ДНК МБТ используют участок многокопийной вставки IS6110, а для выявления ДНК представителей рода *Mycobacterium* - участок гена *rpoB*, который присутствует как у МБТ, так и у НТМБ, так же в состав реакционной смеси входит ВПК и специфические праймеры и зонд к нему. Эти специфические участки ДНК детектируют по двум

разным каналам. МБТ или коинфекция МБТ и НТМБ выдаётся в зависимости от разницы пороговых циклов (Ct) реакций по этим каналам. Если Ct по каналу детекции IS6110 меньше порогового цикла канала детекции *rpoB* – выдают МБТ, если разница этих пороговых циклов больше или равна нулю – выдают коинфекцию МБТ и НТМБ [106]. Такая интерпретация данных не позволяет надёжно выявлять коинфекцию МБТ/НТМБ, т.к. для этого необходимо использовать строго специфичные для МБТ и НТМБ фрагменты генома. Тест-система зарегистрирована для использования на территории Кореи. Опубликовано несколько исследований по её испытаниям, в которых проводили оценку специфичности и чувствительности метода по сравнению с микроскопией на КУМ и посевами на жидкие и плотные питательные среды [105, 106, 245]. По результатам исследований чувствительность тест-системы к ДНК микобактерий по сравнению с культуральным методом составляет 67.8% - 85%, специфичность – 96,2 - 98,3%. Отдельно чувствительность и специфичность к ДНК МБТ и ДНК НТМБ для системы Advansure TB/NTM (LG Life Sciences, Корея) были оценены в работе Хо и соавторов по её сравнению другой корейской с ПЦР-РВ тест-системой для одновременного выявления МБТ и НТМБ в диагностическом материале от больных - Anyplex plus MTB/NTM (Seegene, Корея). Чувствительность и специфичность составили соответственно 78,1% и 93,9% для ДНК *M.tuberculosis* и 51.7% и 97.9% для ДНК НТМБ [106]. Вторая тест-система, представленная в этой статье, не отличается по принципу исполнения от Advansure TB/NTM, разница заключается в использованных для детекции МБТ и НТМБ ДНК-мишенях. Для детекции организмов, принадлежащих к роду *Mycobacterium*, разработчики Anyplex plus MTB/NTM использовали участок гена, кодирующего 16S рРНК, для детекции ДНК МБТ – участки инсерции IS6110 и гена *mpb64*. В работе по сравнению с Advansure TB/NTM была показана 71.0% чувствительность и 94.9% специфичность Anyplex plus MTB/NTM к ДНК *M.tuberculosis* и 33.3% чувствительность и 98.4% специфичность к ДНК НТМБ [106]. Стоит отметить, что разработка этой тест-системы направлена, в первую очередь, на возможность замены ею микроскопии мазков на КУМ и

гибридизационной технологии выявления и определения ЛЧ MTBDRplus (v1.0) (Hain lifescience, Германия) [247], о которой пойдёт речь ниже, а дальнейшее усовершенствование (модификация Anyplex plus MTB/NTM MDR-TB) с добавлением реакции на выявление ЛЧ *M.tuberculosis* к рифампицину и изониазиду – на создание альтернативы технологии [261]. Чувствительность и специфичность Anyplex plus MTB/NTM MDR-TB составляет 86,4% и 99% соответственно для ДНК микобактерий [261].

Необходимо отметить, что дизайн тест-систем Anyplex plus MTB/NTM и Anyplex plus MTB/NTM MDR-TB не позволяет выявлять коинфекцию НТМБ и МБТК, что является важной задачей, т.к. наличие у пациента ко-инфекции усложняет диагностику и назначение эффективной терапии [74, 147, 168].

Молекулярно-генетические методы видовой идентификации НТМБ

Для назначения адекватного режима химиотерапии при выявлении у пациента НТМБ, как и в случае выявления МБТ, необходимо установить её видовую принадлежность. До выделения культуры и её видовой идентификации пациенты, как правило, получают противотуберкулезную химиотерапию. Эффективность лечения микобактериоза ПТП значительно отличается в зависимости от вида микобактерии. Так, высокую эффективность ПТП отмечают в отношении *M. kansasii*, тогда как для заболеваний, вызванных быстрорастущими НТМБ, необходимо использование антибактериальных препаратов, например, макролидов, аминогликозидов и др. [29, 37, 156]. Показана чувствительность МАС, *M.gordonaе*, *M.kansasii*, *M.хенорі* к рифабутину [6]. Значительно отличается спектр антибактериальных препаратов, применяемых для лечения медленно-растущих и быстрорастущих НТМБ и их лекарственная чувствительность к ним [297].

До начала эры ПЦР-диагностики идентифицировать НТМБ до вида было возможно только с помощью биохимических тестов с предварительным получением культуры микобактерий. С развитием молекулярно-генетических методов диагностики появилось множество домашних и коммерческих тест-систем, позволяющих быстро определять вид клинически значимых НТМБ, как в

образцах культур [87, 116, 161, 177, 256, 272, 298, 303], так и в образцах диагностического материала [166, 270, 317]. Основными мишенями для видовой идентификации НТМБ служат участки генов: *hsp65* [29, 87, 116, 125, 177, 237, 298], *rpoB* [64, 194, 273], *sodA* [64], ген, кодирующий 16S рРНК [64, 258], внутренний транскрибируемый спейсер 16S-23S рРНК [222, 270], *rnpB* [61], *groES*. Однако, они недоступны в России.

Один из первых методов видовой идентификации НТМБ - метод прямого секвенирования по Сенгеру гена, кодирующего 16S рРНК [258]. Этот метод используют до сих пор в качестве золотого стандарта, несмотря на то, что с его помощью можно дифференцировать не все виды НТМБ, например, нельзя разделить некоторые штаммы *M.kansasii* от *M.gastri* [153]. Однако ввести его в рутинную практику клинической лаборатории крайне сложно, т.к. для его использования необходимы дорогостоящее оборудование, реагенты, дополнительное помещение и квалифицированный персонал.

Одним из популярных методов видовой идентификации НТМБ на основе ПЦР является метод полиморфизма длин рестриктных фрагментов (ПДРФ). Он основан на выборе последовательности, фланкируемой по краям консервативными областями, но достаточно вариабельной внутри для того, чтобы после обработки несколькими рестриктазами, полученный в результате ПЦР продукт был разрезан на фрагменты, длина которых уникальна для каждого из идентифицируемых видов НТМБ и видимо отличается от других при анализе на геле-электрофорезе. Тест-системы, основанные на этом методе, домашние и преимущественно использовались в лабораторной практике до появления более совершенных коммерческих методов идентификации НТМБ, однако, ПДРФ используется до сих пор в некоторых странах с низким уровнем дохода, где лаборатории плохо оснащены современным дорогостоящим оборудованием и нет возможности использовать для массового скрининга дорогостоящие коммерческие тест-системы [237]. Первая работа, в которой был применён метод ПДРФ для видовой идентификации НТМБ и дифференциации их от МБТ, вышла в 1992 году. Авторы выбрали НТМБ, наиболее часто встречаемые в клинике в

США. Тест-система была предназначена для работы с ДНК, выделенной из культур микобактерий и основана на амплификации и дальнейшей рестрикции фрагмента гена *hsp65*. Она позволяла идентифицировать *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* и *M. gordonae* и дифференцировать их от *M. tuberculosis* и *M. bovis* [251]. В 1993 году Telenti и соавторы усовершенствовали этот метод, введя в протокол дополнительную рестриктазу. Была показана возможность идентификации 18 видов НТМБ, полученных из культур с жидких и плотных питательных сред, однако, некоторые из них давали после обработки рестриктазами фрагменты с несколькими вариантами длины, что усложняло итоговый анализ [283]. На протяжении нескольких последующих лет многие исследователи разрабатывали для нужд своих лабораторий наиболее удобный алгоритм ПДРФ, варьируя амплифицируемый участок гена *hsp65* и меняя набор идентифицируемых видов НТМБ [29, 87, 116, 125, 298], автоматизируя метод за счет разработки системы для фрагментного анализа на установке для капиллярного электрофореза [157], адаптируя метод для использования на ДНК, выделенной непосредственно из клинического материала БК+ больных [317]. Также разрабатывали ПДРФ системы на основе рестрикции фрагментов генов *rpoB* [194, 273] и *tuf* [272].

Метод ПДРФ для видовой идентификации проще внедрить в лабораторную практику, чем метод секвенирования по Сенгеру, однако, он имеет ряд существенных недостатков. Разные штаммы одного и того же вида могут иметь несколько разных паттернов рестриктных фрагментов, кроме того ввиду мутаций могут возникать новые паттерны, поэтому методику сложно стандартизировать. После проведения ПЦР требуется постановка реакции рестрикции и анализ её продуктов гель-электрофорезом, для которого требуется выделять отдельное помещение. ПДРФ, как многостадийный метод, предполагает большое число ручных манипуляций, в ходе которых высок риск ошибки оператора и контаминации. Общее время анализа составляет около 7-8 часов, что больше одного рабочего дня в лаборатории противотуберкулёзной службы РФ.

Было разработано несколько ПЦР-РВ систем для идентификации НТМБ до

вида, основанных на технологии плавления продуктов реакции с высоким разрешением (HRM, high resolution melting) в присутствии флуоресцентного интеркалирующего красителя либо флуоресцентных гибридизационных зондов, комплементарных участкам продуктов реакции. Эта методика позволяет в режиме реального времени без нанесения продуктов ПЦР на гель-электрофорез, определять температуру плавления ампликонов, либо гибридизационных комплексов, образуемых зондами с одной из цепей продуктов реакции [99, 161, 246, 256]. Праймеры подбирают таким образом, чтобы температура плавления ампликонов для разных видов НТМБ отличалась. Дизайн первой тест-системы, основанной на этой технологии, предполагал возможность идентифицировать *M.tuberculosis*, *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.mucogenicum* и, без определения до вида, группу *M.chelonae-M.abscessus* (*M. chelonae*, *M. abscessus* и *M. immunogenum*) и группу *M.fortuitum*, к которой относятся *M. fortuitum*, *M. senegalense*, *M. farcinogenes*, *M. porcinum*, *M. septicum*, *M. peregrinum* и *M. alvei*. Для идентификации *M.mucogenicum*, групп *M.chelonae-M.abscessus* и *M.fortuitum* в качестве мишени использовали участок гена, кодирующего 16S рРНК, для идентификации *M.avium* - участок видоспецифичной вставочной последовательности *IS1311*, для идентификации *M.intracellulare* – видоспецифичный участок гена *DT1*. В ходе работы было показано, что *DT1* является нестабильной мишенью для идентификации *M.intracellulare* методом HRM и даёт ложноположительные результаты на *M.avium*, также ложноположительные результаты были получены для системы праймеров, обладавших специфичностью к группе *M.fortuitum* [256]. Опубликованная в 2011 году трёхканальная HRM ПЦР-система была основана на амплификации и гибридизации со специфическими зондами участков гена *hsp65*, консервативного участка гена, кодирующего 16S рРНК и гипервариабельного участка А этого же гена и позволяла дифференцировать МБТ от НТМБ и идентифицировать до вида *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.abscessus*, *M.chelonae*, *M.mageritense*, *M.xenopi*, *M.lentiflavum* и *M.szulgai*. Однако, итоговые границы диапазона разбросов температур плавления, по которым идёт определение до вида, были очень близки

для многих видов, например, верхняя граница для *M.intracellulare* – 54,47, нижняя для *M.avium* – 55,5, а для некоторых видов – перекрывались (*M.peregrinum*: 55.71–57.53, *M.mucogenicum*: 56.04–60.34) [161]. В 2017 году была опубликована HRM-ПЦР-РВ тест-система, достоверно идентифицирующая 14 клинически значимых видов НТМБ: *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. gordonae*, *M. kasasii*, *M. marinum*, *M. parascrofulaceum*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. mucogenicum*, *M. neoaurum* и *M. smegmatis*, основанная на определении температуры плавления специфических участков генов *hsp65* и 16S рРНК [99]. Основными недостатками этой системы является отсутствие возможности детекции *M.tuberculosis* и очень маленькая разница температур плавления для представителей разных видов НТМБ (минимальная разница – 0,2С), которая ограничивает спектр приборов для ПЦР-РВ, на которых можно производить анализ с использованием этой технологии.

Необходимо отметить, что использование технологии ПЦР-РВ с последующим плавлением с высоким разрешением для видовой идентификации НТМБ имеет ряд недостатков. Температура плавления ампликонов или гибридных комплексов ДНК-зонд может значительно отличаться в зависимости от используемого амплификатора; пересечение диапазонов определяемых температур плавления для разных видов НТМБ будет приводить к неверной идентификации; вариант HRM-дизайна, при котором температуры плавления для разных видов НТМБ отличаются на десятые доли градусов может быть использован только на амплификаторах, оснащенных дополнительно программой для проведения HRM, предусмотренной не для всех существующих на рынке, особенно российском, приборов. Ввиду перечисленных причин затруднена и автоматизация анализа результатов реакции. Внедрение ПЦР-РВ с HRM в рутинную лабораторную практику с большим потоком анализов затруднительно.

Технология биологических чипов также нашла применение в области идентификации НТМБ до вида. В институте молекулярной биологии им. Энгельгарта была предпринята попытка разработки биочипа для видовой идентификации НТМБ в образцах ДНК, полученных из культур, с

использованием в качестве мишени участка гена *gyrB*. Была заявлена возможность идентифицировать 35 видов микобактерий, в числе которых *M.tuberculosis* и *M.bovis*. 27 из этих видов были получены из клинического материала от пациентов, возможность определения остальных 8 была подтверждена гибридизацией на чипах синтетических фрагментов ДНК с последовательностями *gyrB* соответствующими последовательностям, размещённым в GenBank NCBI. При этом виды микобактерий, представленные в исследовании наибольшим количеством штаммов от разных пациентов, дали более одного паттерна расположения гибридизационных пятен на чипах ввиду внутривидовой вариабельности гена *gyrB* *M. intracellulare*, *M. avium*, *M. gordonae*, *M. lentiflavum*, *M. fortuitum*, *M. septicum*/*M. peregrinum*, *M. flavescens*, *M. abscessus*. Необходимо отметить, что некоторые виды НТМБ были представлены в исследовании 1-2 штаммами [324]. Можно предположить, что методика отработана лишь для тех видов, для которых была изучена внутривидовая вариабельность. Технология не была зарегистрирована в РФ. Гибридизационные ДНК-чипы, разработанные ранее другими исследователями, были предназначены для определения меньшего количества видов НТМБ [244, 321]. Так, чип разработанный Fukushima и др., с использованием того же гена *gyrB* в качестве мишени, определял *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* и 11 видов НТМБ: *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. asiaticum*, *M. gastri*, *M. malmoense*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. simiae*, *M. szulgai*, [136].

Технология ДНК-микрочипов представляет собой гораздо более быстрый метод определения видов НТМБ, чем биохимические тесты, и в ряде случаев позволяет работать не только с ДНК, выделенной из культуры, но и с ДНК, выделенной из образцов диагностического материала [321, 324], однако, имеет ряд недостатков. В чипах, основанных на последовательности гена *gyrB*, для определения видов НТМБ используется более одного зонда для каждого вида, что увеличивает возможность ошибочной интерпретации результатов анализа при возникновении у клинического штамма мутаций в одном из

комплементарных зондам регионов [136, 324]. Возникновение новых мутаций у клинического штамма приведёт к возникновению нового паттерна на микрочипе или к нарушению гибридизации, что может привести к невозможности определения вида или ложноотрицательному результату (если чип используется одновременно и для выявления, и для видовой идентификации НТМБ). Постановка анализа с использованием этой методики подразумевает большое количество ручных манипуляций: постановка ПЦР, гибридизация наработанных в ходе ПЦР ампликонов с зондами на чипе, несколько отмывок, что увеличивает вероятность ошибки и делает анализ продолжительным. Кроме того, сложно автоматизировать анализ получаемых изображений, т.к. генетическая вариабельности клинических штаммов микроорганизмов может влиять на интенсивность сигнала флуоресценции и образующиеся на чипе специфические паттерны.

Одной из самых популярных и коммерчески успешных в мире технологий видовой идентификации НТМБ и МБТК является гибридизационная технология, основанная на обратной гибридизации продуктов амплификации ДНК со специфическими ДНК-зондами, комплементарными известным уникальным участкам генома микобактерий, нанесёнными на твёрдый носитель – ДНК-стрипы [193, 240]. Эта технология представлена на международном рынке двумя торговыми марками: INNO-LiPA-Mycobacteria (Innogenetics, Ghent, Бельгия) и GenoType Mycobacterium (Hain Lifescience, Nehren, Germany). Авторы технологии INNO-LiPA использовали в качестве мишени фрагмент внутреннего транскрибируемого спейсера 16S-23S рРНК, а разработчики компании Hain lifescience – ген, кодирующий 23S рРНК. Тест Inno-LiPA-Mycobacteria предназначен для анализа ДНК, выделенной из культур микобактерий. У тест-системы GenoType Mycobacterium есть вариант исполнения, адаптированный для работы с образцами, выделенными из клинического материала, GenoType CMdirect однако, чувствительность этого теста к ДНК некоторых видов НТМБ составляет не более 50 000 КОЕ/мл, а к ДНК МБТК – не более 1500 КОЕ/мл

[140]. Также показана ограниченная специфичность технологии GenoType Mycobacterium CM/AS в отношении определения видов НТМБ (89% в сравнении с методом секвенирования по Сенгеру), которая обусловлена внутривидовой гетерогенностью микобактерий в области посадки гибридизационных зондов, приводящей в ряде случаев к получению ложно-отрицательных результатов [263]. Главным недостатком гибридизационной технологии является длительность продолжительности анализа (6-7 часов), большое количество ручных манипуляций и ограниченная чувствительность, не позволяющая работать с диагностическим материалом в большинстве случаев.

Genotype CM/AS (Hain lifescience, Германия) являются единственными зарегистрированными в России молекулярно-генетическими тестами для видовой идентификации НТМБ. Более того это единственный доступный тест, позволяющий идентифицировать отрицательную на МБТК культуру, а в ряде случаев БК+ диагностический образец, как НТМБ.

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ) и времяпролётная масс-спектрометрия (MALDI-TOF)

Метод ВЭЖХ был предложен для видовой идентификации НТМБ в 1986 году [90]. В его основе лежит изучение состава миколовых кислот клеточной стенки микобактерий по получаемым хроматографическим профилям и их сравнение с профилями жирных кислот микобактерий, принадлежащих к различным видам, собранными в специализированной базе данных. Преимуществом метода ВЭЖХ является возможность получения результата видовой идентификации НТМБ в течение 24 часов [29], недостатки метода - высокая стоимость оборудования и расходных материалов к нему, трудоёмкость пробоподготовки образцов к анализу.

Видовая идентификация НТМБ методом времяпролётной масс-спектрометрии основана на сравнении масс-спектров белков клеточной стенки анализируемых микобактерий с масс-спектрами белков клеточных стенок микобактерий известных видов, представленных в специализированных базах

данных. Особенного внимания заслуживают масс-спектрометры и ПО компании Bruker, разработавшей оптимизированный протокол идентификации НТМБ. В базе данных Bruker содержатся спектры для 159 видов НТМБ с учетом особенностей белкового состава микобактерий, выращенных на плотных и жидких питательных средах [26]. Достоинством метода является высокая скорость анализа - результаты идентификации можно получить в течение 1 дня – и высокая специфичность анализа [98, 274]. Недостатки – необходимость закупки дорогостоящего оборудования, сложного в обслуживании, отсутствие возможности анализа клинического материала от больных.

Таким образом, существующие на сегодняшний день наборы реагентов, основанные на молекулярно-генетических методах исследования, предназначенные для выявления и идентификации НТМБ, имеют те или иные ограничения: невозможно выявление НТМБ и МБТК одним и тем же набором (выявляет либо НТМБ, либо МБТК); невозможно выявить смесь НТМБ и МБТК в одном диагностическом образце; работа с набором реагентов предполагает большое количество манипуляций и предполагает длительный протокол исследования; чувствительность и/или специфичность метода недостаточны для работы с образцами клинического материала. Все это подразумевает необходимость продолжения научных работ по созданию диагностикумов, основанных на ПЦР-РВ для выявления и идентификации до вида МБТ и НТМБ.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

ГЛАВА 2. Разработка тест-системы ПЦР-РВ(д) на основе ПЦР-РВ для одновременного выявления ДНК МБТК и НТМБ в одном образце диагностического материала/культуры

2.1 Разработка праймеров и Taq-Man зондов для выявления НТМБ и их дифференциации от МБТК

Использование в диагностике технологии ПЦР-РВ позволяет проводить анализ на выявление возбудителя в течение 1 ч – 1 ч 40 мин с момента выделения ДНК. Такой анализ не предполагает дополнительных манипуляций с продуктами амплификации по окончании ПЦР, что снижает риск возникновения контаминации, трудозатраты оператора и риск возникновения ошибок, связанных с человеческим фактором. Зарубежными исследователями уже были предприняты успешные попытки создания тест-систем, в том числе и коммерческих, для выявления МБТК и НТМБ и их дифференциации, основанных на ПЦР-РВ, не позволяющих, однако, проводить одновременное выявление возбудителей в одной пробирке ввиду выбора слишком консервативных мишеней для дизайна праймеров и зондов [61, 247, 261].

Основой для создания тест-системы ПЦР-РВ(д) с согласия производителя послужил набор реагентов “Амплитуб-РВ-Скрин” (НПФ «Синтол», Россия) для быстрого выявления микобактерий туберкулезного комплекса методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени (регистрационное удостоверение № ФСР 2010/07635 от 6 мая 2010 года). Регистрация ДНК МБТК в пробе с помощью этого набора реагентов осуществляется по двум каналам флуоресценции — FAM (амплификация участка многокопийной вставки IS6110 МБТК) и ROX (амплификация участка однокопийного гена *tbchp* МБТ), по каналу R6G регистрируют амплификацию внутреннего положительного контроля. В качестве внутреннего контроля в состав реакционной смеси добавлена плазмидная ДНК. Т.к. все современные амплификаторы, оснащённые оптической системой для проведения ПЦР-РВ, позволяют проводить детекцию

флуоресценции минимум по четырём каналам, исходный дизайн набора реагентов «Амплитуб-РВ-Скрин» позволяет добавить возможность детекции ещё одного возбудителя по каналу Cy5.

Для подбора праймеров и зондов, дифференцирующих НТМБ от МБТК, была выбрана консервативная область гена *metH*, не использовавшегося ранее для выявления микобактерий. Кодированный им белок 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*. Фрагмент этого гена ранее использовался в качестве филогенетического маркера и мишени для видовой идентификации в пределах рода *Mycobacterium* с использованием классической ПЦР и последующим ПДРФ [218, 272]. Было проведено выравнивание полных нуклеотидных последовательностей гена *metH* для геномов НТМБ, содержащих его, которые были выложены в базу данных Genome NCBI на момент проведения исследования и представлены следующими видами: *M.abscessus*, *M.chelonae*, *M.avium* subs. *avium*, *M. avium* sbs. *paratuberculosis*, *M.intracellulare*, *M. smegmatis*, *M.marinum*, *M.neoaurum*, *M.parascrofulaceum*, *M.simiae*. Выравнивание полных нуклеотидных последовательностей гена *tuf* было выполнено для *M.gastri*, *M.kansasii*, *M.malmoense*, *M.xenopi*.

На основе полученных выравниваний были подобраны праймеры для секвенирования фрагментов генов *metH* и *tuf*, MeSy902_F 5'-CCTGCCCAACGCCTTCGGCGA-3' - прямой праймер; MeSy1420_R 5'-GAGATCGAGTTGACGATCGGCTTGCC-3' - обратный праймер – для *meth*. Tuf_F_153 5'-CTCGTCGAGATGGAGGTCC-3' - прямой праймер; Tuf_R_640 5'-ATGTAAACCTGGCCCTCGAA-3' - обратный праймер – для *tuf*. Нарботку ПЦР продуктов с подобранных праймеров для секвенирования проводили с использованием программ амплификации, представленных в таблице 4. Подготовка полученных фрагментов к секвенированию по Сенгеру описана в разделе «Материалы и методы исследования».

Таблица 4 – Программы амплификации для наработки специфических фрагментов локусов *metH* и *tuf* для последующего секвенирования по Сенгеру.

Название локуса	<i>metH</i>	<i>tuf</i>	Количество циклов
Активация фермента	95°C – 5 мин	95°C – 5 мин	1
Денатурация	95°C – 15 сек	95°C – 15 сек	35
Отжиг	62°C – 30 сек	60°C – 30 сек	
Элонгация	72°C – 30 сек	72°C – 30 сек	
Финальная элонгация	72°C -15 мин	72°C -15 мин	1

Для расшифровки последовательностей выбранных фрагментов геном *meth* и *tuf* штаммов НТМБ из коллекции ФГБНУ «ЦНИИТ» (Таблица 1) было проведено их прямое секвенирование с использованием подобранных праймеров. Расшифрованные нуклеотидные последовательности добавили в выравнивания полных нуклеотидных последовательностей генов *metH* и *tuf* НТМБ из базы данных NCBI. На основе полученных в результате выравниваний, включающих последовательности штаммов из базы данных NCBI и коллекционных штаммов ФГБНУ «ЦНИИТ», были подобраны праймеры и Taq-Man зонды, позволяющие проводить специфическую амплификацию участка гена *metH* *M.avium*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M.fortuitum*, *M.peregrinum*, *M.gordoniae*, *M.intracellulare*, *M.interjectum*, *M.mucogenicum*, *M.nonchromogenicum*, *M.scrofulaceum*, *M.simiae*, *M.smegmatis*, *M.szulgai* и участков гена *tuf* *M.gastri*, *M. kansasii*, *M.xenopi* и *M.malmoense*. Фрагменты выравниваний, содержащие области посадки подобранных праймеров и Taq-Man зондов, представлены на рисунках 2 и 3.

	Tuf_up	Tuf_Pb_1up	Tuf_low1
<i>M.gastri_CTR1</i>	A C C G A C A A G C C G T T C C T G	G T C G A G G A C G T C T T C A C C A T C A C C G	C A A C G A G G A A G T C G A G A T C G
<i>M.gastri_NCB1</i>	A C C G A C A A G C C G T T C C T G	G T C G A G G A C G T C T T C A C C A T C A C C G	C A A C G A G G A A G T C G A G A T C G
<i>M.gastri_NCB1</i>	A C C G A C A A G C C G T T C C T G	G T C G A G G A C G T C T T C A C C A T C A C C G	C A A C G A G G A A G T C G A G A T C G
<i>M.kansasii_CTR1</i>	A C C G A C A A G C C G T T C C T G	G T C G A G G A C G T C T T C A C C A T C A C C G	C A A C G A G G A A G T C G A G A T C G
<i>M.kansasii_NCB1</i>	A C C G A C A A G C C G T T C C T G	G T C G A G G A C G T C T T C A C C A T C A C C G	C A A C G A G G A A G T C G A G A T C G
<i>M.kansasii_NCB1</i>	A C C G A C A A G C C G T T C C T G	G T C G A G G A C G T C T T C A C C A T C A C C G	C A A C G A G G A A G T C G A G A T C G
<i>M.kansasii_NCB1</i>	A C C G A C A A G C C G T T C C T G	G T C G A G G A C G T C T T C A C C A T C A C C G	C A A C G A G G A A G T C G A G A T C G
<i>M.kansasii_NCB1</i>	A C C G A C A A G C C G T T C C T G	G T C G A G G A C G T C T T C A C C A T C A C C G	C A A C G A G G A A G T C G A G A T C G
<i>M.kansasii_NCB1</i>	A C C G A C A A G C C G T T C C T G	G T C G A G G A C G T C T T C A C C A T C A C C G	C A A C G A G G A A G T C G A G A T C G
<i>M.kansasii_NCB1</i>	A C C G A C A A G C C G T T C C T G	G T C G A G G A C G T C T T C A C C A T C A C C G	C A A C G A G G A A G T C G A G A T C G
<i>M.kansasii_NCB1</i>	A C C G A C A A G C C G T T C C T G	G T C G A G G A C G T C T T C A C C A T C A C C G	C A A C G A G G A A G T C G A G A T C G
<i>M.malmoense_CTR1</i>	A C C G A C A A G C C G T T C C T G	G T C G A G G A C G T C T T C A C C A T C A C C G	G A A C G A G G A A G T C G A G A T C G
<i>M.malmoense_NCB1</i>	A C C G A C A A G C C G T T C C T G	G T C G A G G A C G T C T T C A C C A T C A C C G	G A A C G A G G A A G T C G A G A T C G
<i>M.malmoense_NCB1</i>	A C C G A C A A G C C G T T C C T G	G T C G A G G A C G T C T T C A C C A T C A C C G	G A A C G A G G A A G T C G A G A T C G
<i>M.xenopi_CTR1</i>	A T C G A C A A G C C G T T C C T G	A T C G A A G A C G T G T T C A C C A T C A C C G	C A A C G A G G A A G T C G A G A T C G
<i>M.xenopi_NCB1</i>	A T C G A C A A G C C G T T C C T G	A T C G A A G A C G T G T T C A C C A T C A C C G	C A A C G A G G A A G T C G A G A T C G
<i>M.xenopi_NCB1</i>	A T C G A C A A G C C G T T C C T G	A T C G A A G A C G T G T T C A C C A T C A C C G	C A A C G A G G A A G T C G A G A T C G

Рисунок 2 - Выравнивание областей посадки праймеров и зондов, специфичных к участку гена *tuf*

	MeSy_up1,2	MeSy_Pb_C,T	MeSy_low
<i>M.abscessus_CTRI</i>	GAGCGCACCAACATCACC	CTGATCAAGGCCGAGGATACGACA	TCGACATCAACATGGACGAGG
<i>M.abscessus_NCBI</i>	GAGCGCACCAACATCACC	CTGATCAAGGCCGAGGATACGACA	TCGACATCAACATGGACGAGG
<i>M.abscessus_NCBI</i>	GAGCGCACCAACATCACC	CTGATCAAGGCCGAGGATACGACA	TCGACATCAACATGGACGAGG
<i>M.avium_CTRI</i>	GAGCGCACCAACATCACC	CTGATCAAGGCCGAGGATACGACA	TCGACATCAACATGGACGAGG
<i>M.avium_subs.paratuberculosis_NCBI</i>	GAGCGCACCAACATCACC	CTGATCAAGGCCGAGGATACGACA	TCGACATCAACATGGACGAGG
<i>M.avium_subs.avium_NCBI</i>	GAGCGCACCAACATCACC	CTGATCAAGGCCGAGGATACGACA	TCGACATCAACATGGACGAGG
<i>M.chelonae_CTRI</i>	GAGCGCACCAACATCACC	CTGATCAAGGCCGAGGATACGACA	TCGACATCAACATGGACGAGG
<i>M.chelonae_NCBI</i>	GAGCGCACCAACATCACC	CTGATCAAGGCCGAGGATACGACA	TCGACATCAACATGGACGAGG
<i>M.fortuitum_CTRI</i>	GAGCGCACCAACATCACC	CTGATCAAGGCCGAGGATACGACA	TCGACATCAACATGGACGAGG
<i>M.fortuitum_subs.fortuitum_NCBI</i>	GAGCGCACCAACATCACC	CTGATCAAGGCCGAGGATACGACA	TCGACATCAACATGGACGAGG
<i>M.gordoniae_CTRI</i>	GAGCGCACCAACATCACC	CTGATCAAGGCCGAGGATACGACA	TCGACATCAACATGGACGAGG
<i>M.interjectum_CTRI</i>	GAGCGCACCAACATCACC	CTGATCAAGGCCGAGGATACGACA	TCGACATCAACATGGACGAGG
<i>M.intracellulare_CTRI</i>	GAGCGCACCAACATCACC	CTGATCAAGGCCGAGGATACGACA	TCGACATCAACATGGACGAGG
<i>M.intracellulare_NCBI</i>	GAGCGCACCAACATCACC	CTGATCAAGGCCGAGGATACGACA	TCGACATCAACATGGACGAGG
<i>M.marinum_NCBI</i>	GAGCGCACCAACATCACC	CTGATCAAGGCCGAGGATACGACA	TCGACATCAACATGGACGAGG
<i>M.mucogenicum_CTRI</i>	GAGCGCACCAACATCACC	CTGATCAAGGCCGAGGATACGACA	TCGACATCAACATGGACGAGG
<i>M.neaaurum_NCBI</i>	GAGCGCACCAACATCACC	CTGATCAAGGCCGAGGATACGACA	TCGACATCAACATGGACGAGG
<i>M.nonchromogenicum_CTRI</i>	GAGCGCACCAACATCACC	CTGATCAAGGCCGAGGATACGACA	TCGACATCAACATGGACGAGG
<i>M.parascrofulaceum_NCBI</i>	GAGCGCACCAACATCACC	CTGATCAAGGCCGAGGATACGACA	TCGACATCAACATGGACGAGG
<i>M.peregrinum_CTRI</i>	GAGCGCACCAACATCACC	CTGATCAAGGCCGAGGATACGACA	TCGACATCAACATGGACGAGG
<i>M.scrofulaceum_CTRI</i>	GAGCGCACCAACATCACC	CTGATCAAGGCCGAGGATACGACA	TCGACATCAACATGGACGAGG
<i>M.simiae_CTRI</i>	GAGCGCACCAACATCACC	CTGATCAAGGCCGAGGATACGACA	TCGACATCAACATGGACGAGG
<i>M.simiae_NCBI</i>	GAGCGCACCAACATCACC	CTGATCAAGGCCGAGGATACGACA	TCGACATCAACATGGACGAGG
<i>M.smegmatis_CTRI</i>	GAGCGCACCAACATCACC	CTGATCAAGGCCGAGGATACGACA	TCGACATCAACATGGACGAGG
<i>M.smegmatis_NCBI</i>	GAGCGCACCAACATCACC	CTGATCAAGGCCGAGGATACGACA	TCGACATCAACATGGACGAGG
<i>M.szulgai_CTRI</i>	GAGCGCACCAACATCACC	CTGATCAAGGCCGAGGATACGACA	TCGACATCAACATGGACGAGG

Рисунок 3 - Выравнивание областей посадки праймеров и зондов, специфичных к участку гена *metH*

Характеристики подобранных праймеров и Taq-Map зондов, предназначенных для выявления НТМБ и их дифференциации от МБТК представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Результат подбора праймеров и Taq-Map зондов для выявления НТМБ и их дифференциации от МБТК

Название	Последовательность 5'-3'	Tm	Количество в 25 мкл РС, pmol	Координаты нуклеотидов на референсном геноме <i>M.smegmatis</i> NC_008596.1
Праймеры и зонды, детектирующие специфический участок гена <i>metH</i>				
MeSy_up1	gagcgcaccaacatcacgg	61,6	4	4263878 - 4263896
MeSy_up2	gagcgcaccaacatcacgg	61,6	2	4263878 - 4263896
MeSy_low	cctcgtccatgttgatgtcga	61,2	6	4263764 - 4263784
MeSy_Pb_C	Cy5-ctgatcaaggccgaggactacgacacc-BHQ2	72,7	2,5	4263879 - 4263905
MeSy_Pb_T	Cy5-ctgatcaaggccgaggattacgacacc-BHQ2	71,5	2,5	4263831 - 4263857
Праймеры и зонды, детектирующие специфический участок гена <i>tuf</i>				Координаты нуклеотидов на референсном геноме <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv NC_000962.3
Tuf_up	accgacaagccgttcctg	58,4	5	785442-785459
Tuf_low1	cgatctcgacctcctcgttg	62,5	5	785559-785540

Продолжение таблицы 5

Название	Последовательность 5'-3'	Tm	Количество в 25 мкл РС, pmol	Координаты нуклеотидов на референсном геноме <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv NC_000962.3
Праймеры и зонды, детектирующие специфический участок гена <i>tuf</i>				
Tuf_low2	tggtgctggcgcttgat	59,5	6	785585-785562
Tuf_Pb_1up	Cy5-atcgaagacgtgttcaccatcaccg-BHQ2	67,4	2,5	785466-785490
Tuf_Pb_2up	Cy5-tcttcacgatcaccggccgc-BHQ2	64,4	2,5	785476-785495

Праймеры и зонды были добавлены в реакционную смесь «Амплитуб-РВ-Скрин» в концентрациях, указанных в таблице 5. Все реакции с полученной смесью проводили в 25 мкл, содержащих 60 пмоль мультиплексированных 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) с использованием следующей программы: активация фермента - 95°C, 15 мин, далее 45 циклов: денатурация - 95°C – 15 сек, отжиг - 63°C - 45 сек с последующей детекцией флуоресценции.

Далее проводили оценку эффективности работы подобранных праймеров в присутствии компонентов реакционной смеси (РС) набора реагентов «Амплитуб-РВ-Скрин». Для этого были приготовлены серии из 6 последовательных разведений ДНК, выделенных из коллекционных штаммов ФГБНУ «ЦНИИТ» *M.avium* (CTRI-NTM-3), *M.kansasii* (CTRI-NTM-7), *M.malmoense* (CTRI-NTM-256), *M.xenorpi* (CTRI-NTM-14) (Таблица 1), содержащих 10⁵; 10⁴; 10³; 10²; 20 и 10 геном-эквивалентов (ГЭ). Для проведения эксперимента были выбраны именно эти виды НТМБ, т.к. они представляют четыре варианта нуклеотидных последовательностей в областях посадки подобранных праймеров и зондов согласно полученным выравниваниям нуклеотидных последовательностей фрагментов генов *metH* и *tuf*.

Каждое разведение было протестировано в 3х повторях. Характеристики

работы праймеров, специфичных к НТМБ, в составе РС набора реагентов «Амплитуб-РВ-Скрин» были рассчитаны автоматически с использованием ПО CFX Manager Software 3.0. (Таблица 6).

Таблица 6 – Характеристики работы праймеров, специфичных к четырем вариантам последовательностей ДНК НТМБ, в присутствии компонентов реакционной смеси набора реагентов «Амплитуб-РВ-Скрин»

Образец ДНК	<i>M.avium</i>		<i>M.kansasii</i>		<i>M.xenopi</i>		<i>M.malmoense</i>	
Стартовое количество ДНК, г-э	Ct	S	Ct	S	Ct	S	Ct	S
10 ⁵	22,09	0,07	22,83	0,18	22,33	0,12	22,49	0,16
10 ⁴	25,56	0,11	26,08	0,03	25,82	0,16	25,69	0,25
10 ³	28,93	0,23	29,6	0,17	29,39	0,09	29,08	0,14
10 ²	32,13	0,05	32,97	0,44	32,7	0,24	32,3	0,25
20	34,08	0,23	34,9	0,13	34,98	0,34	34,7	0,49
10	35,15	0,12	35,75	0,52	35,56	0,26	35,84	0,47
Название параметра	Значение параметра							
E, % (эффективность реакции)	103,5		102,5		98,8		99,8	
R ² (коэффициент корреляции)	0,998		0,997		0,997		0,997	
Slope	-3,241		-3,264		-3,351		-3,327	
y-intercept	39,069		39,981		39,237		39,058	

Значение коэффициента корреляции R² для всех реакций находилось в диапазоне 0.997–0.998 (Таблица 6), а эффективности реакции - 98,8 – 103,5%, в то время как рекомендуемое значение R² для проведения ПЦР для любых стартовых количеств ДНК для ≥ 0.980 , для эффективности – 90-110% [282].

Для оценки взаимного влияния амплификации фрагментов геномов НТМБ и МБТК в итоговой смеси проводили амплификацию образцов ДНК НТМБ и МБТК в одной пробирке. 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: 10⁶:10⁶; 10³:10⁶; 10²:10⁶; 10⁶:10 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» (Таблица 1). Амплификацию проводили на приборе CFX96 (Biorad, США) в двух повторах.

Разница средних пороговых циклов амплификации ΔC_t (каналы FAM, ROX, Cy5) для смешанных образцов и образцов ДНК МБТ и 4х видов НТМБ,

представлена в таблице 7. Разницу пороговых циклов определяли по формуле $\Delta Ct = Ct (NTM+MBT) - Ct (MB)$, где NTM+MBT — смешанный образец ДНК, MB — чистый образец ДНК НТМБ или МБТ. Для всех смешанных образцов ДНК был получен положительный результат ПЦР по каналам FAM, ROX, Cy5, R6G. Результаты для канала R6G не отображены в таблице, т.к. не отличаются от нормы, заявленной для набора реагентов «Амплитуб-РВ-Скрин» для ВПК согласно инструкции производителя (≤ 35).

Таблица 7 — Результаты исследования взаимного влияния амплификации фрагментов генома НТМБ и МБТК в одной пробирке

Образец/количество геном-эквивалентов в одной ПЦР			Результаты ПЦР		
			Среднее ΔCt	Среднее ΔCt	Среднее ΔCt
НТМБ		<i>M.tuberculosis</i> H37Rv	Cy5 (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 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 отсутствие составила от -0,4 до 0 циклов для канала ROX, по которому регистрировали амплификацию однокопийного участка генома МБТК (Таблица 7), что свидетельствует о том, что добавление

праймеров и зондов, специфичных к ДНК НТМБ, не повлияло на эффективность амплификации ДНК МБТК.

Пример обнаружения ДНК *M.avium* на фоне ДНК *M.tuberculosis* представлен на рисунке 4 Б, пример обнаружения ДНК *M.tuberculosis* на фоне *M.avium* представлен на рисунке 4 Г.

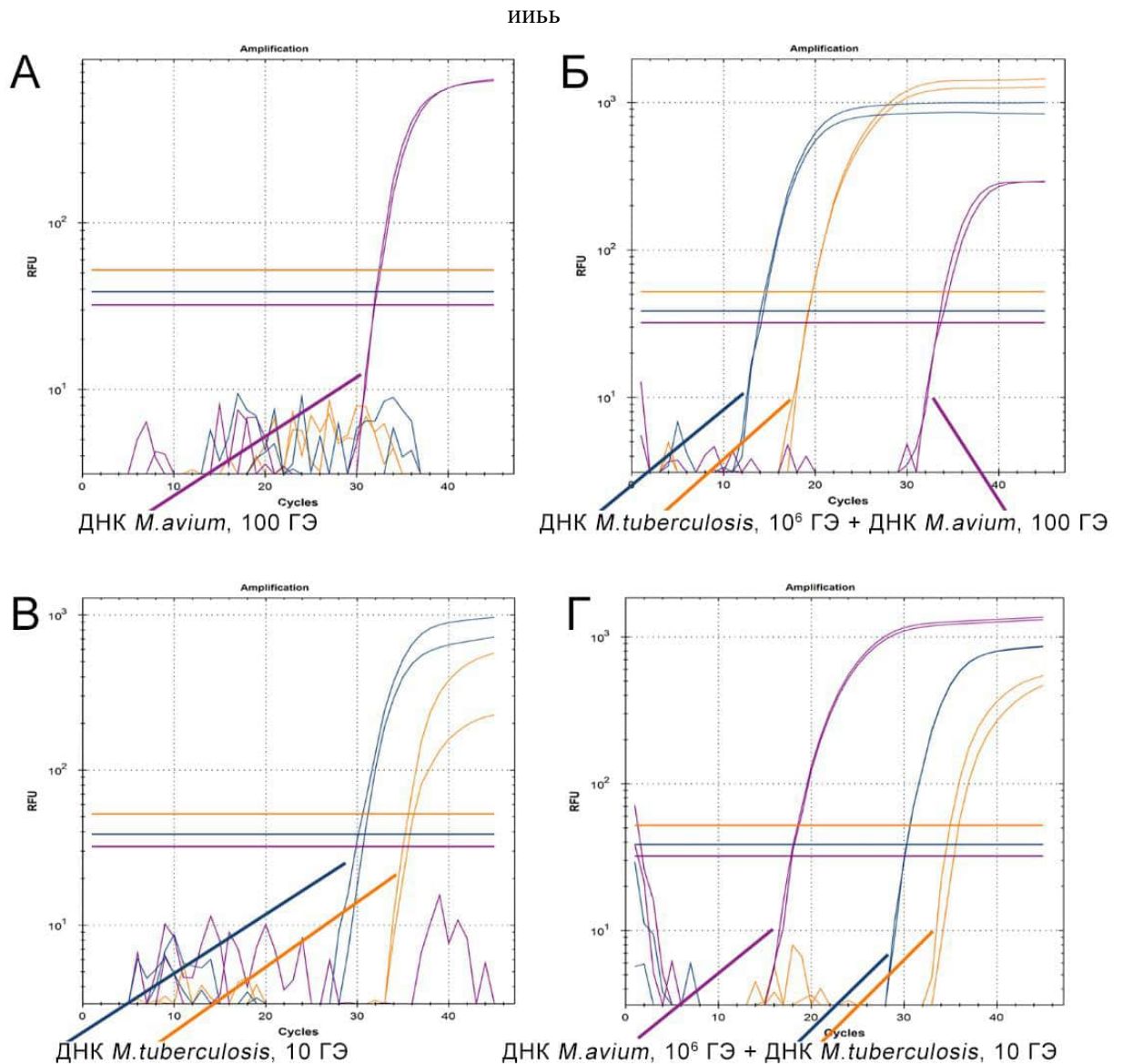


Рисунок 4 - Взаимное влияние амплификации специфических участков геномов НТМБ и МБТК на примере *M.avium* и *M.tuberculosis*

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*

Эффективность реакции амплификации ДНК НТМБ в смешанных образцах была ниже, чем в образцах, содержащих только ДНК НТМБ. Значение ΔC_t по каналу Cy5 для образцов, содержащих ДНК НТМБ, как в смеси с большим количеством ДНК *M.tuberculosis* H37Rv, так и без ее добавления, отличалось для НТМБ, принадлежащих к разным группам по нуклеотидной последовательности области посадки специфических праймеров. Для всех образцов ДНК НТМБ, использованных в эксперименте, кроме ДНК *M. malmoense*, значение ΔC_t по каналу Cy5 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 7). 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 7). 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, а 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 7).

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

Предварительную оценку аналитической специфичности и чувствительности модифицированной нами тест-системы проводили на штаммах микроорганизмов, представленных в Главе 2 «Материалы и методы исследования» (Таблица 1).

Все 18 штаммов НТМБ, 5 штаммов *M. tuberculosis*, 5 штаммов *M.bovis* BCG и 6 штаммов *M. bovis bovinus* были выявлены по специфичным для них каналам. Оценка тест-системы на 14 штаммах 14 видов микроорганизмов, не относящихся к роду *Mycobacterium*, показала 100% специфичность к ДНК МБТК и НТМБ. Результаты предварительной оценки специфичности и чувствительности представлены в таблице 8.

Таблица 8 – Результат предварительной оценки чувствительности и специфичности тест-системы для выявления НТМБ и МБТК

Группа образцов	Кол-во образцов	Результат ПЦР-РВ по каналам			
		FAM (МБТК)	ROX (МБТК)	Cy5 (НТМБ)	R6G (ВПК)
МБТК	16	+	+	-	+
НТМБ	18	-	-	+	+
Микроорганизмы, не относящиеся к роду <i>Mycobacterium</i>	14	-	-	-	+

Следующий этап оценки чувствительности и специфичности проводили с использованием 301 культуры НТМБ и 500 культур МБТК, выделенных из респираторного материала от больных. Проанализированные культуры принадлежали к 12 видам НТМБ и 2 видам МБТК. Результаты их видовой идентификации и анализа с использованием тест-системы представлены в таблице

9.

Таблица 9 - Штаммы НТМБ и МБТК, использованные для оценки аналитической чувствительности тест-системы ПЦР-РВ(д) для выявления и дифференциации МБТК и НТМБ

Вид, Genotype CM/AS/MTB	Число культур	Результат ПЦР-РВ на выявление НТМБ/МБТК			
		Положительные по каналу Cy5 (НТМБ)	Положительные по каналу FAM (МБТК)	Положительные по каналу ROX (МБТК)	Положительные по каналу R6G (ВПК)
<i>M.abscessus</i> +	3	+	+	-	+
<i>M.tuberculosis</i>					
<i>M.avium</i> +	1	+	+	-	+
<i>M.tuberculosis</i>					
<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				

Была показана 100% специфичность и чувствительность тест-системы для одновременного выявления ДНК МБТК и НТМБ к ДНК МБТК и НТМБ, выделенной из культур микобактерий. За время анализа было выявлено 4 образца смешанных культур, один из которых содержал смесь *M. tuberculosis* и *M. avium*, а три другие – смесь *M. tuberculosis* и *M. abscessus*.

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

Для оценки диагностической специфичности и чувствительности тест-системы ПЦР-РВ(д) были проанализированы 3757 образцов диагностического материала от 1416 пациентов с диагнозом туберкулёз лёгких, 609 образцов диагностического материала от 190 пациентов с подтверждённым диагнозом микобактериоз и 380 образцов от 267 пациентов с другими заболеваниями лёгких. Схема анализа образцов диагностического материала представлена на рисунке 1.

Для всех отобранных для анализа больных туберкулезом диагноз был подтвержден культуральным методом, от всех больных с диагнозом микобактериоз были получены культуры НТМБ на ВАСТЕС MGIT 960 из 2х или более собранных в разные дни образцов мокроты, либо одного образца БАЛ, либо образца операционного материала согласно [150].

Результаты анализа с использованием разработанной тест-системы сравнивали с результатами культивирования анализируемого материала в жидкой среде на ВАСТЕС MGIT 960 и люминесцентной микроскопии мазков, приготовленных из того же диагностического материала, что принято при проведении оценки чувствительности тест-систем такого типа [61, 105, 106, 162, 219, 227, 254]. Результаты оценки диагностической чувствительности и специфичности в сравнении с результатами выявления культур на жидкой среде MiddleBrook 7H9 в системе ВАСТЕС (для МБТ) и результатами люминесцентной микроскопии представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Результаты оценки диагностической чувствительности и специфичности тест-системы для выявления и дифференциации МБТК и НТМБ

Диагноз	Всего		ВАСТЕС		ПЦР-РВ		Люминесцентная
			МБТ+ (% от общего числа)	НТМБ+ (% от общего числа)	МБТ+ (% от положитель- ных на ВАСТЕС)	НТМБ+ (% от положитель- ных на ВАСТЕС)	КУМ (% от положитель- ных на ВАСТЕС)
Туберкулез	Образцы материала, число	3757	3727 (99,2)	30 (0,8)	3441 (92,3)	9 (30)	1884 (50,1)
	Пациенты, число	1416	1411 (99,6)	6 (0,4)	1320 (93,5)	6 (100)	819 (57,8)
Микобактериоз	Образцы материала, число	609	0	609 (100)	0	318 (52,2)	296 (48,6)
	Пациенты, число	190	0	190 (100)	0	141 (74,2)	125 (65,7)
Другие респираторные заболевания	Образцы материала, число	380	0	0	0	0	2 (0,53)
	Пациенты, число	267	0	0	0	0	2 (0,75)

Все 380 образцов от пациентов с неспецифическими заболеваниями лёгких были отрицательны на наличие МБТ и/или НТМБ по результатам культурального исследования и ПЦР-РВ. При этом в двух образцах (0,53%) от двух больных (0,75%) были выявлены КУМ по результатам люминесцентной микроскопии. 3757 образцов от пациентов с диагнозом туберкулёз были положительны на присутствие микобактерий по результатам культуральных исследований. При этом по результатам идентификации культур с помощью теста на наличие антигена MPT64 (MPT64TB Ag Kit, Standard Diagnostics, Корея) присутствие *M.tuberculosis* было выявлено в 3727 образцах, что составляет 99,2% от общего числа образцов. Оставшиеся 30 образцов были отрицательны на наличие антигена MPT64 и при этом содержали КУМ по результатам анализа методом люминесцентной микроскопии. Исследование образцов ДНК, выделенных из культур методом обратной гибридизации на нитроцеллюлозных полосках *Mycobacterium Genotype CM/AS* (Hain Lifescience, Германия), показало наличие специфических фрагментов генома НТМБ. В 8 образцах от 6 пациентов было

выявлено одновременное присутствие ДНК МБТ и НТМБ. В 22 образцах от 5 больных была выявлена ДНК *M.abscessus*, в 8 образцах от одного больного – ДНК *M.avium*.

Для 3441 (92,3%) из образцов, положительных на МБТ по результатам посева на жидкие среды и первичной идентификации культур, был получен положительный сигнал по каналам ROX и/или FAM, детектирующим ДНК МБТ, в то время как по результатам люминесцентной микроскопии КУМ были выявлены в 1884 (50,1%) образцах.

Из 30 образцов от 6 больных туберкулёзом, положительных на НТМБ по результатам посева на жидкую среду, 9 (30%) были положительны на присутствие специфических участков ДНК НТМБ по результатам анализа с помощью тест-системы ПЦР-РВ(д). При этом для 8 из 30 образцов от 5 больных было выявлено одновременное присутствие ДНК НТМБ и МБТ, что совпало с результатом идентификации культур, полученных из другой порции этих же образцов (Рисунок 1). Таким образом, была подтверждена возможность одновременного обнаружения ДНК НТМБ и МБТ в одной пробе клинического материала с использованием разработанной тест-системы ПЦР-РВ(д).

Из 609 образцов клинического материала от 190 больных микобактериозом, взятых в исследование, были выделены культуры НТМБ. Присутствие ДНК НТМБ в образцах ДНК, выделенных из этого материала, было детектировано разработанной тест-системой ПЦР-РВ(д) в 318 (50,3%) образцах из 609 для 141 (74,2%) больных из 190. КУМ были выявлены методом люминесцентной микроскопии в 296 (48,6%) образцах от 125 (65,7%) больных.

Чувствительность тест-системы ПЦР-РВ(д) в отношении образцов клинического материала оказалась ниже ожидаемой. Было предположено, что разница в чувствительности тест-системы к ДНК НТМБ, выделенной из культур, и ДНК НТМБ, выделенной из диагностического материала, может быть связана с взаимодействиями праймеров, специфичных к ДНК НТМБ, с ДНК человека и/или микроорганизмов, присутствующей в образцах диагностического материала от больных.

Для проверки этого предположения было отобрано 20 деконтаминированных NALC-NaOH осадков мокроты, полученной от больных, проходящих диагностику в ФГБНУ «ЦНИИТ», отрицательных на наличие КУМ по результатам ЛЮМ и посева на жидкие питательные среды в системе ВАСТЕС MGIT 960. Из осадков были выделены образцы ДНК в объеме 200 мкл и проанализированы с использованием тест-системы ПЦР-РВ(д). Результаты анализа показали отсутствие ДНК МБТК и/или НТМБ в образцах. Для определения количественного содержания ДНК человека исследуемые образцы были проанализированы также с использованием набора реагентов «ХУ-Детект» (Синтол, Москва).

Охарактеризованные на количественное содержание ДНК человека образцы делили на две части. Одну из них смешивали с ДНК, выделенной из коллекционного штамма *M.avium* (Таблица 1) так, чтобы 20 мкл смешанного образца, добавляемые в ПЦР содержал 100 геном-эквивалентов микобактериальной ДНК.

Исходные образцы ДНК, выделенные из осадков и смешанные образцы ДНК, содержащие 100 г-э *M.avium*, анализировали в двух повторах с помощью реакционной смеси тест-системы ПЦР-РВ(д). Использовали следующий состав реакционной смеси, при объеме одной реакции 25 мкл: 60 пмоль смеси праймеров и зондов для выявления МБТК и НТМБ (концентрации и последовательности праймеров, специфичных к ДНК НТМБ приведены в таблице 5), 5 мкл концентрированного 5X мастер-микса для проведения ПЦР (НПФ «Синтол», Россия), 0,625 мкл интеркалирующего красителя EvaGreen 40X, 10 е.а. модифицированной ДНК-полимеразы М+ (НПФ «Синтол», Россия) и 20 мкл образца ДНК (последовательности праймеров указаны в таблице 5). Интеркалирующий краситель EvaGreen (длина волны флуоресценции 530 нм) использовали для детекции возможных неспецифических взаимодействий, которые не детектируют специфические зонды, используемые в реакционной смеси. Результаты анализа образцов ДНК, выделенных из отрицательных на

МБТК и НТМБ деконтаминированных осадков мокроты, и количественное содержание в них ДНК человека представлены в таблице 11.

Таблица 11 - Результаты анализа образцов ДНК, выделенных из мокроты больных, отрицательной на присутствие микобактерий

№ образца	Количество ДНК человека в образце ДНК, нг	Ct SYBR				Ct Cy5			
		Образец ДНК, отрицательный на МБ		Смешанный образец ДНК, содержащий 100 г-э <i>M.avium</i>		Образец ДНК, отрицатель-ный на МБ		Смешанный образец ДНК, содержащий 100 г-э <i>M.avium</i>	
		Среднее значение	СО	Среднее значение	СО	Среднее значение	СО	Среднее значение	СО
1	210	32,78	0,04	31,51	0,16	Н/О		32,9	0,62
2	326	24,48	0,28	24,11	0,03	Н/О		31,54	0,62
3	0,263	27,82	0,11	27,65	0,08	Н/О		30,925	0,09
4	5,99	30,04	0,04	29,13	1,17	Н/О		34,135	2,37
5	17,1	29,97	0,11	30,02	0,06	Н/О		32,96	0,59
6	6,54	28,01	0,10	27,82	0,06	Н/О		32,22	0,10
7	0,4	29,61	0,13	29,21	0,21	Н/О		32,35	0,06
8	248	29,95	0,28	29,80	0,45	Н/О		32,245	0,11
9	93,8	27,12	0,15	27,13	0,21	Н/О		31,27	0,34
10	70,1	26,58	0,13	26,51	0,05	Н/О		31,705	0,37
11	77,8	25,84	0,30	25,98	0,03	Н/О		31,4	0,98
12	40,9	32,34	0,18	31,37	0,29	Н/О		32,67	0,59
13	349	27,62	0,81	27,30	0,18	Н/О		31,375	0,21
14	40,4	20,69	0,08	20,68	0,21	Н/О		34,17	0,40
15	93,6	29,69	0,31	29,37	0,01	Н/О		32,345	0,02
16	64,4	29,60	0,01	29,34	0,28	Н/О		32,66	0,30
17	476	29,31	0,23	27,80	0,58	Н/О		31,7	0,81
18	84,8	27,55	0,24	27,43	0,21	Н/О		32,18	0,01
19	47,2	22,72	0,05	22,46	0,05	Н/О		31,35	0,14
20	21,1	29,70	0,11	28,84	0,55	Н/О		32,1	0,01
<i>M.avium</i> , 100 г-э	0	30,48	0,31			33,2	0,23		
ОКО	0	31,40	0,33			Н/О			

Примечание: Ct – пороговый цикл; Н/О – «не определено» – значение, выдаваемое прибором при отсутствии детекции роста сигнала флуоресценции относительно фонового; СО – стандартное отклонение; г-э – геном-эквиваленты; МБ - микобактерии

Оценку влияния содержания ДНК человека в исследуемых образцах на амплификацию ДНК НТМБ проводили методом непараметрической статистики путём расчёта коэффициент ранговой корреляции Спирмена между концентрацией ДНК человека в образцах, не содержащих ДНК микобактерий, и пороговыми циклами амплификации этих образцов по каналу SYBR. Его значение составило $r=-0.32$ при $p>0,05$. Также был рассчитан коэффициент Спирмена для концентрации ДНК человека

в отрицательных на микобактерии образцах и пороговым циклом амплификации 100 геном-эквивалентов ДНК *M.avium* в присутствии этих образцов. В этом случае коэффициент ранговой корреляции Спирмена составил $r=0.26$ при $p>0,05$. Таким образом, амплификация специфических участков генома НТМБ не зависит от концентрации ДНК человека, присутствующей в той же пробе, следовательно, неспецифическая посадка праймеров на ДНК человека не происходит. Примеры амплификации 100 геном-эквивалентов *M.avium* и 100 геном-эквивалентов *M.avium* в присутствии ДНК, выделенной из клинического материала от больных, представлены на рисунке 5 А, Б, В, Г, Д, Е.

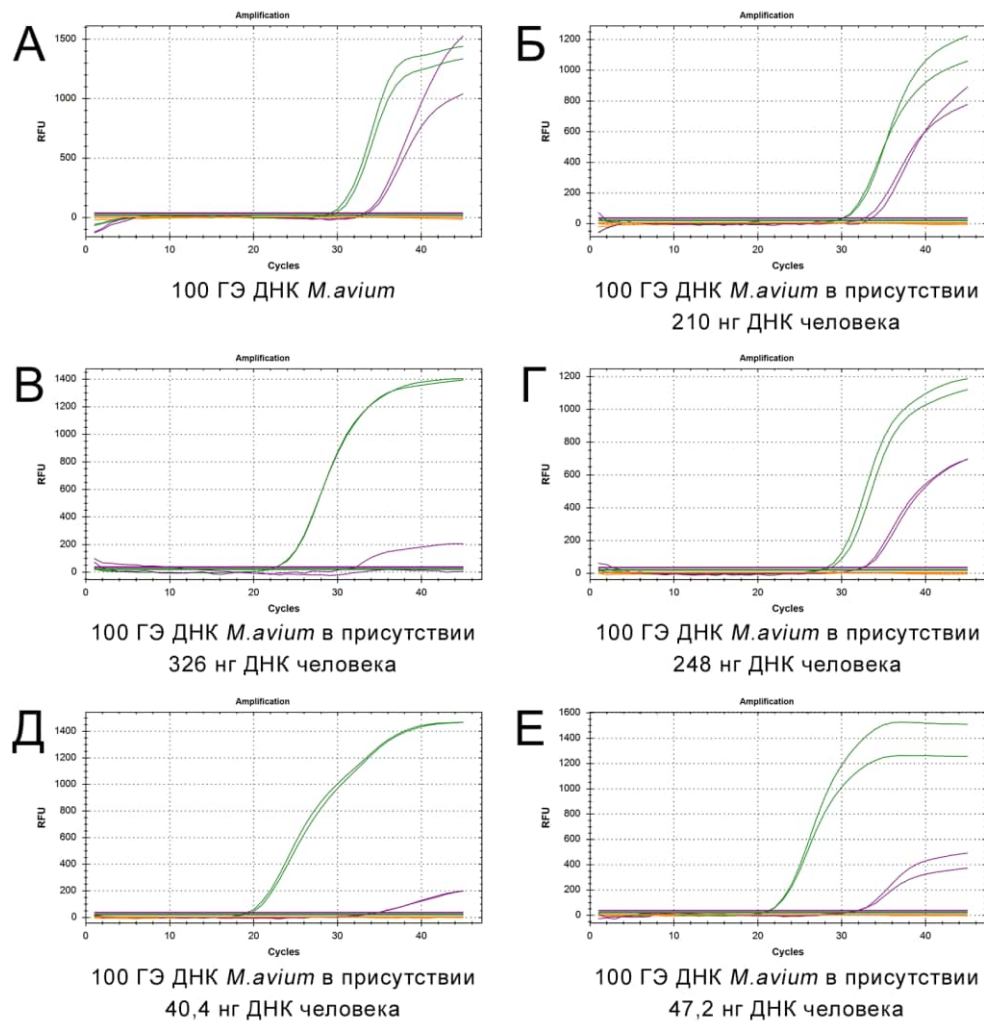


Рисунок 5 - Пример амплификации 100 геном-эквивалентов *M.avium* в присутствии ДНК, выделенной из клинического материала от больных

Примечание: на рисунке указано количество ДНК человека в образцах, определенное с помощью набора реагентов «ХУ-Детект» (Синтол, Москва). Зелёные кривые – детекция амплификации с помощью интеркалирующего красителя EvaGreen по каналу SybrGreen; фиолетовые кривые – детекция амплификации специфического фрагмента ДНК *M.avium* по каналу Cy5

А – амплификация 100 ГЭ ДНК *M.avium*; амплификация 100 ГЭ ДНК *M.avium* в присутствии: Б - 210 нг ДНК человека; В - 326 нг ДНК человека; Г - 248 нг ДНК человека; Д - 40,4 нг ДНК человека; Е - 47,2 нг ДНК человека

Полученные данные косвенно свидетельствуют о присутствии в образцах мокроты ДНК микроорганизмов, на которую отжигаются праймеры, специфичные к ДНК НТМБ. Это сказывается на чувствительности тест-системы ПЦР-РВ(д) к ДНК НТМБ, выделенной из образцов клинического материала. Необходимо отметить, что больные могут выделять микобактерии нерегулярно, поэтому в целях повышения информативности теста практикуется повторное (до 2х раз) исследование мокроты [43]. Таким образом, чувствительность теста, рассчитанная исходя из количества положительных результатов в итоговой выборке больных, отражает возможности тест-системы для быстрой диагностики МБТК и НТМБ лучше, чем чувствительность, рассчитанная исходя из положительных результатов, полученных для всех образцов от этих больных.

Чувствительность разработанной тест-системы в отношении образцов клинического материала, рассчитанная исходя из количества больных, положительных по результатам анализа, составляет 93,5% к ДНК МБТК и 74% - к ДНК НТМБ.

Прогностическая ценность положительного результата теста на выявление ДНК МБТК и НТМБ составляет 100%, отрицательного результата – 89,2%.

2.4 Оценка 95% предела обнаружения (LoD95%) ДНК микобактерий в пробе клинического материала

Для оценки предела обнаружения ДНК МБТ с вероятностью 95% (LoD95%) к образцам мокроты, отрицательной на микобактерии, 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 (панель модельных образцов). Образцы, содержавшие 20, 10, 5 и 2 КОЕ/мл были проанализированы в 20 повторах, образец, содержавший 0 КОЕ/мл – 16 повторах. Для оценки предела обнаружения ДНК *M.avium* с вероятностью 95% (LoD95%) готовили панель модельных образцов из мокроты, отрицательной на микобактерии, и культуры *M.avium* CTRI-NTM-3 (Таблица 1), так чтобы количественное содержание *M.avium* в полученных образцах составляло 10000, 1000, 500, 300, 150 и 0 КОЕ/мл. Образцы, содержащие 10000 и 0, 1000, 150-500

КОЕ/мл, были проанализированы в 8, 16 и 20 повторях соответственно. В анализ образцов входило выделение ДНК по методике, описанной в разделе «Молекулярно-генетические методы исследования» и постановка ПЦР-РВ с использованием разработанной тест-системы ПЦР-РВ(д). Результаты анализа приведены в таблице 12.

Таблица 12 - 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)

<i>M.tuberculosis</i> H37Rv		количество положительных результатов (%)		
Концентрация МБТ, КОЕ/мл	Число повторов	IS6110 (FAM), детекция МБТК	regX (ROX), детекция МБТК	metH (Cy5), детекция НТМБ
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>Mycobacterium avium</i> , CTRI-NTM-3		IS6110 (FAM), детекция МБТК	regX (ROX), детекция МБТК	metH и tuf (Cy5), детекция НТМБ
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)

Предел обнаружения LoD95%, рассчитанный по методике, описанной в разделе «Методы статистической обработки результатов», для *M. tuberculosis* H37Rv составил 16 КОЕ/мл по результатам выявления, комбинированным для обеих мишеней, специфичных к ДНК МБТК – IS6110 и regX, 58 КОЕ/мл для regX (однокопийный участок генома МБТК) и 16 КОЕ/мл для IS6110 (многокопийный участок генома МБТК). Предел обнаружения LoD95% для *M. avium* составил 1200 КОЕ/мл.

2.6 Оценка внутрипостановочной сходимости и межпостановочной воспроизводимости результатов выявления микобактерий для тест-системы ПЦР-РВ(д)

Для оценки внутрипостановочной сходимости результатов были

проанализированы по три клинических образца, заведомо положительных на *M.xenopi*; *M.avium*; *M.kansasii*; *M.malmoense*, представляющих четыре варианта генотипов НТМБ в областях посадки подобранных праймеров и зондов, специфичных к ДНК НТМБ; *M.tuberculosis*, и три отрицательных контрольных образца, каждый в пяти повторах на трех амплификаторах: CFX96 (BioRad Laboratories, Inc, США), ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ», Россия), АНК 32 М (ФГБУН ИАП РАН, Россия), - и рассчитан коэффициент вариации пороговых циклов для каждого образца в каждом эксперименте.

Для оценки межпостановочной воспроизводимости результатов были проанализированы те же клинические образцы, каждый в пяти повторах. Было выполнено по одной постановке двумя разными исследователями на трех амплификаторах: CFX96 (BioRad Laboratories, Inc, США), ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ», Россия), АНК 32 М (ФГБУН ИАП РАН, Россия).

Оценка внутрипостановочной сходимости (внутри одной постановки) для разработанной тест-системы ПЦР-РВ(д) показала, что коэффициент вариации пороговых циклов внутри одной постановки по каждому образцу по всем каналам при постановке на всех использованных в испытании амплификаторах не превышал 1,10%, что свидетельствует о высокой внутрипостановочной сходимости результатов (Приложение №4).

Оценка межпостановочной воспроизводимости для разработанной тест-системы ПЦР-РВ(д) показала полное совпадение результатов, полученных двумя исследователями: все заведомо положительные образцы были определены как положительные на целевой вид микобактерий, заведомо отрицательные - как отрицательные. Коэффициент вариации пороговых циклов, полученный в 5-ти повторностях для каждого образца двумя исследователями по всем каналам при постановке на всех использованных в испытании амплификаторах, не превышал 1,35%, что свидетельствует о высокой межсерийной воспроизводимости результатов (Приложение №6).

ГЛАВА 3. РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ПЦР-РВ(И) НА ОСНОВЕ ПЦР-РВ ДЛЯ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ НТМБ В ОБРАЗЦАХ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА/КУЛЬТУР ОТ БОЛЬНЫХ

3.1 Отбор видов НТМБ для разработки тест-системы ПЦР-РВ(и) для видовой идентификации НТМБ в образцах диагностического материала/культур от больных

Распространенность разных видов НТМБ определяется географическим расположением регионов. Например, в европейских странах наиболее широкое распространение показано для представителей МАС (34%) [224, 293], в то время как для ряда азиатских стран, например, Китая и Гонконга эти виды НТМБ не являются преобладающими и составляют 13 и менее процентов [276]. Показано, что в Европе значительно чаще чем в Азии встречаются *M. gordonae*, *M. xenopi*, *M. malmoense*, при этом практически не встречаются широко распространённые в Азии *M. scrofulaceum* и *M. flavescens* [224, 276, 293].

Распространённость НТМБ на территории России изучена слабо, до недавнего времени были хорошо охарактеризованы по видовому спектру только НТМБ, выделенные от больных, проживающих в Москве, Московской и Ленинградской областях [15, 24, 29, 37].

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

На основе проведённого анализа для разработки тест-системы были отобраны следующие виды НТМБ: *M.abscessus*, *M.chelonae*, *M.avium*, *M.gordonaе*, *M.fortuitum*, *M.fortuitum peregrinum*, *M.intracellulare*, *M.kansasii*, *M.lentiflavum*, *M.malmoense*, *M.mucogenicum*, *M.smegmatis*, *M.xenopi*. Результаты анализа штаммов от больных приведены в таблице 13.

Таблица 13 - Результаты анализа штаммов НТМБ, полученных от больных с подозрением на туберкулёз и микобактериоз лёгких, проходивших диагностику в ФГБНУ «ЦНИИТ» и лабораториях 17 региональных центров РФ

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.gordonaе</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

3.2 Разработка праймеров и Taq-Man зондов и дизайна тест-системы ПЦР-РВ(и) для видовой идентификации НТМБ

Как было отмечено выше, микобактериоз способны вызывать НТМБ, принадлежащие к разным видам, при этом режим терапии для больных подбирают в зависимости от видовой принадлежности возбудителя, т.к. от неё зависит характер ЛЧ НТМБ [85, 249, 271, 297]. В связи с этим быстрая идентификация НТМБ до вида необходима для назначения адекватной схемы лечения.

Классические бактериологические и биохимические методы видовой идентификации микобактерий требуют больших временных затрат и большого количества ручных манипуляций, кроме того они обладают меньшей специфичностью чем более современные быстрые методы, такие как ВЖХ, масс-спектрометрия и секвенирование переменных регионов гена, кодирующего 16S рРНК. Наиболее удобные, простые в применении и не требующие закупки дорогостоящего оборудования (в отличие секвенирования, ВЖХ, масс-спектрометрии) среди быстрых методов идентификации НТМБ являются методы, основанные на ПЦР.

Единственные зарегистрированные на территории РФ для использования в медицинских учреждениях наборы для видовой идентификации НТМБ на основе ПЦР на сегодняшний день – наборы компании Hain Lifescience Genotype Mycobacterium CM и Genotype Mycobacterium AS. Принцип их работы основан на описанной выше гибридизационной технологии [193, 240]. Однако, чувствительность этих наборов реагентов достаточна только для работы с образцами ДНК, выделенных из культур и, в некоторых случаях, образцов БК+ диагностического материала. Существенными недостатками являются также длительное время анализа – 5-7 часов и большое число ручных манипуляций, приводящих к высокому риску возникновения ошибок, связанных с человеческим фактором. Кроме того, в 2022 году компания Hain Lifescience ушла с Российского рынка и описанные наборы реагентов больше недоступны для лабораторной службы РФ.

Методы, основанные на ПЦР, используемые для идентификации НТМБ за рубежом также имеют ограничения: необходимость манипуляций с продуктами амплификации (рестрикционный анализ, электрофорез) [95, 237, 251, 283, 299], гибридизация со специфическими олигонуклеотидными зондами на микрочипах [321, 324].

Методы, основанные на ПЦР-РВ, могут предполагать дополнительный анализ продуктов амплификации - анализ кривых плавления [99, 161, 256], имеющий ряд недостатков, описанных выше.

Наиболее перспективным и удобным методом видовой идентификации НТМБ является мультиплексная ПЦР-РВ с детекцией видов путём гибридизации продуктов амплификации со специфичными детектируемым видам флуоресцентно-меченными олигонуклеотидными зондами. Большинство тест-систем, основанных на этой технологии, разработаны для идентификации одного-нескольких видов микобактерий [198, 266, 270], либо не предназначены для работы с клиническим материалом от пациентов [303].

Для создания отечественной тест-системы для видовой идентификации НТМБ нами была выбрана технология ПЦР-РВ с детекцией специфических продуктов амплификации путём их гибридизации с флуоресцентно-меченными Taq-Man зондами.

Для подбора праймеров и зондов для видовой идентификации НТМБ были выбраны 2 ранее не использовавшиеся мишени - для быстрорастущих и медленно растущих НТМБ, кодирующие гипотетические белки, содержащие консервативные домены. Для быстрорастущих был выбран регион 600 п.н. - 101700 - 102400 нуклеотиды на референсном геноме *M.abscessus* (номер в NCBI NZ_FVOX01000008.1), для медленно растущих – 29579 – 30403 нуклеотиды на референсном геноме *Mycobacterium avium* (номер в NCBI NZ_LMVV01000015).

На основе выравниваний этих регионов в геномах, доступных в базе данных NCBI на момент начала исследования (идентификаторы NCBI для использованных геномных последовательностей и список использованных

геномов представлены в приложении 1), были подобраны праймеры для прямого секвенирования выбранных регионов в клинических штаммах НТМБ. Гомологичные последовательности, включенные в выравнивание для подбора сиквенсовых праймеров, были найдены в базе данных GenBank NCBI для следующих видов, выбранных для разработки тест-системы: *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.gordoniae*, *M.kansasii*, *M.lentiflavum*, *M.xenopi*, *M.abscessus*, *M.chelonae*, *M.fortuitum*, *M.mucogenicum*, *M.smegmatis*. Кроме того, 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» (Таблица 1), для учёта характера их последовательностей в выбранных регионах при дизайне праймеров и зондов для видовой идентификации целевых видов НТМБ. Для наработки ПЦР-продуктов штаммов, принадлежащих к видам, последовательности которых не были депонированы в базу данных GenBank NCBI на момент начала исследования, использовали праймеры, подобранные для наработки ПЦР-продуктов филогенетически близких видов. Последовательности праймеров для секвенирования клинических штаммов НТМБ и их итоговые комбинации, подобранные для секвенирования штаммов с разной видовой принадлежностью, представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Праймеры для секвенирования локусов, предварительно отобранных для создания тест-системы ПЦР-РВ(и) для идентификации НТМБ до вида

Название праймера	Последовательность	Место посадки на геноме <i>M.abscessus</i> NZ_FVOX01000008.1/ <i>M.avium</i> NZ_LMVV01000015, п.н.*	Виды НТМБ
Abft_F158_T	GGATCTTCCCGTGGTACGT	101820 - 102375	<i>M.abscessus</i> <i>M.chelonae</i>
Abft_F158_C	GGATCTTCCCGTGGTACGC	101820 - 102375	<i>M.fortuitum</i> <i>M.smegmatis</i>
Abft_R726	ACTCACCCAGCGGCGTGT	102375 - 102392	<i>M.abscessus</i> <i>M.chelonae</i> <i>M.fortuitum</i> <i>M.smegmatis</i>
PuP_F414	GATGCGCCAGTTCGTCAAGA	29992 - 30012	<i>M.avium</i> , <i>M.intracellulare</i> , <i>M.interjectum</i> , <i>M.lentiflavum</i> , <i>M.scrofulaceum</i> , <i>M.xenopi</i> ,

Продолжение таблицы 14

Название праймера	Последовательность	Место посадки на геноме <i>M.avium</i> NZ_LMVV01000015, п.н.*	Виды НТМБ
PuP_F413	TGATGCGACAGCTCGTCAAG	29991 - 30011	<i>M.kansasii</i>
Pup_R696	CCGTCAGACCGCCGAGAT	30273 - 30292	<i>M.gordonae</i> , <i>M.interjectum</i> , <i>M.lentiflavum</i>
Pup_R795	CAACGAAACGTATCTCGCCG	30372 - 30391	<i>M.kansasii</i> , <i>M.gastri</i> , <i>M.scrofulaceum</i> , <i>M.xenopi</i> ,
Pup_R798	GCGACGAGGTAGGTTTCGT	30375 - 30393	<i>M.avium</i> , <i>M.intracellulare</i>

Примечание:

*Для НТМБ, принадлежащих к быстрорастущим, показано место посадки на референсном геноме *M.abscessus*, к медленно растущим – на геноме *M.avium*

Для секвенирования было отобрано максимальное число штаммов каждого вида НТМБ от разных больных. Количество и видовое разнообразие использованных штаммов НТМБ представлено в таблице 15.

Таблица 15 - 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		

Наработку ПЦР-продуктов для дальнейшего секвенирования целевых локусов проводили в 50 мкл ПЦР-смеси, содержащей 2 мкл ДНК НТМБ, 20 мкл 2,5X реакционной смеси, содержащей Syn-Taq-полимеразу (НПФ «Синтол», Россия), по 10 пкмоль прямого и обратного праймеров и ддН₂O, в амплификаторе CFX-96 (Biorad, США). Праймеры комбинировали в пары согласно таблице 14 в

зависимости от видовой принадлежности исследуемого штамма. Амплификацию проводили в следующих условиях: 95°C - 5 мин; далее 35 циклов: 95°C - 15 сек, 60°C - 30 сек, 72°C - 30сек; 72°C – 15 мин. Описание подготовки ПЦР-продуктов и секвенирования по Сенгеру, а также список проанализированных штаммов приведены в главе 2 «Материалы и методы исследования».

Для всех взятых в анализ штаммов были получены ПЦР-продукты ожидаемой длины. Примеры электрофореграмм специфических продуктов ПЦР, полученных для дальнейшего секвенирования по Сенгеру представлены на рисунке 6 А, Б, В, Г, Д, Е.

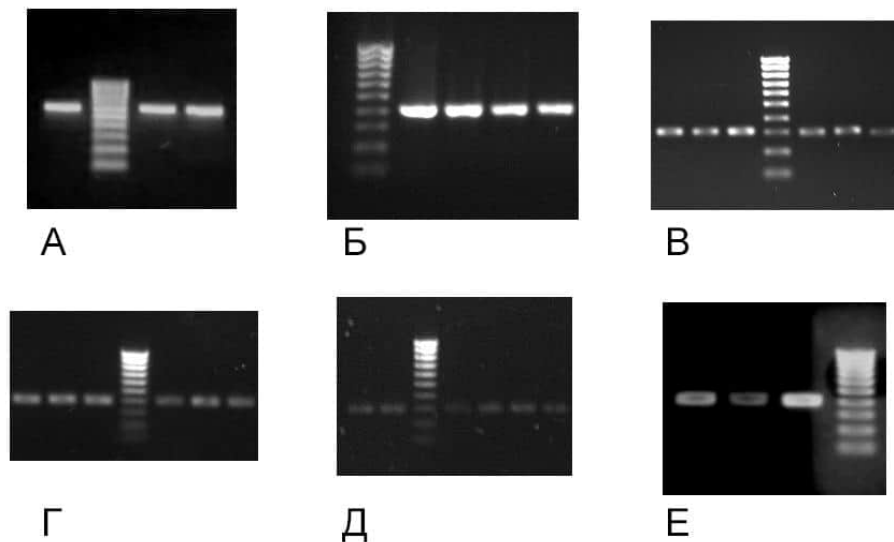


Рисунок 6 – Электрофореграмма продуктов амплификации ДНК НТМБ

Примечание: ДНК *M.abscessus* (А), *M.avium* (Б), *M.gordonae* (В), *M. M.kansasii* (Г), *M.lentiflavum* (Д), *M.xenopi* (Е); маркер молекулярного веса ДНК М-100, 100-1000 п.н. (НПФ «Синтол», Москва)

Для оценки внутривидовой вариабельности отсеквенированных регионов, были составлены их выравнивания для каждого исследованного вида НТМБ с включением штаммов, депонированных на момент проведения исследования в базу данных Genbank NCBI. На основании полученных выравниваний было определено количество генетических вариантов среди отсеквенированных клинических штаммов и штаммов из базы данных для каждого вида. Под генетическими вариантами в данном случае имеются в виду варианты

последовательности отсеквенированной нами консервативной области генома, несущие одинаковые единичные замены в одних и тех же позициях. Суммарное количество штаммов, использованное для анализа каждого вида НТМБ и количество генотипов в пределах исследованных участков геномов представлено в таблице 16.

Таблица 16 – Внутривидовая вариабельность исследованных штаммов НТМБ

№	Название вида	Число штаммов	Число генетических вариантов
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	

После определения встречающихся вариантов отсеквенированного участка генома для каждого исследуемого вида НТМБ, были составлены суммарные выравнивания – одно для медленнорастущих, другое – для быстрорастущих микобактерий, содержащие наиболее консервативные участки отсеквенированных регионов. Выравнивания приведены на рисунке 7 А и Б.

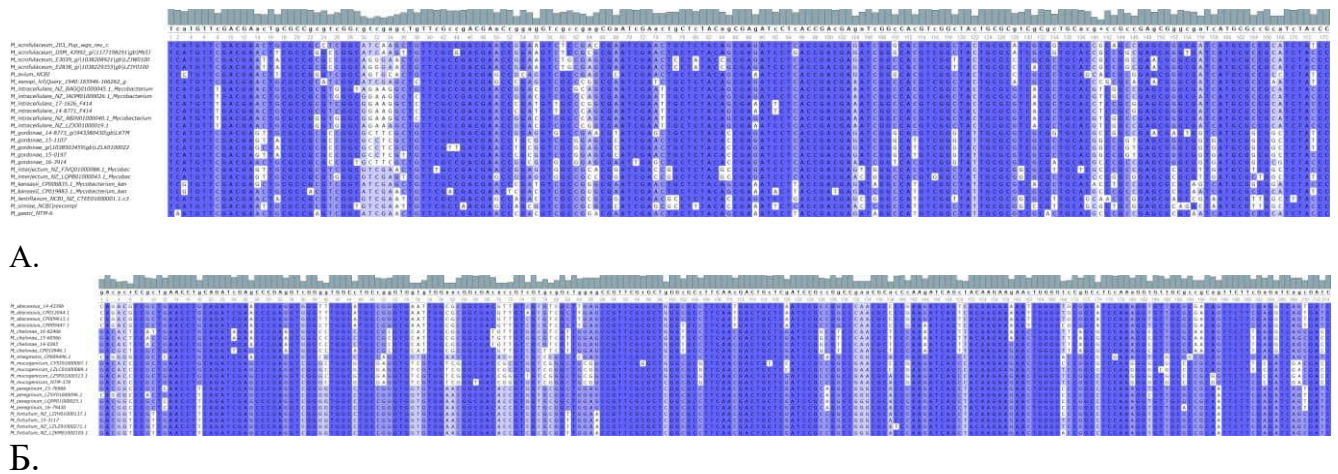


Рисунок 7 – Выравнивания участков геномов, выбранных для разработки тест-системы для видовой идентификации НТМБ

Примечание: А - Генетические варианты, найденные в ходе исследования 274 геномов медленнорастущих НТМБ; Б - Генетические варианты, найденные в ходе исследования 138 геномов быстрорастущих НТМБ

Для разработки тест-системы было принято решение мультиплексировать в одной ПЦР-смеси праймеры и зонды, обеспечивающие возможность проведения 4х независимых реакций, результаты которых регистрируются по 4м каналам флуоресценции, т.к. большая часть использующихся на настоящий момент в противотуберкулёзной лабораторной службе амплификаторов оборудованы четырёхканальной системой детекции.

Исходя из этого, дизайн тест-системы предполагает наличие нескольких пробирок со специфическими смесями праймеров и зондов для обеспечения идентификации выбранных видов НТМБ. Для внутреннего контроля прохождения ПЦР было решено использовать синтетическую последовательность ДНК и систему праймеров и зонда к ней. Таким образом для выявления НТМБ было возможно использовать 3 канала в одной мультиплексной смеси, что позволяет выявлять не более 3х видов НТМБ в одной пробирке. На основе выравниваний, приведённых на рисунке 7, виды НТМБ были сгруппированы таким образом, чтобы максимально сократить количество специфических праймеров и зондов: первая группа – *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. xenopi*; вторая группа - *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. lentiflavum*; третья группа - *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. mucogenicum*; четвертая группа - *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. smegmatis*. Согласно осуществлённой группировке видов были разработаны комбинации специфических праймеров и зондов, представленные в таблице 17.

Таблица 17 – Праймеры и зонды, специфичные к 12 видам НТМБ, вошедшие в состав тест-системы для идентификации НТМБ до вида, последовательность ВПК и праймеры и зонд к ней

№	Название праймера/зонда	Направление цепи	Последовательность 5'-3'	Tm	Tan 10%	Tan 90%	C, мМ	Детектируемая ДНК-мишень
1	Последовательность ВПК		CCTTCTAAAACCCCCACACAAATTTTATTTCTTCTAC TGATGTACTTCATGCTTGAACAATCCCTAGACTAGGG GTAAAAGCAGACTCAACCCCAGGACGTCTAA	88,4			3	ВПК
	Hybs_F		CCTTCTAAAACCCCCACACA	58,4	66,32	56,38	3	
	Hybs_R		TTAGACGTCCTGGGGTTGAG	60,5			3	
	Hybs_Pb		(CY5)TCATGCTTGAACAATCCCTAGACTAGG(BHQ2)	66,6	69,72	61,45	5	
2	Pup_F_intra	+	GCGAATCGAATTGCTCTACAGC	62,1	66,01	56,85	3	<i>M.avium</i> <i>M.intracellulare</i> <i>M.xenopi</i>
	Pup_F_xenopi	+	GCGAATCGATCTGCTCTACAGC	64,2	67,17	57,38	5	
	Pup_F_avium	+	GCGCATCGAACTGCTCTACAG	63,2	69,01	59,19	3	
	Pup_R_intra_avium	-	GCGCATGATCGCCCGCTC	62,9			5	
	Pup_R_xenopi	-	GCGCATGATCGCCCGTTC	60,8			5	
	M_avium_Pb	+	(R6G)GCCTCGCGCTGCAGCACCGC(BHQ2)	70,7	78,25	68,36	10	
	M_intra_Pb_1	+	(FAM)CGCGTCACGCTGCACCTCCGC(RTQ1)	71	76,91	67,66	3	
	M_intra_Pb_2	+	(FAM)CGCGTCACGCTGCACGTCGGC(RTQ1)	71	76,59	66,9	3	
3	M_xenopi_Pb	+	(ROX)GCATCGCGCTGCACCCGCGC(BHQ2)	70,7	79,35	67,93	5	<i>M.kansasii</i> <i>M.kansasii</i> <i>M.gordonae</i> <i>M.lentiflavum</i>
	Pup_F_1	+	GGGCTGTTCGCCGACGA	59,8	66,42	52,18	5	
	Pup_F_kansasii	+	GGGCTGTTCGACGACGA	57,3			5	
	Pup_F4 TT_gord	+	TCGCTGTTCGTTGACGAACC	60,5	67,95	54,15	5	
	Pup_F_lenti	+	GGAATTGTTCGCCGACGA	56,3	66,96	53,95	3	
	Pup_R_kansasii	-	GGTAGATCCGCCGCATGACT	62,5	72,21	61,81	5	
	Pup_R_go_new1	-	GCGACGCGCAATACCCGAC	63,6			5	
	Pup_R_go_new2	-	GCGACGCGCAGTACCCGA	62,9			5	
	Pup_kan_Pb_low1	-	(FAM)TCGCCC GGCGACATCGGGTTC(RTQ1)	69	79,48	67,77	2	
	Pup_kan_Pb_low2	-	(FAM)TCGCCC GGCGACGTCGAGTTC(RTQ1)	69	79,63	68,89	2	
	Pup_gord_Pb_v1_2	+	(ROX)ACCGACGAGATCGGGCATGT(BHQ2)	66,6	69,36	56,5	1,8	
	Pup_gord_Pb_v2_2	+	(ROX)CTCACCGACGAAATCGGTCACGT(BHQ2)	62,5	71,72	59,18	1,8	
4	Pup_Pb_lenti_new	+	(R6G)GACGAGCTGGGCCATGTCGGTTA(RTQ1)	68,3	78,77	69,1	5	
	Abft_F_absc_mucog	+	CCGCTGAACCTGCAGATCGA	62,5	70,76	61,18	5	

Продолжение таблицы 17

№	Название праймера/зонда	Направление цепи	Последовательность 5'-3'	Tm°C	Tan°C 10%	Tan°C 90%	C, mM	Детектируемый вид
4	Abft_F_chelonae	+	CCGCTGAACCTGCAGATAGA	60,5	68,72	58,57	0,2	<i>M.abscessus</i> <i>M.chelonae</i> <i>M.mucogenicum</i>
	Abft_R_che_abs_1	-	GCCCAGCGCGAACGGC	60,9			0,2	
	Abft_R_che_abs_2		CACCCAGCGCGAACGGC	61,8			0,2	
	Abft_R_mucog	-	CGCCGAGCGCGAACGG	60,9			0,12	
	Abft_abs_Pb_v2	+	(FAM)TTGGCATGCCGGGTGAATTGGCG(RTQ1)	68,3	76,35	67,17	0,12	
	Abft_che_F3	+	(ROX)GAACCCGAAGTGGGCCTGGC(BHQ2)	66,6	74,8	62,54	0,08	
	Abft_Pb_mucog	+	(R6G)TGCGAGGTGTCGTGGTCGGG(RTQ1)	66,6	74	64,2	0,12	
5	Abft_F_fort_pereg	+	AACCTTCAGATCGAGCCCGA	60,5	71,46	61,08	0,2	<i>M.fortuitum</i> <i>M.peregrinum</i> <i>M.smegmatis</i>
	Abft_F_smegm	+	CTGCAGATCGAACCCGAGGT	62,5	70,06	59,89	0,2	
	Abft_R_fort_pereg_smegm	-	GTCGTTGAAGGCGCCGAG	60,8			0,2	
	Abft_fort_Pb_up	+	(FAM)CACCGTCGCGCGGTTGGAACC(RTQ1)	69	76,31	63,35	0,12	
	Abft_pereg_Pb_up	+	(R6G)CCGTGGTGC GGCTGGAGCC(BHQ2)	68,1	75,41	64,49	0,16	
	Abft_smegm_Pb_up	+	(ROX)GACACGGTCGCCCCGGCTCGA(BHQ2)	68,7	80	68,58	0,08	

Примечание:

Tm°C – температура плавления олигонуклеотида

Tan°C 10% - температура, при которой с матрицей связано 10% олигонуклеотидов, конкурирующих за одну цепь

Tan°C 90% - температура, при которой с матрицей связано 90%, конкурирующих за одну цепь

C, mM – концентрация олигонуклеотида в mM

Приведенные последовательности праймеров были отобраны из ряда кандидатных последовательностей на основании того, что при проверке всех возможных их комбинаций в пределах одной группы выявляемых видов с помощью он-лайн ресурса Primer blast (NCBI, США), они не давали неспецифической посадки на геномы других микроорганизмов из близкородственных семейств *Corynebacteriaceae*, *Nocardiaceae*, а также встречающихся у больных муковисцидозом, являющихся группой риска для развития микобактериоза и туберкулеза, *Pseudomonadaceae* и *Burkholderiaceae* [44, 57]. При оценке возможной конкуренции зондов и праймеров, отжигающихся на одну и ту же цепь учитывали динамику плавления олигонуклеотидов и их отжига на матрицу, т.к. расчет только абсолютной температуры плавления не позволяют точно прогнозировать конкуренцию олигонуклеотидов, особенно в случае их вырожденности [262]. Абсолютные температуры плавления олигонуклеотидов согласно результатам анализа с помощью ПО OligoCalc, а также температуры при которых с матрицей связано 10% (T_{ap} 10%) и 90% (T_{ap} 90%) олигонуклеотидов, конкурирующих за одну цепь, рассчитанные с помощью DINAMelt Web Server [207] представлены в таблице 17. Степень вырожденности областей посадки праймеров и зондов для видов НТМБ, выявляемых разрабатываемой тест-системой показана на рисунках в приложении 2. Было разработано 4 видоспецифические смеси праймеров и зондов, каждая из которых позволяет выявлять 3 вида НТМБ и ДНК ВПК. В качестве ВПК использовали искусственно синтезированную последовательность ДНК, соответствующую участку митохондриального гена *cox2* тихоходки *Hypsibius dujardini* (нуклеотиды 1619-2287 на последовательности NC_014848.1, GenBank NCBI). Последовательность ВПК, праймеры и зонд для его амплификации приведены в таблице 17. Для того, чтобы образцы культур НТМБ, принадлежащих к видам, редко встречающимся или не детектированным ранее на территории РФ, а также образцы культур МБТК не выбраковывались из анализа по результатам использования разрабатываемой тест-системы, в её дизайн была включена контрольная пробирка, обеспечивающая детекцию ДНК МБТК и ДНК НТМБ. Состав контрольной пробирки соответствует

составу тест-системы ПЦР-РВ(д), разработанной на предыдущем этапе диссертационного исследования (Глава 2), за тем исключением, что ДНК-мишени определяются по другим каналам детекции.

Был разработан следующий дизайн тест-системы, удобный для применения в клинической практике: 5 пробирок по 0.2мл, содержащие каждая по 5 мкл мастер-микса, включающего в свой состав праймеры и зонды, специфичные для ВПК и ДНК МБТК или разных видов НТМБ, а также концентрированный 5X мастер-микс для проведения ПЦР (НПФ «Синтол», Россия) и 10 е.а. модифицированной ДНК-полимеразы (НПФ «Синтол», Россия).

Схема расположения видоспецифических смесей в стрипе и идентифицируемые ими мишени с каналами их детекции показана в таблице 18.

Таблица 18 – Расположение пробирок и каналы детекции для выявления 12 видов НТМБ, ВПК, МБТК и принадлежности микроорганизма к группе НТМБ в стрипе тест-системы ПЦР-РВ(и) для видовой идентификации НТМБ

Канал детекции	Номер пробирки в стрипе				
	1	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				

Пробирка стрипа №1 предназначена для выявления ДНК МБТК и НТМБ (контрольная пробирка). Пробирки стрипа №2-5 предназначены для идентификации различных видов НТМБ. Конечные концентрации праймеров и зондов в итоговых реакционных смесях указаны в таблице 17.

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

Для предварительной оценки специфичности разработанных для видовой идентификации смесей праймеров и зондов использовали выборку ДНК, выделенную из 214 изолятов микобактерий, принадлежащих к 16ти видам НТМБ, полученным от разных пациентов (Таблица 15), а также ДНК 21 штамма МБТК и 18 штаммов 14 видов микроорганизмов, не относящихся к роду *Mycobacterium* (Таблица 1).

Все реакции с разработанными смесями праймеров и зондов проводили в 25 мкл, содержащих 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, специфичные к отобраным для создания тест-системы видам НТМБ, в концентрациях, указанных в таблице 17, праймеры, зонд и синтетическую последовательность ДНК ВПК в концентрациях, указанных в таблице 17, 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 образцов не было получено ложноположительных сигналов ни по одному из специфических каналов флуоресценции.

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. Для микроорганизмов, не принадлежащих роду *Mycobacterium* во всех случаях были получены отрицательные результаты ПЦР по каналам, детектирующим ДНК НТМБ/МБТК.

Таким образом, в результате предварительной оценки аналитической специфичности и чувствительности была показана 100% чувствительность и 100% специфичность разработанной ПЦР тест-системы для видовой идентификации НТМБ.

Примеры результатов амплификации ДНК некоторых видов, детектируемых и идентифицируемых тест-системой, представлены на рисунке 8. На панелях А, В, С представлены кривые амплификации видоспецифических и специфических для группы НТМБ фрагментов ДНК НТМБ и ДНК ВПК. Панель D иллюстрирует возможность выявления смеси двух штаммов НТМБ, принадлежащих к разным видам (*M. abscessus* и *M. intracellulare*), панель Е – одновременное выявление

ДНК НТМБ и МБТК (*M.avium* и *M.tuberculosis complex*) с идентификацией НТМБ до вида.

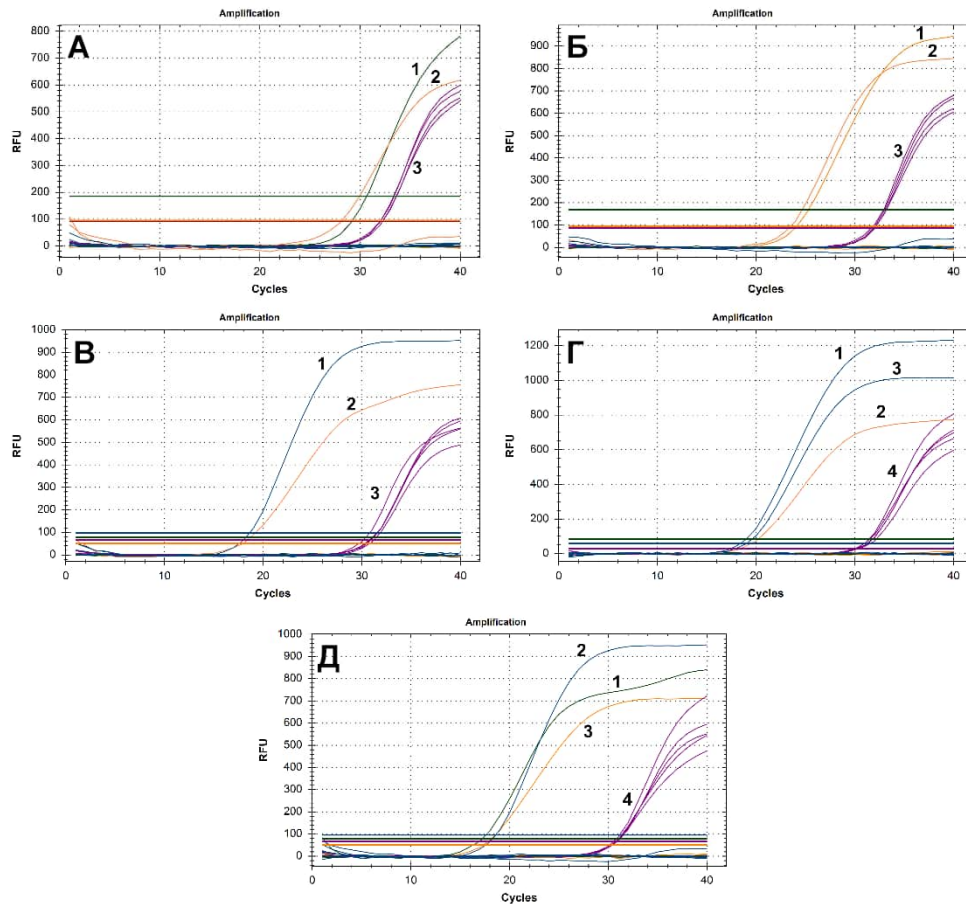


Рисунок 8 – Примеры идентификации некоторых видов НТМБ с использованием разработанной тест-системы.

Примечания: А - детекция и идентификация ДНК *M.avium*: 1 – кривая амплификации специфического фрагмента ДНК *M.avium*, пробирка 2, канал R6G (зелёный); 2 - кривая амплификации специфического фрагмента ДНК НТМБ, пробирка 1, канал ROX (оранжевый); 3 - кривая амплификации ДНК ВПК, пробирки 1 - 5, канал Cy5 (фиолетовый);

Б – детекция и идентификация ДНК *M.xenorhizae*: 1 - кривая амплификации специфического фрагмента ДНК *M.xenorhizae*, вторая пробирка, канал ROX (оранжевый); 2 - кривая амплификации специфического фрагмента ДНК НТМБ, пробирка 1, канал ROX (оранжевый); 3 - кривая амплификации ДНК ВПК, пробирки 1 - 5, канал Cy5 (фиолетовый);

В - детекция и идентификация ДНК *M.intracellulare*. 1 - кривая амплификации специфического фрагмента ДНК *M.intracellulare*, вторая пробирка, канал FAM (голубой); 2 - кривая амплификации специфического фрагмента ДНК НТМБ, пробирка 1, канал ROX (оранжевый); 3 - кривая амплификации ДНК ВПК, пробирки 1 - 5, канал Cy5 (фиолетовый);

Г - детекция и идентификация смеси ДНК *M.intracellulare* и *M.abscessus*. 1 - кривая амплификации специфического фрагмента ДНК *M.intracellulare*, вторая пробирка, канал FAM (голубой); 2 - кривая амплификации специфического фрагмента ДНК НТМБ, пробирка 1, канал ROX (оранжевый); 3 - кривая амплификации специфического фрагмента ДНК *M.abscessus*, пробирка 4, канал FAM (голубой); 4 - кривая амплификации ДНК ВПК, пробирки 1 - 5, канал Cy5 (фиолетовый);

Д - детекция и идентификация смеси ДНК *M.avium* и *M.tuberculosis complex*. 1 - кривая амплификации специфического фрагмента ДНК *M.avium*, пробирка 2, канал R6G (зелёный); 2 – кривая амплификации специфического фрагмента ДНК МБТК, пробирка 1, канал FAM (голубой); 3 - кривая амплификации специфического фрагмента ДНК НТМБ, пробирка 1, канал ROX (оранжевый); 4 - кривая амплификации ДНК ВПК, пробирки 1 - 5, канал Cy5 (фиолетовый).

3.4 Оценка эффективности ПЦР для видов НТМБ, идентифицируемых разработанной тест-системой ПЦР-РВ(и)

Оценку эффективности работы праймеров, специфичных к ДНК видов НТМБ, идентифицируемых тест-системой ПЦР-РВ(и), проводили в составе мультиплексированных смесей, приведенных в таблице 17 и указанных на схеме в таблице 18. Для этого готовили серии из 4х последовательных разведений ДНК, выделенной из отсековированных на предыдущем этапе работы штаммов, содержащих 10^5 , 10^4 , 10^3 и 10^2 геном-эквивалентов. Для определения эффективности реакций было отобрано по одному штамму для видов, в области посадки праймеров на ДНК которых был обнаружен один генетический вариант для всех проанализированных в ходе исследования клинических штаммов и штаммов из базы данных NCBI: *M.avium*, *M.intracellulare*, *M.xenopi*, *M.lentiflavum*, *M.mucogenicum*, *M.fortuitum*, *M.peregrinum*, *M.smegmatis*, - и по 2 штамма для видов *M.gordoniae*, *M.kansasii*, *M.abscessus*, *M.chelonae*, для которых было обнаружено по 2 варианта последовательностей.

Каждое разведение было протестировано в 3х повторах. Характеристики работы праймеров были рассчитаны автоматически с использованием ПО CFX Manager Software 3.0. (Таблица 19).

Таблица 19 – Характеристики работы праймеров на ДНК идентифицируемых тест-системой ПЦР-РВ(и) видов НТМБ

Вид НТМБ	Название параметра		
	Е, % (эффективность реакции)	R ² (коэффициент корреляции)	Slope (наклон стандартной кривой)
<i>M.avium</i>	94,8	0,987	-3,4
<i>M.intracellulare</i>	92	0,99	-3,6
<i>M.xenopi</i>	95	0,99	-3,4
<i>M.gordoniae</i> – вариант 1	93	0,98	-3,4
<i>M.gordoniae</i> – вариант 2	94	0,98	-3,4
<i>M.kansasii</i> – вариант 1	96,1	0,99	-3,4
<i>M.kansasii</i> – вариант 2	98	0,99	-3,3
<i>M.lentiflavum</i>	88	0,99	-3,6
<i>M.abscessus</i> – вариант 1	92	0,99	-3,5
<i>M.abscessus</i> – вариант 2	95	0,99	-3,4
<i>M.chelonae</i> – вариант 1	97	0,98	-3,3
<i>M.chelonae</i> – вариант 2	84	0,99	-3,7
<i>M.mucogenicum</i>	103	0,99	-3,2
<i>M.fortuitum</i>	98	0,99	-3,4

Продолжение таблицы 19

Вид НТМБ	Название параметра		
	Е, % (эффективность реакции)	R ² (коэффициент корреляции)	Slope (наклон стандартной кривой)
<i>M.chelonae</i> – вариант 2	84	0,99	-3,7
<i>M.mucogenicum</i>	103	0,99	-3,2
<i>M.fortuitum</i>	98	0,99	-3,4
<i>M.peregrinum</i>	90	0,99	-3,6
<i>M.smegmatis</i>	95	0,96	-3,4

Значение коэффициента корреляции R² для всех реакций, кроме реакции на идентификацию ДНК *M.smegmatis*, находится в диапазоне 0.981–0.99 (Таблица 19), а значения эффективностей реакций для всех исследованных генетических вариантов видов НТМБ, выявляемых системой, кроме одного из вариантов *M.chelonae* и *M.lentiflavum* находятся в диапазоне 90% - 103%, в то время как рекомендуемое значение коэффициента корреляции для проведения количественной ПЦР-РВ с любыми стартовыми количествами ДНК должно быть не менее 0.980, а значение эффективности – укладываться в диапазон 90-110% [282]. Более низкие значения эффективностей для *M.lentiflavum* и одного из генетических вариантов *M.chelonae* обусловлены вырожденностью праймеров относительно области посадки на ДНК. Количественное определение содержания ДНК в исходном образце не является задачей тест-системы, поэтому характеристики работы разработанных смесей праймеров и зондов на ДНК *M.smegmatis*, *M.lentiflavum*, *M.chelonae* соответствуют поставленной задаче идентификации до вида.

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

Анализ 343 образцов клинического материала от 185 пациентов с подозрением на микобактериоз с помощью тест-системы ПЦР-РВ(и) показал наличие ДНК НТМ во всех 343 образцах, при этом в одном случае (материал получен от одного больного однократно) была выявлена смесь ДНК НТМБ и МБТ. Вид НТМБ был идентифицирован для 342 образцов. По результатам ПЦР с образцом, вид для которого определён не был, был детектирован положительный

сигнал по каналу ROX в контрольной пробирке стрипа (Таблица 18), детектирующий группу НТМБ, вид был обозначен как *Mycobacterium sp.*

Наиболее часто встречающимся видом среди идентифицированных медленно растущих НТМБ по результатам анализа был *M.avium*, составивший 38,78% от проанализированных образцов НТМБ, среди быстрорастущих – *M.abscessus* - 20,99%. Для 6 образцов было показано наличие двух видов микобактерий в диагностическом материале: *M.avium*+*M.tuberculosis* в 1 образце от одного пациента, *M.intracellulare*+*M.abscessus* в 5 образцах от двух пациентов. ПЦР с использованием разработанной тест-системы с 513 образцами диагностического материала от больных с верифицированным диагнозом туберкулез лёгких показала наличие ДНК МБТ и отсутствие ДНК НТМБ во всех случаях. Для всех 117 образцов от 117 пациентов с заболеваниями лёгких немикобактериальной этиологии (ХОБЛ, пневмония немикобактериальной этиологии, астма) было показано отсутствие ДНК НТМБ и МБТ (Таблица 20).

Таблица 20 - Результаты анализа образцов клинического материала с использованием тест-системы ПЦР-РВ(и) для видовой идентификации НТМБ

Результат ПЦР по используемым в тест-системе 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
-	-	-	-	-	Микроорганизмы, не принадлежащие к роду <i>Mycobacterium</i>	117	117	-
Всего						973	815	-

При этом ни один образец, полученный от пациентов с заболеваниями легких немикобактериальной этиологии, не дал рост в системе ВАСТЕС MGIT960. Из 343 образцов от пациентов с подозрением на выделение НТМБ, дали рост 305. Первичная идентификация культур показала их принадлежность к кислотоустойчивым микроорганизмам, не принадлежащим к МБТК. Результаты определения вида микобактерий с использованием разработанной ПЦР-РВ тест-системы и референсной тест-системы GenoType CM/AS (Hain, Германия) показали высокую сходимость (Таблица 21).

Таблица 21 - Сравнение результатов видовой идентификации культур НТМБ с ВАСТЕС MGIT960, 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	Интерпретация
<i>M.avium</i>	<i>M.avium</i>	127	совпало
<i>M.abscessus</i>	<i>M.abscessus</i>	66	совпало
<i>M.kansasii</i>	<i>M.kansasii</i>	31	совпало
<i>M.intracellulare</i>	<i>M.intracellulare</i>	21	совпало
<i>M.fortuitum</i>	<i>M.fortuitum</i>	16	совпало
<i>M.xenopi</i>	<i>M.xenopi</i>	15	совпало
<i>M.gordonae</i>	<i>M.gordonae</i>	12	совпало
<i>M.chelonae</i>	<i>M.chelonae</i>	4	совпало
<i>M.lentiflavum</i>	<i>M.lentiflavum</i>	3	совпало
<i>M.mucogenicum</i>	<i>M.mucogenicum</i>	3	совпало
<i>Mycobacterium sp.</i>	<i>M.malmoense</i>	1	совпало
<i>M.avium</i> + <i>M.tuberculosis</i>	<i>M.avium</i> + <i>M.tuberculosis</i>	1	совпало
<i>M.intracellulare</i> + <i>M.abscessus</i>	<i>M.intracellulare</i> + <i>M.abscessus</i>	5	совпало
всего культур		305	

Полученные с помощью тест-системы ПЦР-РВ(и) результаты видовой идентификации микобактерий, выделенных из диагностического материала от больных, совпали с результатами видовой идентификации соответствующих этим образцам культур. Следует отметить, что было подтверждено и наличие в 6 образцах смеси штаммов, принадлежащих к разным видам НТМБ, как результатами анализа с использованием разработанной тест-системы, так и результатами анализа с использованием референсной тест-системы GenoType CM/AS (Hain, Германия).

513 образцов от больных туберкулезом дали рост в системе BASTEC MGIT 960, все 513 культур были определены обеими тест-системами как МБТ.

Таким образом, чувствительность тест-системы ПЦР-РВ(и) для видовой идентификации НТМБ в образцах клинического материала составила 99,71% при специфичности 100%, а чувствительность для видовой идентификации НТМБ в образцах культур - 99,67% при специфичности 100%; чувствительность и специфичность для определения МБТ из культур составила 100%.

Один образец мокроты, давший рост на BASTEC MGIT960 не был определен до вида с использованием разработанной тест-системы. Видовую идентификацию из полученной культуры проводили с использованием тест-системы GenoTypeCM/AS (Hain lifescience, Германия). Культура принадлежала к виду *M.malmoense*, определение которого не было предусмотрено дизайном ПЦР-РВ тест-системы. Включение в тест-систему контрольной пробирки, содержащей праймеры и зонды для выявления принадлежности к группе НТМБ, позволило определить этот образец, как положительный на наличие НТМБ.

Следует отметить, что из 343 образцов мокроты, положительных на наличие кислотоустойчивых палочек по результатам бактериоскопии, рост на питательной среде дали только 305 образцов. Таким образом, для 38 образцов мокроты, содержащих кислотоустойчивые палочки, дифференцировать НТМБ от МБТК и определить вид НТМБ удалось 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.

3.6 Оценка внутривосстановочной сходимости и межвосстановочной воспроизводимости результатов идентификации НТМБ для тест-системы ПЦР-РВ(и)

Для оценки внутривосстановочной сходимости результатов были проанализированы по три клинических образца, заведомо положительных на *M.tuberculosis*, *M.intracellulare*, *M.xenopi*, *M.avium*, *M.kansasii*, *M.gordona*, *M.lentiflavum*, *M.abscessus*, *M.chelonae*, *M.mucogenicum*, *M.fortuitum*, *M.smegmatis*,

M.peregrinum и три отрицательных контрольных образца, каждый в пяти повторах на трех амплификаторах: CFX96 (BioRad Laboratories, Inc, США), ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ», Россия), АНК 32 М (ФГБУН ИАП РАН, Россия), - и рассчитан коэффициент вариации пороговых циклов для каждого образца, проанализированного на каждом приборе.

Для оценки межпостановочной воспроизводимости результатов были проанализированы те же клинические образцы, каждый в пяти повторах. Было выполнено по одной постановке двумя разными исследователями на трех амплификаторах: CFX96 (BioRad Laboratories, Inc, США), ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ», Россия), АНК 32 М (ФГБУН ИАП РАН, Россия).

Оценка внутрипостановочной сходимости (внутри одной постановки) для разработанной тест-системы ПЦР-РВ(и) показала, что коэффициент вариации пороговых циклов внутри одной постановки по каждому образцу по всем каналам при постановке на всех использованных в испытании амплификаторах не превышал 1,31%, что свидетельствует о высокой внутрипостановочной сходимости результатов (Приложение №5).

Оценка межпостановочной воспроизводимости для разработанной тест-системы ПЦР-РВ(и) показала полное совпадение результатов, полученных двумя исследователями: все заведомо положительные образцы были определены как положительные на целевой вид микобактерий, заведомо отрицательные - как отрицательные. Коэффициент вариации пороговых циклов, полученный в 5-ти повторностях для каждого образца двумя исследователями по всем каналам при постановке на всех использованных в испытании амплификаторах, не превышал 2,64%, что свидетельствует о высокой межсерийной воспроизводимости результатов (Приложение №7).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Увеличение частоты заболеваемости микобактериозом во всём мире [25, 37, 70, 208, 210, 252, 260, 286] обуславливает необходимость инструментов точной и быстрой диагностики микобактериоза, дифференциальной диагностики микобактериоза и туберкулёза и видовой идентификации НТМБ.

В настоящее время наиболее быстрыми методами, позволяющими выявлять и дифференцировать НТМБ от МБТК и идентифицировать НТМБ до вида с максимальными специфичностью и чувствительностью, являются молекулярно-генетические. В России не производят тест-системы для быстрой и недорогой детекции НТМБ и их видовой идентификации. Зарубежные аналоги ранее были представлены на отечественном рынке дорогостоящими тест-системами Genotype Mycobacterium CM/AS немецкой компании Hain Lifescience, основанными на технологии Line Probe Assay (LPA) [18, 190]. Определение вида НТМБ с её использованием - многоэтапный трудоёмкий процесс, требующий не менее 4х часов работы оператора при минимальном общем времени анализа 5 часов. К настоящему времени компания Hain Lifescience ушла с отечественного рынка, а производимые ей тест-системы и оборудование не доступны в России.

Настоящая диссертационная работа посвящена проблемам разработки молекулярно-генетических тест-систем для одновременного выявления НТМБ и МБТК и их дифференциации и идентификации НТМБ до вида. В результате представленного исследования были разработаны две тест-системы, основанные на технологии ПЦР-РВ: тест-система ПЦР-РВ(д) для одновременного выявления ДНК МБТК и НТМБ в одном образце клинического материала/культуры и тест-система ПЦР-РВ(и) для видовой идентификации клинически значимых видов НТМБ в образцах культур и клинического материала от больных.

Для разработки этих тест-систем были отобраны и изучены локусы, не использовавшиеся ранее другими исследователями для реализации поставленных задач, что позволило добиться высокой специфичности и чувствительности итоговых методов молекулярной диагностики.

Разработанная тест-система ПЦР-РВ(д) представляет собой систему

праймеров и зондов, специфичную к микроорганизмам, относящимся к группе НТМБ, и дифференцирующую их от МБТК и других микроорганизмов, добавленную и адаптированную к реакционной смеси набора реагентов «Амплитуб-РВ-скрин» (Синтол, Россия) для выявления ДНК МБТК. Такое решение обеспечило возможность выявления и дифференциации друг от друга НТМБ и МБТК в одной пробирке. Для проведения анализа с помощью тест системы ПЦР-РВ(д) со стороны оператора необходимо только добавление в реакционную смесь исследуемой ДНК, что значительно снижает риск ошибок, связанных с человеческим фактором.

В рамках представленного исследования были проанализированы эпидемиологические данные по распространённости НТМБ на территории ряда областей РФ. Получены данные о видовой принадлежности штаммов, выделенных от больных с подозрением на туберкулёз и микобактериоз лёгких, проходивших диагностику и/или лечение в ФГБНУ «ЦНИИТ» и лабораториях противотуберкулезных учреждений 17 региональных центров РФ. Были отобраны клинически значимые виды НТМБ для дальнейшей разработки тест-системы для видовой идентификации НТМБ. На основе результатов изучения внутривидовой вариабельности локусов, выбранных для разработки тест-системы, в геномах клинических штаммов от больных и геномах, депонированных другими исследователями в базу данных GenBank NCBI, были разработаны 4 специфические мультиплексированные реакционные смеси, включающие в свой состав ДНК ВПК и специфичные к нему праймеры и зонд, для идентификации 12 клинически значимых видов НТМБ: *M.avium*, *M.abscessus*, *M.chelonae*, *M.fortuitum*, *M.gordonaе*, *M.intracellulare*, *M.kansasii*, *M.lentiflavum*, *M.mucogenicum*, *M.peregrinum*, *M.smegmatis*, *M.xenopi*. Для того, чтобы образцы культур НТМБ, принадлежащих к видам, не входящим в панель, детектируемую разработанными специфическими реакционными смесями, не выбраковывались из анализа, в дизайн тест-системы включена контрольная пробирка, обеспечивающая детекцию ДНК МБТК и ДНК НТМБ. Состав контрольной пробирки соответствует составу тест-системы ПЦР-РВ(д). Тест-система ПЦР-РВ(и) представляет собой 5

пробирок, содержащих специфические реакционные смеси, каждая из которых детектирует 4 мишени по 4м каналам флуоресценции.

Разработанные тест-системы были испытаны на выборках диагностического материала, полученного от больных, проходящих диагностику в ФГБНУ «ЦНИИТ», достаточного объёма. Испытания тест-системы ПЦР-РВ(д) для одновременного выявления ДНК МБТК и НТМБ в одном образце диагностического материала/культуры проводили на 301 образце культур НТМБ и 500 образцах культур МБТК, выделенных из респираторного материала от больных, 3757 образцах клинического материала от 1416 пациентов с диагнозом туберкулёз лёгких, 609 образцах клинического материала от 190 пациентов с подтверждённым диагнозом микобактериоз и 380 образцов от клинического материала 267 пациентов с другими заболеваниями лёгких. Испытания тест-системы ПЦР-РВ(и) для видовой идентификации клинически значимых видов НТМБ проводили на 343 образцах от 185 больных с подозрением на микобактериоз или диагнозом кистозный фиброз, 513 образцов от 513 пациентов с верифицированным диагнозом туберкулез легких, 117 образцов от 117 пациентов с заболеваниями легких немикобактериальной этиологии.

Для разработанной тест-системы ПЦР-РВ(д) для одновременного выявления ДНК МБТК и НТМБ в одном образце клинического материала/культуры была показана 100% специфичность в отношении ДНК МБТК и НТМБ, выделенной как из культур, так и непосредственно из клинического материала от больных. Чувствительность в отношении ДНК микобактерий, выделенной из культур, составила 100%. Чувствительность в отношении ДНК, выделенной из клинического материала, рассчитанная исходя из количества больных, положительных по результатам анализа, составляет 93,5% к ДНК МБТК и 74,2% - к ДНК НТМБ. Прогностическая ценность положительного результата анализа составляет 100%, отрицательного результата – 89,2%.

Необходимо отметить, что было показано отсутствие влияния количественного содержания ДНК человека в образцах клинического материала на амплификацию ДНК НТМБ при анализе этих образцов с использованием

разработанной тест-системы. Чувствительность разработанной тест-системы к образцам ДНК НТМБ, выделенным из клинического материала, сопоставима с чувствительностью ряда тест-систем, предназначенных для выявления микобактериальной ДНК, описанных в литературе. Так, ПЦР-РВ тест-система, разработанная Abdelaim и соавторами в качестве альтернативы тест-системе Roche Cobas Amplicor (Roche, Швейцария) обладает 60% чувствительностью к ДНК МБТ и 40% чувствительностью к ДНК НТМБ, выделенной из клинического материала [61]. Ещё для двух описанных в литературе тест-систем, предназначенных для одновременного выявления ДНК МБТ и НТМБ в образцах клинического материала, данные по чувствительности к ДНК МБТ и ДНК НТМБ не приведены, а рассчитана чувствительность к ДНК микобактерий в общем. Так, чувствительность и специфичность к ДНК микобактерий корейской тест-системы AdvanSure TB/NTM для одновременного выявления МБТ и НТМБ по сравнению с культуральным методом составили 67,8% и 98,3% соответственно [105], а тест-системы Anyplex MTB/NTM (Seegen, Корея), также предназначенной для одновременного выявления ДНК МБТК и НТМБ в образцах культур и клинического материала от больных, - 86% и 99% относительно посева на ВАСТЕС соответственно [247]. При этом чувствительность последней версии тест-системы Anyplex MTB/NTM (Seegen, Корея) к ДНК микобактерий, выделенной из клинического материала, составила 79,7% для МБТ и 44,9% для НТМБ [265]. Детекция НТМБ в двух последних описанных тест-системах происходит по одному из локусов, используемых для детекции МБТ, что исключает возможность выявления ко-инфекции МБТ и НТМБ. Их чувствительность сопоставима с чувствительностью разработанной тест-системы к ДНК микобактерий, выделенной из клинического материала, которая составляет 86,5% при специфичности 100% и с чувствительностью, посчитанной отдельно к ДНК НТМБ и МБТК. Чувствительность разработанной тест-системы ПЦР-РВ(д) для одновременного выявления ДНК НТМБ и МБТК в одной пробе к ДНК МБТК, выделенной из образцов клинического материала от больных, составляет 91,6%, а к ДНК НТМБ – 50,3%.

Предел обнаружения разработанной тест-системой ПЦР-РВ(д) LoD95% для *M. tuberculosis* H37Rv составил 16 КОЕ/мл, предел обнаружения LoD95% для *M. avium* составил 1200 КОЕ/мл.

Оценка взаимного влияния амплификации специфических участков геномов НТМБ и МБТК показала отсутствие влияния амплификации ДНК НТМБ на амплификацию в той же пробирке ДНК МБТК даже при соотношении 100000:1. Разработанная тест-система ПЦР-РВ(д) позволяет выявлять смешанные штаммы МБТК и НТМБ в диагностическом материале и культурах от больных, что является преимуществом перед имеющимися зарубежными аналогами [61, 247, 261]. Отсутствие возможности выявления смесей может повлечь за собой некорректную постановку теста на лекарственную чувствительность и, как следствие, назначение больному неэффективного режима антибиотикотерапии [74, 147, 200].

Возможность выявления смешанных культур является преимуществом разработанной тест-системы перед зарубежными аналогами, основанными на технологии ПЦР-РВ, не предусматривающими проведения электрофореза или плавления продуктов амплификации по окончанию реакции, дизайн которых позволяет идентифицировать корректно только чистые культуры НТМБ и МБТК [61, 247, 261]. Один из олигонуклеотидных флуоресцентных зондов, входящих в состав их реакционных смесей, специфичен к микроорганизмам из рода *Mycobacterium*, принадлежащим как к МБТК, так и к НТМБ, и не является дифференцирующим, второй выявляет МБТК, таким образом смешанные культуры выглядят при анализе так же как культуры МБТК. Ложная идентификация смешанной культуры МБТК и НТМБ как чистой культуры МБТК при постановке теста на лекарственную чувствительность микробиологическими методами может привести к неверным результатам теста и назначению пациенту неадекватной схемы лечения [74, 200].

В дизайне тест-системы, основанной на ПЦР-РВ с дальнейшим плавлением продуктов амплификации, разработанной в одной из корейских лабораторий для внутреннего использования, был сделан упор на одновременное

выявление МБТК и НТМБ в культурах [161, 166]. Однако, дизайн предусматривал выявление каждого вида НТМБ по пику плавления в индивидуальном диапазоне температур, и не для всех видов удалось достоверно установить среднюю температуру плавления. Кроме того, установленная аналитическая чувствительность выявления смесей МБТК и НТМБ этим методом значительно отличалась для разных видов. Так, для смеси МБТК и *M.abscessus*, достоверно выявляли модельный образец ДНК с максимальным соотношением МБТК к *M.abscessus* равным 1:2000, а для смеси МБТК и *M.avium* - 1:3 [161]. Тест-система для одновременного выявления МБТК и НТМБ, разработанная в результате данного исследования, позволяет выявлять ДНК МБТК в смеси с ДНК НТМБ при соотношении 1:100000, а ДНК НТМБ в смеси с ДНК МБТК в соотношении 1:10000.

Следует подчеркнуть, что клиническая чувствительность разработанной тест-системы ПЦР-РВ(д) сопоставима с наиболее чувствительной на сегодняшний день молекулярно-генетической тест-системой для выявления ДНК МБТ XtracTB Assay [254] и выше чувствительности тест-системы Xpert MTB/RIF (Cepheid, США), которую используют для быстрой диагностики туберкулёза во всём мире, в том числе и в России [2, 8, 23, 188]. При этом разработанная в ходе представленного диссертационного исследования молекулярно-генетическая тест-система позволяет наряду с МБТ выявлять и НТМБ, что в связи с увеличением распространенности микобактериоза является актуальной задачей [264].

Анализ внутрипостановочной сходимости для тест-системы ПЦР-РВ(д) на амплификаторах CFX96 (BioRad Laboratories, Inc, США); ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) и АНК 32 М (ФГБУН ИАП РАН, Россия) показал высокую сходимость результатов – коэффициент вариации пороговых циклов ПЦР для пяти повторов каждого из испытуемых образцов по всем каналам не превышал 1,1%. Анализ воспроизводимости результатов, полученных двумя исследователями на той же выборке образцов, каждым – на 3х указанных выше амплификаторах, показал высокую межпостановочную воспроизводимость – коэффициент вариации пороговых циклов ПЦР для пяти повторов каждого из

испытуемых образцов по всем каналам не превышал 1,35%.

Режим терапии для больных микобактериозом подбирают в зависимости от видовой принадлежности возбудителя [85, 249, 271, 297], поэтому инструменты для быстрой и точной идентификации НТМБ до вида необходимы для своевременного подбора режима терапии и её эффективности.

В последние 30 лет был разработан целый ряд молекулярно-генетических тест-систем для видовой идентификации НТМБ. Многие, особенно первые из них, предполагают проведение трудоемких ручных операций конечными пользователями: анализ длин рестриктных фрагментов, гель-электрофорез [95, 237, 251, 283, 299], гибридизацию амплифицированных фрагментов ДНК с олигонуклеотидными зондами, иммобилизованными на микрочипах [321, 324] или нитроцеллюлозных стрипах [193, 240]. К настоящему времени разработан также целый ряд тест-систем для видовой идентификации НТМБ, основанных на ПЦР в режиме реального времени. Большинство из них, однако, предполагают проведение плавления продуктов реакции, в том числе, с высоким разрешением (HRM, high resolution melting) в присутствии флуоресцентного интеркалирующего красителя либо флуоресцентных гибридизационных зондов, комплементарных участкам продуктов реакции. Однако, для близких видов НТМБ, выбор конкретных мишеней, которые можно однозначно различить по кривой плавления, проблематичен, что приводит к ошибочной идентификации близкородственных видов [161, 256]. Даже при выборе достаточно специфических локусов, их температура плавления для разных видов может отличаться незначительно, например, на 0,5°C и менее [99], что накладывает серьезные ограничения на выбор используемого для анализа амплификатора, т.к. далеко не для всех приборов такая разница будет больше погрешности измерения, а для амплификаторов, способных детектировать такую разницу температур, необходимо использование дополнительного дорогостоящего программного обеспечения для проведения плавления с высоким разрешением. Поэтому использование тест-систем для видовой идентификации НТМБ, основанных на плавлении продуктов амплификации, в рутинной лабораторной практике может

быть затруднительным, особенно при необходимости внедрения автоматизации интерпретации результатов ПЦР-РВ.

Тест-системы, основанные на ПЦР-РВ, не предполагающие использования плавления продуктов реакции с высоким разрешением, разработанные на сегодняшний день, имеют ряд ограничений. Некоторые из них позволяют определять лишь один или небольшое число видов НТМБ [198, 266, 270], либо предназначены для анализа культур микобактерий и не пригодны для работы с клиническим материалом от пациентов [303].

Тест-система на основе ПЦР-РВ, позволяющая идентифицировать до вида НТМБ в клиническом материале от больных, описана в работе корейских исследователей Кима и др. [180]. Её авторы предложили осуществлять скрининг и идентификацию НТМБ сходным с предложенным в представленном диссертационном исследовании образом. На первом этапе образцы диагностического материала анализируют на наличие ДНК НТМБ и/или МБТК, затем, положительные на наличие ДНК НТМБ образцы последовательно анализируют с использованием 4х мультиплексных ПЦР-смеси для видовой идентификации НТМБ, позволяющие выявлять суммарно 19 видов НТМБ. С одной стороны, эта тест-система позволяет идентифицировать больше видов, чем разработанная нами, с другой – отобранные нами 12 видов НТМБ покрывают спектр клинически значимых НТМБ, распространенных на территории РФ. Чувствительность тест-системы, использующейся на первом этапе диагностики, предложенной Кимом и др. к ДНК НТМБ в клинических образцах от больных составляет 53,3%, в то время как чувствительность тест-системы ПЦР-РВ(д), разработанной нами - 73,1%. Поэтому, если рассматривать эти два способа диагностики в целом, наш имеет значительное преимущество в части выявления НТМБ в образцах клинического материала. Кроме того, только две реакционные смеси, используемые для идентификации НТМБ до вида корейскими исследователями, позволяют детектировать ДНК внутреннего контроля, т.о. использование остальных 2х мультиплексных ПЦР-смеси, не исключают получение ложноотрицательного результата.

Разработанная в результате представленного диссертационного исследования тест-система ПЦР-РВ(и) для видовой идентификации клинически значимых видов НТМБ обеспечивает возможность быстрой и точной идентификации вида 12 НТМБ в образцах культур и клинического материала от больных. Её чувствительность для видовой идентификации НТМБ непосредственно в образцах клинического материала составляет 99,71%, чувствительность для видовой идентификации НТМБ в образцах культур - 99,67% при специфичности 100%. Чувствительность и специфичность для определения МБТ из культур составляет 100%.

Анализ внутрисистемной сходимости для тест-системы ПЦР-РВ(и) на амплификаторах CFX96 (BioRad Laboratories, Inc, США); ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) и АНК 32 М (ФГБУН ИАП РАН, Россия) показал высокую сходимость результатов – коэффициент вариации пороговых циклов ПЦР для пяти повторов каждого из испытуемых образцов по всем каналам не превышал 1,31%. Анализ воспроизводимости результатов, полученных двумя исследователями на той же выборке образцов, каждым – на 3х указанных выше амплификаторах, показал высокую межсистемную воспроизводимость - коэффициент вариации пороговых циклов ПЦР для пяти повторов каждого из испытуемых образцов по всем каналам не превышал 2,64%.

Преимуществом разработанной молекулярно-генетической тест-системы ПЦР-РВ(и) перед единственной зарубежной технологией, представленной до 2022 года на лабораторном рынке РФ Genotype Mycobacterium CM/AS (Hain lifescience, Германия), является существенное сокращение времени анализа с 5-7 часов до 2ч 40 мин, а также отсутствие большого количества ручных манипуляций в протоколе исследования, что сокращает вероятность возникновения ошибок, связанных с человеческим фактором. Кроме того, наиболее распространённый вариант исполнения тест-системы Genotype CM/AS предназначен для работы с ДНК, выделенной из культур микобактерий, в то время как в результате представленного исследования показана возможность идентификации НТМБ до вида с использованием ДНК, выделенной непосредственно из клинического

материала от больного.

Стоит отметить, что при анализе 343 образцов мокроты, полученных от 104 пациентов с подозрением на микобактериоз и положительных на присутствие кислотоустойчивых микроорганизмов по результатам люминисцентной микроскопии, только 305 образцов дали рост культур в системе BASTEC MGIT 960. Т.о. для 38 образцов мокроты от 17 пациентов, содержащих кислотоустойчивые микроорганизмы, удалось выявить НТМБ, дифференцировав их при этом от МБТК, и идентифицировать их до вида, используя исключительно разработанные тест-системы ПЦР-РВ(д) и ПЦР-РВ(и). Это еще раз подчеркивает востребованность высокочувствительных тест-систем для быстрого и точного выявления НТМБ, дифференциации их от МБТК и идентификации НТМБ до вида, применение которых в лабораторной практике позволяло бы не дожидаться роста культуры, в тех случаях, когда это оправдано, а особенно в случаях, когда получить культуру по какой-то причине невозможно.

Наиболее эффективным представляется использование разработанной тест-системы ПЦР-РВ(и) для видовой идентификации НТМБ в образцах клинического материала от пациентов, предположительно выделяющих НТМБ, положительных на присутствие кислотоустойчивых микроорганизмов по результатам анализа методом люминисцентной микроскопии, и идентификации культур, полученных в системе BASTEC MGIT 960.

Внедрение разработанных тест-систем в клиническую практику позволит значительно снизить стоимость лабораторной диагностики микобактериоза и молекулярно-генетической идентификации вида НТМБ, а также сократить время этих исследований в лабораториях противотуберкулёзной лабораторной службы Российской Федерации.

ВЫВОДЫ

1. Разработан дизайн тест-системы для одновременного выявления ДНК нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса методом ПЦР-РВ. Выявлены ДНК-мишени в геномах нетуберкулезных микобактерий, дифференцирующие их от микобактерий туберкулезного комплекса 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. Осуществлен дизайн праймеров и Taq-Man зондов, позволяющих выявлять ДНК-мишени в геномах нетуберкулезных микобактерий, дифференцирующие их от микобактерий туберкулезного комплекса и родственных кислотоустойчивых бактерий, лежащие в генах *meth* и *tuf*.
3. Разработана тест-система ПЦР-РВ(д) для одновременного выявления ДНК нетуберкулезных микобактерий и микобактерий туберкулезного комплекса методом ПЦР-РВ. Значения коэффициента корреляции R^2 и эффективности реакции E для работы всех праймеров, входящих в реакционную смесь разработанной тест-системы, находятся в диапазоне 0.997–0.998 и 98,8 – 103,5% соответственно. Предел обнаружения LoD-балл 95% (LoD95%) для *M. avium* составляет 1200 КОЕ/мл, а для *M. tuberculosis* H37Rv - 16 КОЕ/мл.
4. Разработанная тест-система ПЦР-РВ(д) испытана на образцах культур и диагностического материала от больных. Тест-система ПЦР-РВ(д) характеризуется 100% чувствительностью и специфичностью при выявлении ДНК из культур микобактерий. Тест-система ПЦР-РВ(д) обладает 74,2% чувствительностью для ДНК НТМБ и 93,5% чувствительностью для ДНК МБТК, выделенной непосредственно из диагностического материала, при 100% специфичности и прогностической ценности положительного результата 100%.
5. Разработан дизайн тест-системы для идентификации нетуберкулезных микобактерий. Отобраны 12 клинически значимых видов нетуберкулезных

микобактерий: *M.abscessus*, *M.chelonae*, *M.avium*, *M.gordonaе*, *M.fortuitum*, *M.fortuitum peregrinum*, *M.intracellulare*, *M.kansasii*, *M.lentiflavum*, *M.malmoense*, *M.mucogenicum*, *M.smegmatis*, *M.xenopi*.

6. Выявлены новые, не использовавшиеся ранее ДНК-мишени, позволяющие их идентифицировать, 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.
7. Разработана тест-система ПЦР-РВ(и) для идентификации *M. avium*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonaе*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. lentiflavum*, *M. mucogenicum*, *M. peregrinum*, *M. smegmatis*, *M. xenopi*. Чувствительность тест-системы ПЦР-РВ(и) для идентификации 12 видов НТМБ в образцах культур составила 99,67%, в образцах диагностического материала - 99,71%, при специфичности 100%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В целях повышения эффективности выявления микобактериоза рекомендуется использовать разработанную тест-систему ПЦР-РВ(д) для одновременной дифференциации НТМБ и 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 СОКРАЩЕНИЙ

БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж

БЭБ – бронхоэктатическая болезнь

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

ВПК – внутренний положительный контроль

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

ГЗТ - гиперчувствительности замедленного типа

КУМ – кислотоустойчивые микроорганизмы

ЛЧ – лекарственная чувствительность

МБТК - микобактерии туберкулёзного комплекса

МЛУ – множественная лекарственная устойчивость

НТМБ – нетуберкулёзные микобактерии

ПДРФ – полиморфизм длин рестриктных фрагментов

ПК - персональный компьютер

ПО – программное обеспечение

ППС – плотные питательные среды

ПТП – противотуберкулёзные препараты

ПЦР - полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

среда Л-Й – среда Левенштейна – Йенсена

ХОБЛ – хроническая обструктивная болезнь лёгких

ШЛУ – широкая лекарственная устойчивость

Су5 – Индодикарбоцианин

ФАМ – Карбоксифлуоресцеин

HRM (high resolution melting) – плавление с высоким разрешением

IGRA – interferon gamma release assay - тест, основанный на высвобождении гамма-интерферона

LPA – line probe assay

MAC – *Mycobacterium avium* complex

МАН - *Mycobacterium avium* subspecies *hominissuis*

MAP – *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*

NPV – negative predictive value – прогностическая ценность отрицательного результата

PPV – positive predictive value – прогностическая ценность положительного результата

ROX – Карбокси-X-родамин

R6G – 6-Карбоксиродамин

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алгоритм лабораторной диагностики и мониторинга лечения туберкулеза легких и туберкулеза с лекарственной устойчивостью на основе применения современных быстрых молекулярных методов / М. Дара, Сю Эхсани, Ф. Дробневский, И. Фелькер, С. Хоффнер, Г. Калмамбетова, А. Маргарян, Е. Сагальчик, Э. Севастьянова, Н. Шубладзе, Н. Синавбарова, Е. Скрыгина, Р. Таирли, К. Кремер, С. Руж-Гердес, К. Гилпин, В. Ван Гемерт, Г. Дравнис, Э. Гурбанова // Всемирная организация здравоохранения. Европейское региональное бюро. - 2017. - 29 с.
2. Адамбекова, А.Д. Тест Xpert MTB/RIF для диагностики туберкулеза и устойчивости к рифампицину – результаты внедрения в Кыргызской республике / А.Д. Адамбекова, Д.А. Адамбеков, В.И. Литвинов. – 2014. – № 1. – С. 34-36.
3. Аксенова, В.А. Новые возможности скрининга и диагностики различных проявлений туберкулезной инфекции у детей и подростков в России / В.А. Аксенова, Н.И. Барышникова, Л.А. Клевко // Вопросы современной педиатрии. – 2011. – Т. 10, № 4. – С. 2-7.
4. Аляпкина, Ю.С. Разработка технологии пцр в реальном времени для экспресс-определения лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза к противотуберкулезным препаратам резервного ряда: фторхинолонам, амикацину и капреомицину / Ю.С. Аляпкина, Я.И. Алексеев, Д.А. Варламов, Л.В. Домотенко, Л.К. Шипина, М.А. Владимирский // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2014. – № 12. – С. 69-75.
5. Амансахедов, Р.Б. Рентгеноморфологическая семиотика нетуберкулезных микобактериозов легких / Р.Б. Амансахедов, Л.Н. Лепеха, Л.И. Дмитриева, И.Ю. Андриевская, А.Т. Сигаев, Н.Н. Макарьянц, В.В. Романов, А.Э. Эргешов // Вестник рентгенологии и радиологии. – 2018. – Т. 99, № 4. – С. 184-190.
6. Андреевская, С.Н. Лекарственная чувствительность медленно растущих нетуберкулезных микобактерий / С.Н. Андреевская, Е.Е. Ларионова, Т.Г.

- Смирнова, И.Ю. Андриевская, Е.А. Киселева, Л.Н. Черноусова // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2016. – Т. 94, № 4. – С. 43-50.
7. Бондаренко, В.Н. Клинико-рентгенологическая характеристика микобактериозов легких / В.Н. Бондаренко, В.А. Штанзе, С.В. Гопоняко, Л.В. Золотухина // Проблемы здоровья и экологии. – 2017. – Т. 2, № 52. – С. 38-43.
 8. Буракова, М.В. Совершенствование химиотерапии у больных лекарственно-устойчивым туберкулезом с использованием ускоренного метода определения рифампицин-резистентности «Xpert MTB/RIF» / М.В. Буракова // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2014. – №. 9. – С. 13-14.
 9. Васильева, Е.В. Сравнительная ценность квантиферонового теста, неоптерина и специфических противотуберкулезных антител для клинико-лабораторной диагностики туберкулеза легких / Е.В. Васильева, С.В. Лапин, Т.В. Блинова, И.Ю. Никитина, И.В. Лядова, В.Н. Вербов, А.А. Тотолян // Клиническая лабораторная диагностика. – 2013. – №. 5. – С. 21-26.
 10. Васильева, И.А. Туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью возбудителя в странах мира и в Российской Федерации / И.А. Васильева, Е.М. Белиловский, С.Е. Борисов, С.А. Стерликов // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2017. – Т. 95, № 11. – С. 5-17.
 11. Вишневский, Б.И. Плазмидный профиль микобактерий, распространённых на территории Российской Федерации / Б.И. Вишневский, Е.Б. Вишневская, Т.Ф. Оттен // Проблемы туберкулеза. – 1998. – № 1. – С. 44-46.
 12. Владимирский, М.А. Технология определения и контроля внутрибольничной туберкулёзной инфекции на основе применения нанопористых фильтров и количественной ПЦР / М.А. Владимирский, Л.К. Шипина, Е.С. Макеева, Ю.С. Аляпкина, А.Я. Михеев, В.Н. Морозов // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2015. – № 5. – С. 62-63.
 13. Всемирная организация здравоохранения. Руководство по ведению пациентов с латентной туберкулезной инфекцией [Электронный ресурс] / Всемирная организация здравоохранения. – 2015. – Режим доступа: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/136471/9789244548905_rus.pdf

14. Галкин, В.Б. Динамика распространенности туберкулеза с множественной лекарственной устойчивостью / В.Б. Галкин, С.А. Стерликов, Г.С. Баласанянц, П.К. Яблонский // Туберкулез и болезни легких. – 2017. – Т. 95, № 3. – С. 5-12.
15. Гунтупова, Л. Д. Микобактериозы во фтизиопульмонологической практике: обзор литературы и собственный опыт / Л.Д. Гунтупова, С.Е. Борисов, И.П. Соловьева, М.В. Макарова, Е.Н. Хачатурьянц // Практическая медицина. - 2011. – № 51. – С. 39 – 50.
16. Дыхно, М.М. Сравнительное изучение и методы дифференциации туберкулезных микобактерий, атипичных штаммов и кислотоустойчивых сапрофитов: автореф. дис. докт. вет. наук / М.М. Дыхно. - Москва, 1964. - 32с.
17. Елисеев, П.И. Диагностика и лечение легочного микобактериоза у пациентов с подозрением на туберкулез легких / П.И. Елисеев, А.О. Марьяндышев, И.В. Тарасова, А.Хелдал, С.Г. Хиндеракер // Туберкулез и болезни легких. – 2018. – Т. 96, № 7. – С. 61-62.
18. Елисеев, П.И. Роль молекулярно-генетических методов Genotype в повышении эффективности диагностики туберкулеза с лекарственной устойчивостью микобактерий и микобактериозов: автореф. дис. ...к-та мед. наук. : 14.01.16 / Елисеев Платон Иванович. – СПб., 2013. – 23 с.
19. Киселёв, Е.В. Клинические исследования нового кожного теста «Диаскинтест» для диагностики туберкулеза / В.И. Киселёв, П.М. Барановский, И.В. Рудых, А.М. Шустер, В.А. Мартьянов, Б.Л. Медников, А.В. Демин, А.Н. Александров, А.Ю. Мушкин, Д.Т. Леви, Л.В. Слогоцкая, Е.С. Овсянкина, Н.В. Медуницин, В.И. Литвинов, М.И. Перельман, М.А. Пальцев // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2009. – № 2. – С. 11-16.
20. Культуральные методы диагностики туберкулёза. Учебное пособие для проведения базового курса обучения специалистов бактериологических лабораторий учреждений противотуберкулёзной службы / Под ред. чл.- корр. РАМН, профессора В.В. Ерохина. – Москва: Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2008. – 208 с.

21. Лабораторная диагностика туберкулеза. Методические материалы к проведению цикла тематического усовершенствования / Под ред. чл.- корр. РАМН, профессора В.В. Ерохина. – Москва: Р. Валент, 2012. – 704 с.
22. Ларионова, Е.Е. Информативность полимеразной цепной реакции для диагностики туберкулеза легких: дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Ларионова Елена Евгеньевна. – М. , 2005. – 146 с.
23. Лаушкина, Ж.А. Диагностическая значимость теста Gene Xpert MTB-RIF во фтизиатрической практике / Ж.А. Лаушкина, В.А. Краснов, А.Г. Чередниченко // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2016. – Т. 94, № 10. – С. 37-39.
24. Литвинов, В.И. Выделение и идентификация нетуберкулезных микобактерий / В.И. Литвинов, И.Р. Дорожкова, М.В. Макарова, М.А. Краснова, Г.Е. Фрейман // Вестник РАМН. – 2010. – Т. 3. – С. 7-11.
25. Литвинов, В.И. Нетуберкулезные микобактерии / В.И. Литвинов, М.В. Макарова, М.А. Краснова. – Москва: МНПЦБТ, 2008. – 254 с.
26. Лямин, А.В. Нетуберкулезные микобактерии: современные возможности видовой идентификации / А.В. Лямин, А.М. Ковалёв, Д.Д. Жестков, А.В. Кондратенко, О.В. Исмагуллин // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2017. – Т. 19, № 1. – С. 11-14.
27. Макаревич, Н.М. Атипичные микобактерии: методы идентификации, источники выделения, значение в клинике. автореф. дис. ...д-ра мед.наук / Макаревич Нина Марковна. – М., 1973. – 37 с.
28. Макаревич, Н.М. Чувствительность атипичных микобактерий к различным противотуберкулезным препаратам / Н.М. Макаревич // Сб. научн. тр. – Москва: ЦНИИТ, 1976. – № 20. – С. 148-150.
29. Макарова, М.В. Выделение и идентификация нетуберкулезных микобактерий у пациентов фтизиатрических учреждений: автореф. дис. ...д-ра. мед. наук.: 03.02.03 / Макарова Марина Витальевна – М., 2010. – 48 с.
30. Макарова, М.В. Идентификация микробактерий методом высокоэффективной жидкостной хроматографии / М.В. Макарова, М.А. Краснова, А.М. Мороз //

- Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2009. – № 3. – С. 64-66.
31. Молофеев, А.Н. Современные тенденции в эпидемиологии туберкулеза: автореф. дис. ...д-ра мед. наук: 14.00.26 / Молофеев Анатолий Николаевич. – М., 2004 – 39 с.
 32. Найманов, А.Х. Паратуберкулез крупного рогатого скота / А.Х. Найманов, Н.Г. Толстенко, Е.П. Вангели, Н.К. Букова, М.С. Калмыкова// Ветеринария. – 2014. – Т. 1. – С. 3-9.
 33. Нечаева, О.Б. Эпидемическая ситуация по туберкулезу среди лиц с ВИЧ-инфекцией в российской федерации / О.Б. Нечаева // Туберкулез и болезни легких. – 2017. – Т. 95, № 3. – С. 13-19.
 34. Носова, Е. Ю. Молекулярно-генетическое определение *Mycobacterium tuberculosis* у больных различными формами туберкулеза: дис. ...к-та мед. наук. : 03.00.07 / Носова Елена Юрьевна. – М., 2002. – 77 с.
 35. Определитель бактерий Берджи. В 2-х т. Т. 2: Пер. с англ / под ред. Д. Хоулт, Н. Криг, П. Снит, Дж. Стейли, С. Уилльямс – Москва: Мир, 1997. – 386 с.
 36. Оттен, Т.Ф. Возможности и перспективы бактериологической диагностики микобактериоза / Т.Ф. Оттен, И.В. Макроусов, О.В. Нарвская // Проблемы туберкулёза и болезней лёгких. – 2004. – №. 5. – С. 32-35.
 37. Оттен, Т.Ф. Микобактериоз / Т.Ф. Оттен, А.В. Васильев. – СПб: Медицинская пресса, 2005. – 224 с.
 38. Оттен, Т.Ф. Микобактериоз легких: клинико-бактериологические критерии диагностики / Т.Ф. Оттен // БЦЖ. – 1999. – №. 3. – С. 17-19.
 39. Оттен, Т.Ф. Особенности бактериологической диагностики и этиотропной терапии микобактериозов легких: автореф. дис. ...д-ра мед. наук.: 14.00.26 / Оттен Татьяна Фердинандовна. – Спб., 1994. – 41с.
 40. ООО «ТестГен». Инструкция. Набор реагентов для качественного выявления ДНК микобактерий туберкулёзного и нетуберкулёзного комплекса и их дифференциации методом мультиплексной ПЦР-РВ «МТВ-тест» по ТУ

21.20.23-023-97638376-2020.

—

Режим

доступа:

<https://testgen.ru/upload/iblock/360/wlq020hqqp8ra73atbdgqnqhj2bvuihy.pdf>

41. Петри, А. Наглядная медицинская статистика: учебное пособие для вузов / А. Петри, К. Сэбин; под ред. перераб. и доп. Леонова, пер. с англ. под ред. В.П. - 2-е изд. – Москва: Гэотар-Медиа, 2010. – 168 с.
42. Приказ МЗ РФ №109 от 21 марта 2003 г. «О совершенствовании противотуберкулёзных мероприятий в Российской Федерации».
43. Приказ МЗ РФ №951 от 29 декабря 2014 г. «Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания».
44. Поликарпова, С.В. Микрофлора дыхательных путей у больных муковисцидозом и чувствительность к антибиотикам в 15-летнем наблюдении (2000–2015 гг.) / С.В. Поликарпова, Е.И. Кондратьева, Л.А. Шабалова, Н.В. Пивкина, С.В. Жилина, А.Ю. Воронкова, В.Д. Шерман, В.С. Никонова, Н.И. Капранов, Н.Ю. Каширская, С.Ю. Семькин, Е.Л. Амелина, С.А. Красовский // Медицинский совет. – 2016. – № 15. – С. 84-89.
45. Самсонова, М.В. Гранулематозные заболевания легких / М.В. Самсонова, А.Л. Черняев // Пульмонология. – 2017. – Т. 27, № 2. – С. 250-261.
46. Соловьева, Н.С. Бактериологическая и молекулярно-генетическая верификация бактериемии у ВИЧ-инфицированных больных / Н.С. Соловьева, Т.Ф. Оттен, В.Ю. Журавлев, Н.Н. Гащенко, М.В. Шульгина // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2014. – Т. 16, № 4. – С. 248-253.
47. Соломай, Т.В. Эпидемиологические особенности микобактериозов, вызванных нетуберкулёзными микобактериями / Т.В. Соломай // Санитарный врач. – 2015. — №3. — С. 30-36.
48. Старшинова, А.А. Результаты применения иммунологических тестов нового поколения у детей в условиях массовой вакцинации против туберкулеза / А.А. Старшинова, С. М. Ананьев, Ю. Э. Овчинникова, Н. В. Корнева, И. Ф. Довгалоук // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2017. – Т. 95, № 5. — С. 46-52.

49. Струков, А.И. Морфология туберкулеза в современных условиях / А.И. Струков, И.П. Соловьева. – Москва: Медицина, 1976. – 256 с.
50. Туберкулёз органов дыхания у детей и подростков: руководство для врачей / под ред. А.Э. Эргешов, Е.С. Овсянкина, М.Ф. Губкина. – Москва, 2019. – 524 с.
51. Туберкулёз органов дыхания: руководство для врачей / под ред. А.Э. Эргешов. – Москва: Галлея-Принт, 2017. – 523 с.
52. Федеральные клинические рекомендации по организации и проведению микробиологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулёза. РОФ. – Москва: ООО "Издательство “Триада”, 2015. – 46 с.
53. Фтизиатрия. Национальное руководство / под ред. М.И. Перельман. – Москва: Гэотар-Медиа, 2010. – 512 с.
54. Фтизиатрия. Национальные клинические рекомендации / под ред. П.К. Яблонский. – Москва: Гэотар-Медиа, 2016. – 240 с.
55. Черников, А.Ю. Эффективность лечения больных туберкулезом с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя в сочетании с хронической обструктивной болезнью легких / А.Ю. Черников, Л.Г. Земляных // Вестник ЦНИИТ. – 2018. – №4 (5). - С. 24 – 31.
56. Черноусова, Л.Н. Роль ПЦР анализа в комплексных бактериологических исследованиях во фтизиатрии / Л.Н. Черноусова, Е.Е. Ларионова, Э.В. Севастьянова // Проблемы туберкулеза. – 2001. – Т.3. – С. 58-60.
57. Шагинян, И.А. Эпидемиологические особенности хронической инфекции легких у больных муковисцидозом / И.А. Шагинян, М. Ю. Чернуха, Л. Р. Аветисян, Е. А. Сиянова, Д. Г. Кулястова, О. С. Медведева, Т. В. Припутневич, Д. Ю. Трофимов, А. В. Гордеев, Е. И. Кондратьева, Е. Л. Амелина, С. А. Красовский // Эпидемиология и Вакцинопрофилактика. – 2017. – Т. 16, № 6. – С. 5-13
58. Шуляк, Б.Ф. 110 лет со дня открытия возбудителя паратуберкулёза / Б.Ф. Шуляк // Российский ветеринарный журнал. – 2005. – Т. 9. – С. 238-239.
59. Эргешов, А.Э. Микобактериозы в практике врачей пульмонологов и фтизиатров / А.Э. Эргешов, Е.И. Шмелев, М.Н. Ковалевская, Н.Л. Карпина, Е.Е.

- Ларионова, Л.Н. Черноусова // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2016b. – Т. 94. – № 9. – С. 39-43.
60. Эргешов, А.Э. Нетуберкулезные микобактерии у пациентов с заболеваниями органов дыхания (клиниколабораторное исследование) / А.Э. Эргешов, Е.И. Шмелев, М.Н. Ковалевская, Е.Е. Ларионова, Л.Н. Черноусова // Пульмонология. – 2016. – Т. 26, № 3. – С. 303-308.
61. Abdeldaim, G. Duplex detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex and medically important non-tuberculosis mycobacteria by real-time PCR based on the *rnpB* gene / G. Abdeldaim, E. Svensson, J. Blomberg, B. Herrmann // APMIS. – 2016. – Vol. 124, № 11. – P. 991-995.
62. Abe, C. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical specimens by polymerase chain reaction and gen-probe amplified mycobacterium tuberculosis direct test / C. Abe, K. Hirano, M. Wada, Y. Kazumi, M. Takahashi, Y. Fukasawa, T. Yoshimura, C. Miyagi, S. Goto // Journal of Clinical Microbiology. – 1993. – Vol. 31, № 12. – P. 3270 - 3274.
63. Abe, C. Simple and rapid identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by immunochromatographic assay using anti-MPB64 monoclonal antibodies / C. Abe, K. Hirano, T. Tomiyama // Journal of Clinical Microbiology. – 1999. – Vol. 37, № 11. – P. 3693 – 3697.
64. Adékambi, T. Dissection of phylogenetic relationships among 19 rapidly growing *Mycobacterium* species by 16S rRNA, *hsp65*, *sodA*, *recA* and *rpoB* gene sequencing / T. Adékambi, M. Drancourt // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2004. – Vol. 54 (Pt. 6). – P. 2095 – 2105.
65. Adjemian, J. Prevalence of nontuberculous mycobacterial lung disease in U.S. medicare beneficiaries / J. Adjemian, K.N. Olivier, A.E. Seitz, S.M. Holland, D.R. Prevots // American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2012. – Vol. 185, № 8. – P. 881 – 886.
66. Al Houqani, M. Isolation prevalence of pulmonary nontuberculous mycobacteria in Ontario in 2007 / M. Al Houqani, F. Jamieson, P. Chedore, M. Mehta, K. May, T.K. Marras // Canadian Respiratory Journal. – 2011. – Vol. 18, № 1. – P. 19 – 24.

67. Alhagamhmad, M. H. An overview of the bacterial contribution to Crohn disease pathogenesis / M. H. Alhagamhmad, A.S. Day, D.A. Lemberg, S.T. Leach // Journal of medical microbiology. – 2016. – Vol. 65, № 10. – P. 1049 – 1059.
68. Alkhovik, O. Detection of nontuberculous mycobacteria in Siberian region / O. Alkhovik, M. Dymova, T. Petrenko // European Respiratory Journal. Conference: European Respiratory Society Annual Congress. – 2013. - Vol. 42. – P. 4421.
69. Alvarez-Uria, G. Lung disease caused by nontuberculous mycobacteria / G. Alvarez-Uria // Current opinion in pulmonary medicine. – 2010. – Vol. 16, № 3. – P. 251 – 256.
70. Andréjak, C. Chronic respiratory disease, inhaled corticosteroids and risk of non-tuberculous mycobacteriosis / C. Andréjak, R. Nielsen, V.Ø. Thomsen, P. Duhaut, H.T. Sørensen, R.W. Thomsen // Thorax. – 2013. – Vol. 68, № 3. – P. 256 – 262.
71. Andrews, S. FastQC - A quality control tool for high throughput sequence data. [Электронный ресурс] / S. Andrews // 2010. Режим доступа: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>
72. Arnow, P. M. Endemic Contamination of Clinical Specimens by *Mycobacterium gordonae* / P. M. Arnow, M. Bakir, K. Thompson, J.L. Bova // Clinical Infectious Diseases. – 2000. – Vol. 31, № 2. – P. 472 - 476.
73. Atkins, B.L. Skin and soft tissue infections caused by nontuberculous mycobacteria / B.L. Atkins, T. Gottlieb // Current opinion in infectious diseases. – 2014. – Vol. 27, № 2. – P. 137 – 145.
74. Aliyu, G. Prevalence of Non-Tuberculous Mycobacterial Infections among Tuberculosis Suspects in Nigeria / G. Aliyu, S.S. El-Kamary, A. Abimiku, C. Brown, K. Tracy, L. Hungerford, W. Blattner // Plos one. – 2013. – Vol. 8, № 5: e63170.
75. Ba, F. A comparison of fluorescence microscopy with the Ziehl-Neelsen technique in the examination of sputum for acid-fast bacilli / F. Ba, H.L. Rieder // International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. – 1999. – Vol. 3, № 12. – P. 1101 – 1105.
76. Bai, Y. GenoType MTBDRplus assay for rapid detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: A meta-analysis / Y. Bai, Y. Wang, C. Shao, Y. Hao, Y. Jin // PLoS ONE. – 2016. – Vol. 11, № 3: e0150321.

77. Blanc, P. Nontuberculous Mycobacterial infections in a French Hospital: A12-year retrospective study / P. Blanc, H. Dutronc, O. Peuchant, F.A. Dauchy, C. Cazanave, D. Neau, G. Wirth, J.L. Pellegrin, P. Morlat, P. Mercié, J.M. Tunon-de-Lara, M.S. Doutre, P. Pélissier, M. Dupon // PLoS ONE. – 2016. – Vol. 11, № 12: e0168290.
78. Bodmer, T. Evaluation of the COBAS AMPLICOR MTB system / T. Bodmer, A. Gurtner, M. Scholkmann, L. Matter // Journal of Clinical Microbiology. – 1997. – Vol. 35, № 6. – P. 1604 – 1605.
79. Boehme, C.C. Rapid Molecular Detection of tuberculosis and Rifampin Resistance / C.C. Boehme, P. Nabeta, D. Hillemann, M.P. Nicol, S. Shenai, F. Krapp, J. Allen, R. Tahirli, R. Blakemore, R. Rustomjee, A. Milovic, M. Jones, S.M. O'Brien, D.H. Persing, S. Ruesch-Gerdes, E. Gotuzzo, C. Rodrigues, D. Alland, M.D. Perkins // New England Journal of Medicine. – 2010. – Vol. 363, № 11. – P. 1005 – 1015.
80. Boritsch, E. C. A glimpse into the past and predictions for the future: The molecular evolution of the tuberculosis agent / E. C. Boritsch, P. Supply, N. Honoré, T. Seemann, T.P. Stinear, R. Brosch // Molecular microbiology. – 2014. – Vol. 93, № 5. – P. 835 – 852.
81. Brisson-Noël, A. Diagnosis of tuberculosis by DNA amplification in clinical practice evaluation / A. Brisson-Noël, C. Aznar, C. Chureau, S. Nguyen, C. Pierre, M. Bartoli, R. Bonete, G. Pialoux, B. Gicquel, G. Garrigue // The Lancet. – 1991. – Vol. 338, № 8763. – P. 364 - 366.
82. Brode, S. K. The risk of mycobacterial infections associated with inhaled corticosteroid use / S.K. Brode, M.A. Campitelli, J.C. Kwong, H. Lu, A. Marchand-Austin, A.S. Gershon, F.B. Jamieson, T.K. Marras // European Respiratory Journal. – 2017a. – Vol. 50, № 3: 1700037.
83. Brode, S. K. Pulmonary versus nonpulmonary nontuberculous mycobacteria, Ontario, Canada / S.K. Brode, A. Marchand-Austin, F.B. Jamieson, T.K. Marras // Emerging Infectious Diseases. – 2017b. – Vol. 23, № 11. – P. 1898 – 1901.
84. Brode, S.K. The epidemiologic relationship between tuberculosis and nontuberculous mycobacterial disease: A systematic review / S.K. Brode, C.L. Daley,

- T.K. Marras // The international journal of tuberculosis and lung disease. – 2014. – Vol. 18, № 11. – P. 1370 – 1377.
85. Brown-Elliott, B. A. Antimicrobial susceptibility testing, drug resistance mechanisms and therapy of infections with nontuberculous mycobacteria / B.A. Brown-Elliott, K.A. Nash, R.J. Wallace // Clinical microbiology reviews. – 2012. – Vol. 25, № 3. – P. 545 – 582.
86. Bruijnesteijn Van Coppenraet, E.S. Real-time PCR assay using fine-needle aspirates and tissue biopsy specimens for rapid diagnosis of mycobacterial lymphadenitis in children / E.S. Bruijnesteijn Van Coppenraet, J.A. Lindeboom, J.M. Prins, M.F. Peeters, E.C. Claas, E.J. Kuijper // Journal of Clinical Microbiology. – 2004. – Vol. 42, № 6. – P. 2644 – 2650.
87. Brunello, F. Identification of 54 mycobacterial species by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene / F. Brunello, M. Ligozzi, E. Cristelli, S. Bonora, E. Tortoli, R. Fontana // Journal of clinical microbiology. – 2001. – Vol. 39, № 8. – P. 2799-2806.
88. Bryant, J. M. Emergence and spread of a humantransmissible multidrug-resistant nontuberculous mycobacterium / J. M. Bryant, D.M. Grogono, D. Rodriguez-Rincon, I. Everall, K.P. Brown, P. Moreno, D. Verma, E. Hill, J. Drijkoningen, P. Gilligan, C.R. Esther, P.G. Noone, O. Giddings, S.C. Bell, R. Thomson, C.E. Wainwright, C. Coulter, S. Pandey, M.E. Wood, R.E. Stockwell, K.A. Ramsay, L.J. Sherrard, T.J. Kidd, N. Jabbour, G.R. Johnson, L.D. Knibbs, L. Morawska, P.D. Sly, A. Jones, D. Bilton, I. Laurenson, M. Ruddy, S. Bourke, I.C. Bowler, S.J. Chapman, A. Clayton, M. Cullen, T. Daniels, O. Dempsey, M. Denton, M. Desai, R.J. Drew, F. Edenborough, J. Evans, J. Folb, H. Humphrey, B. Isalska, S. Jensen-Fangel, B. Jönsson, A.M. Jones, T.L. Katzenstein, T. Lillebaek, G. MacGregor, S. Mayell, M. Millar, D. Modha, E.F. Nash, C. O'Brien, D. O'Brien, C. Ohri, C.S. Pao, D. Peckham, F. Perrin, A. Perry, T. Pressler, L. Prtak, T. Qvist, A. Robb, H. Rodgers, K. Schaffer, N. Shafi, J. van Ingen, M. Walshaw, D. Watson, N. West, J. Whitehouse, C.S. Haworth, S.R. Harris, D. Ordway, J. Parkhill, R.A. Floto // Science. – 2016. – Vol. 354, № 6313. – P. 751 – 757.

89. Bryant, J.M. Whole-genome sequencing to identify transmission of *Mycobacterium abscessus* between patients with cystic fibrosis: A retrospective cohort study / J.M. Bryant, D.M. Grogono, D. Greaves, J. Foweraker, I. Roddick, T. Inns, M. Reacher, C.S. Haworth, M.D. Curran, S.R. Harris, S.J. Peacock, J. Parkhill, R.A. Floto // *The Lancet*. – 2013. – Vol. 381 (9877). – P. 1551 – 1560.
90. Butler, W.R. High-performance liquid chromatography of mycolic acids as a tool in the identification of *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Rhodococcus*, and *Mycobacterium* species / W.R. Butler, D.G. Ahearn, J.O. Kilburn // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1986. – Vol. 23, № 1. – P. 182 – 185.
91. Butler, W.R. Mycolic acid analysis by high-performance liquid chromatography for identification of mycobacterium species / W.R. Butler, L.S. Guthertz // *Clinical microbiology reviews*. – 2001. – Vol. 14, № 4. – P. 704 – 726.
92. Cave, M. D. IS6110: Conservation of sequence in the *Mycobacterium tuberculosis* complex and its utilization in DNA fingerprinting / M.D. Cave, K.D. Eisenach, P.F. McDermott, J.H. Bates, J.T. Crawford // *Molecular and Cellular Probes*. – 1991. – Vol. 5, № 1. – P. 73 – 80.
93. Cavusoglu, C. Evaluation of antimicrobial susceptibilities of rapidly growing mycobacteria by Sensititre RAPMYCO panel / C. Cavusoglu, T. Gurpinar, T. Ecemis // *New Microbiologica*. – 2012. – Vol. 35, № 1. – P. 73 – 76.
94. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Update: Nucleic acid amplification tests for tuberculosis / Centers for Disease Control and Prevention (CDC) // *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*. – 2000. – Vol. 49, № 26. – P. 593 – 594.
95. Chae, H. Development of a one-step multiplex PCR assay for differential detection of major *Mycobacterium* species / H. Chae, S.J. Han, S.Y. Kim, C.S. Ki, H.J. Huh, D. Yong, W.J. Koh, S.J. Shin // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2017. – Vol. 55, № 9. – P. 2736 – 2751.
96. Chang, C. T. Identification of nontuberculous mycobacteria existing in tap water by PCR-restriction fragment length polymorphism / C.T. Chang, L.Y. Wang, C.Y. Liao,

- S.P. Huang // Applied and Environmental Microbiology. – 2002. – Vol. 68, № 6. – P. 3159 – 3161.
97. Chazel, M. Evaluation of the SLOMYCO Sensititre® panel for testing the antimicrobial susceptibility of *Mycobacterium marinum* isolates / M. Chazel, H. Marchandin, N. Keck, D. Terru, C. Carrière, M. Ponsoda, V. Jacomo, G. Panteix, N. Bouzinbi, A.L. Bañuls, M. Choisy, J. Solassol, A. Aubry, S. Godreuil // Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. – 2016. – Vol. 15, article number: 30.
 98. Chen, J. H. Advantages of using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry as a rapid diagnostic tool for identification of yeasts and mycobacteria in the clinical microbiological laboratory / J. H. Chen [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2013. – Vol. 51, № 12. – P. 3981 – 3987.
 99. Chen, J. H. Application of a dual target PCR-high resolution melting (HRM) method for rapid nontuberculous mycobacteria identification / J. H. Chen, V.C. Cheng, K.K. She, W.C. Yam, K.Y. Yuen // Journal of Microbiological Methods. – 2017. – Vol. 132. – P. 1 -3.
 100. Chen, J. H. Performance of the new automated Abbott RealTime MTB assay for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens / J.H. Chen, K.K. She, T.C. Kwong, O.Y. Wong, G.K. Siu, C.C. Leung, K.C. Chang, C.M. Tam, P.L. Ho, V.C. Cheng, K.Y. Yuen, Yam W.C. // European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – 2015. – Vol. 34, № 9. – P. 1827 – 1832.
 101. Cheng, A.C. Mycobacterial infections due to contaminated heater cooler units used in cardiac bypass: An approach for infection control practitioners / A.C. Cheng, A.J. Stewardson, B.G. Mitchell, P. Collignon, P.D. Johnson, R.L. Stuart // Infection, Disease and Health. – 2016. – Vol. 21, № 4. – P. 154 – 161.
 102. Chetchotisakd, P. Disseminated Nontuberculous Mycobacterial Infection in Patients Who Are Not Infected with HIV in Thailand / P. Chetchotisakd, S. Kiertiburanakul, P. Mootsikapun, S. Assanasen, R. Chaiwarith, S. Anunnatsiri // Clinical Infectious Diseases. – 2007. – Vol. 45, № 4. – P. 421-427.

103. Chiang, C.Y. Management of drug-resistant tuberculosis / C.Y. Chiang, H.S. Schaaf // The international journal of tuberculosis and lung disease. – 2010. – Vol. 14, № 6. – P. 672 – 682.
104. Chikamatsu, K. Comparative evaluation of three immunochromatographic identification tests for culture confirmation of *Mycobacterium tuberculosis* complex / K. Chikamatsu, A. Aono, H. Yamada, T. Sugamoto, T. Kato, Y. Kazumi, K. Tamai, H. Yanagisawa, S. Mitarai // BMC Infectious Diseases. – 2014. - № 14. – P. 54.
105. Cho, W. – H. Comparison of AdvanSure TB/NTM PCR and COBAS TaqMan MTB PCR for Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Complex in Routine Clinical Practice / W. - H. Cho, E.J. Won, H.J. Choi, S.J. Kee, J.H. Shin, D.W. Ryang, S.P. Suh // Annals of laboratory medicine. – 2015. – Vol. 35. – № 3. – P. 356–361.
106. Choe, W. Performance Evaluation of Anyplex plus MTB/NTM and AdvanSure TB/NTM for the Detection of *Mycobacterium tuberculosis* and Nontuberculous Mycobacteria / W. Choe, E. Kim, S.Y. Park, J. D. Chae // Annals of Clinical Microbiology. – 2015. – Vol. 18, № 2. – P. 44-50.
107. Clarridge, J. E. Large-scale use of polymerase chain reaction for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in a routine mycobacteriology laboratory / J.E. Clarridge, R.M. Shawar, T.M. Shinnick, B.B. Plikaytis // Journal of Clinical Microbiology. – 1993. – Vol. 31, № 8. – P. 2049 – 2056.
108. Cleary, T.J. Rapid and specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* by using the Smart Cycler instrument and a specific fluorogenic probe / T.J. Cleary, G. Roudel, O. Casillas, N. Miller // Journal of Clinical Microbiology. – 2003. – Vol. 41, № 10. – P. 4783 – 4786.
109. Colombo, R. E. Familial clustering of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease / R.E. Colombo, S.C. Hill, R.J. Claypool, S.M. Holland, K.N. Olivier // Chest. – 2010. – Vol. 137, № 3. – P. 629 – 634.
110. Comas, I. The past and future of tuberculosis research / I. Comas, S. Gagneux // PLoS Pathogens. – 2009. – Vol. 5, № 10. – P. e1000600.

111. Cook, G. M. Physiology of Mycobacteria / G.M. Cook, M. Berney, S. Gebhard, M. Heinemann, R.A. Cox, O. Danilchanka, M. Niederweis // Advances in Microbial Physiology – 2009. – Vol. 55. – P. 81 – 319.
112. Cosivi, O. Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries / O. Cosivi, J.M. Grange, C.J. Daborn, M.C. Raviglione, T. Fujikura, D. Cousins, R.A. Robinson, H.F. Huchzermeyer, I. de Kantor, F.X. Meslin // Emerging Infectious Diseases – 1998. – Vol.4, №1. – P. 59-70.
113. Cuevas, L. E. LED fluorescence microscopy for the diagnosis of pulmonary tuberculosis: A multi-country cross-sectional evaluation / L.E. Cuevas, N. Al-Sonboli, L. Lawson, M.A. Yassin, I. Arbide, N. Al-Aghbari, J.B. Sherchand, A. Al-Absi, E.N. Emenyonu, Y. Merid, M.I. Okobi, J.O. Onuoha, M. Aschalew, A. Aseffa, G. Harper, R.M.A. de Cuevas, S.J. Theobald, C-M. Nathanson, J. Joly, B. Faragher, S.B. Squire, A. Ramsay // PLoS Medicine. – 2011. – Vol. 8, № 7: e1001057.
114. Cvetnic, Z. *Mycobacterium caprae* in cattle and humans in Croatia / Z. Cvetnic, V. Katalinic-Jankovic, B. Sostaric, S. Spicic, M. Obrovac, S. Marjanovic, M. Benic, B.K. Kirin, I. Vickovic // International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. – 2007. – Vol. 11, № 6. – P. 652-658.
115. Da Silva, D.A. Advances in the Diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* Infection: Volume 2: Applications / D. A. da Silva, L.C. de Pina, A.M. Rego, N.V. Ferreira // Advanced Techniques in Diagnostic Microbiology. – Springer, Cham, 2018. – P. 101-135.
116. Da Silva, R.A. Use of PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene for rapid identification of mycobacteria in Brazil / R. A. Da Silva, L.C. da Costa, H.M. Torres, A.B. de Miranda, M.Q. Pires Lopes, W.M. Degraive, P.N. Suffys // Journal of Microbiological Methods. – 1999. – Vol. 37, №3. – P. 223-229.
117. Daley, C.L. Management of Multidrug-Resistant Tuberculosis / C.L. Daley, J.A. Caminero // Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine. – 2018. – Vol. 39, № 3. – P. 310 – 324.

118. Daley, C.L. Pulmonary non-tuberculous mycobacterial infections / C.L. Daley, D.E. Griffith // The international journal of tuberculosis and lung disease. – 2010. – Vol. 14, № 6. – P. 665 – 671.
119. De Almeida, I. N. Evaluation of six different DNA extraction methods for detection of *Mycobacterium tuberculosis* by means of PCR-IS6110: Preliminary study / I. N. De Almeida, W. Da Silva Carvalho, M.L. Rossetti, E.R. Costa, S.S. De Miranda // BMC Research Notes. – 2013. - № 6. – P. 561.
120. De Beenhouwer, H. Detection and identification of mycobacteria by DNA amplification and oligonucleotide-specific capture plate hybridization / H. De Beenhouwer, Z. Liang, P. De Rijk, C. Van Eekeren, F. Portaels // Journal of Clinical Microbiology. – 1995. – Vol. 33, № 11. – P. 2994 – 2998.
121. Debrunner, M. Epidemiology and clinical significance of nontuberculous mycobacteria in patients negative for human immunodeficiency virus in Switzerland / M. Debrunner, M. Salfinger, O. Brändli, A. von Graevenitz // Clinical Infectious Diseases. – 1992. – Vol. 15, № 2. – P. 330 - 345.
122. Delogu, G. The Biology of *Mycobacterium tuberculosis* Infection / G. Delogu, M. Sali, G. Fadda // Mediterranean journal of hematology and infectious diseases. – 2013. – Vol. 5, № 1. – P. e2013070.
123. Desikan, P. Sputum smear microscopy in tuberculosis: Is it still relevant? / P. Desikan // Indian journal of medical research. – 2013. – Vol. 137, № 3. – P. 442 – 444.
124. Detjen, A.K. Xpert MTB/RIF assay for the diagnosis of pulmonary tuberculosis in children: A systematic review and meta-analysis / A.K. Detjen, A. R. DiNardo, J. Leyden, K.R. Steingart, D. Menzies, I. Schiller, N. Dendukuri, A.M. Mandalakas // The Lancet Respiratory Medicine. – 2015. – Vol. 3, № 6. – P. 451 – 461.
125. Devallois, A. Rapid identification of mycobacteria to species level by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the hsp65 gene and proposition of an algorithm to differentiate 34 mycobacterial species / A. Devallois, Khye Seng Goh, N. Rastogi // Journal of Clinical Microbiology. – 1997. – Vol. 35, № 11. – P. 2969-2973.

126. Dheda, K. Tuberculosis / K. Dheda, C. E. Barry 3rd, G. Maartens // Lancet. – 2016. – Vol. 387. – P. 1211-1226.
127. Doré, E. Risk factors associated with transmission of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis to calves within dairy herd: A systematic review / E. Doré, J. Paré, G. Côté, S. Buczinski, O. Labrecque, J.P. Roy, G. Fecteau // Journal of veterinary internal medicine. – 2012. – Vol. 26, № 1. – P. 32 – 45.
128. Dorman, S.E. Xpert MTB/RIF Ultra for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and rifampicin resistance: a prospective multicentre diagnostic accuracy study / S.E. Dorman, S.G. Schumacher, D. Alland, P. Nabeta, D.T. Armstrong, B. King, S.L. Hall, S. Chakravorty, D.M. Cirillo, N. Tukvadze, N. Bablishvili, W. Stevens, L. Scott, C. Rodrigues, M.I. Kazi, M. Joloba, L. Nakiyingi, M.P. Nicol, Y. Ghebrekristos, I. Anyango, W. Murithi, R. Dietze, R.L. Peres, A. Skrahina, V. Auchynka, K.K. Chopra, M. Hanif, X. Liu, X. Yuan, C.C. Boehme, J.J. Ellner, C.M. Denking; study team // The Lancet Infectious Diseases. – 2018. – Vol.18 № 1. – P. 76 – 84.
129. Eruslanov, E. B. Neutrophil responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection in genetically susceptible and resistant mice / E.B. Eruslanov, I.V. Lyadova, T.K. Kondratieva, K.B. Majorov, I.V. Scheglov, M.O. Orlova, A.S. Apt // Infection and Immunity. – 2005. – Vol. 73, № 3. – P. 1744 – 1753.
130. Espy, M.J. Real-time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing / M.J. Espy, J.R. Uhl, L.M. Sloan, S.P. Buckwalter, M.F. Jones, E.A. Vetter, J.D.C Yao, N.L. Wengenack, J.E. Rosenblatt, F.R. Cockerill 3rd, T.F. Smith // Clinical microbiology reviews. – 2006. – Vol. 19, № 3. – P. 595.
131. Falkinham, J. O. 3rd Nontuberculous mycobacteria in the environment / J. O. 3rd Falkinham – 2002. – Vol. 23, № 3. – P. 529 – 551.
132. Falkinham, J. O. 3rd *Mycobacterium avium* in a shower linked to pulmonary disease / J.O. Falkinham, M.D. Iseman, P. de Haas, D. van Soolingen // Journal of Water and Health. – 2008. – Vol. 6, № 2. – P. 209 – 213.

133. Fecteau, M.-E. Paratuberculosis in Cattle / M.-E. Fecteau, R.H. Whitlock // Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice. – 2010. – Vol. 34, № 1. – P. 144-156.
134. Floto, R.A. US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society consensus recommendations for the management of non-tuberculous mycobacteria in individuals with cystic fibrosis / R.A. Floto, K.N. Olivier, L. Saiman, C.L. Daley, J-L. Herrmann, J.A. Nick, P.G. Noone, D. Bilton, P. Corris, R.L. Gibson, S.E. Hempstead, K.Koetz, K.A. Sabadosa, I. Sermet-Gaudelus, A.R. Smyth, J. van Ingen, R.J Wallace, K.L. Winthrop, B.C. Marshall, C.S. Haworth; US Cystic Fibrosis Foundation and European Cystic Fibrosis Society // Thorax. – 2016. – Vol. 71 (suppl. 1). – P. i1 – 22.
135. Foti, C. Cutaneous manifestations of *Mycobacterium gordonae* infection described for the first time in Italy: a case report / C. Foti, V. Sforza, C. Rizzo, G. De Pascale, D. Bonamonte, A. Conserva, A. Tarantino, C. Stella, S. Cantore, R.F. Grassi, A. Ballini, D. De Vito, G. Angelini // Cases Journal. – 2009. – Vol. 2. – P. 6828.
136. Fukushima, M. Detection and identification of Mycobacterium species isolates by DNA microarray / M. Fukushima, K. Kakinuma, H. Hayashi, H. Nagai, K. Ito, R. Kawaguchi // Journal of Clinical Microbiology. – 2003. – Vol. 41, № 6. – P. 2605 – 2615.
137. Gandhi, M.P. Sputum smear microscopy at two months into continuation-phase: Should it be done in all patients with sputum smear-positive tuberculosis? / M.P. Gandhi, A.M. Kumar, M.N. Toshniwal, R.H. Reddy, J.E. Oeltman, S.A. Nair, S. Satyanarayana, P.K. Dewan, S. Mannan // PLoS One. – 2012. –Vol. 7, № 6. - e39296.
138. Garvey, M. *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis: A possible causative agent in human morbidity and risk to public health safety / M. Garvey // Open Veterinary Journal. – 2018. – Vol. 8, № 2. – P. 172-181.
139. Gebert, M. J. Ecological Analyses of Mycobacteria in Showerhead Biofilms and Their Relevance to Human Health / M. J. Gebert, M. Delgado-Baquerizo, A.M.

- Oliverio, T.M. Webster, L.M. Nichols, J.R. Honda, E.D. Chan, J. Adjemian, R.R. Dunn, N. Fierer // *mBio*. – 2018. – Vol. 9, № 5: e01614-18.
140. GenoType CMdirect VER 1.0. Instruction for use. IFU-295-01 [Электронный ресурс]. – Режим доступа: https://www.immunodiagnostic.fi/wp-content/uploads/HAIN-lifescience-CMdirect_kit-insert.pdf.
141. Georgiou, G.A. Probability of Detection (PoD) curves: Derivation, applications and limitations / G.A. Georgiou // *Insight - Non-Destructive Testing and Condition Monitoring*. – 2007. – Vol. 49, № 7. – P. 409 - 414.
142. Gey van Pittius, N.C. ESAT-6 and CFP-10: What Is the Diagnosis? / N.C. Gey van Pittius, R.M. Warren, P.D. van Helden // *Infection and Immunity*. – 2002. – Vol. 70, № 11. – P. 6509 – 6510.
143. Ghadiali, A. H. *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis strains isolated from Crohn's disease patients and animal species exhibit similar polymorphic locus patterns / A.H. Ghadiali, M. Strother, S.A. Naser, E.J. Manning, S. Sreevatsan // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2004. – Vol. 42, № 11. – P. 5345 – 5348.
144. González-Cortés, C. Apoptosis and oxidative burst in neutrophils infected with *Mycobacterium* spp / C. González-Cortés, D. Reyes-Ruvalcaba, C. Diez-Tascon, O.M. Rivero-Lezcano // *Immunology Letters*. – 2009. – Vol. 126 (1 - 2). – P. 16 – 21.
145. Good, R. Isolation of nontuberculous mycobacteria in the United States / R. Good, D. Snider // *The Journal of Infectious Diseases*. – 1982. – Vol. 146. – P. 829–833.
146. Gopinath, K. Multiplex PCR assay for simultaneous detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* complexes and other *Mycobacterial* species directly from clinical specimens / K. Gopinath, S. Singh // *Journal of Applied Microbiology*. – 2009. – Vol. 107, № 2. – P. 425 – 435.
147. Gopinath, K. Non-Tuberculous mycobacteria in TB-endemic countries: Are we neglecting the danger? / K. Gopinath, S. Singh // *PLoS Neglected Tropical Diseases*. – 2010. – Vol. 27, № 4 (4): e615.
148. Grange, J.M. *Mycobacterium bovis* infection in human beings / J.M. Grange // *Tuberculosis*. – 2001. – Vol. 81 (1-2). – P. 71 – 77.

149. Greenstein, R.J. Is Crohn's disease caused by a mycobacterium? Comparisons with leprosy, tuberculosis, and Johne's disease / R.J. Greenstein // The lancet. Infectious diseases. – 2003. – Vol. 3, № 8. – P. 507 - 514.
150. Griffith, D. E. An official ATS/IDSA statement: Diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases / D.E. Griffith, T. Aksamit, B.A. Brown-Elliott, A. Catanzaro, C. Daley, F. Gordin, S.M. Holland, R. Horsburgh, G. Huitt, M.F. Iademarco, M. Iseman, K. Olivier, S. Ruoss, C.F. von Reyn, R.J.Jr. Wallace, K. Winthrop; ATS Mycobacterial Diseases Subcommittee; American Thoracic Society; Infectious Disease Society of America// American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. – 2007. – Vol. 175, № 4. – P. 367 – 416.
151. Gryadunov, D. A. Evaluation of hybridisation on oligonucleotide microarrays for analysis of drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* / D. Gryadunov, V. Mikhailovich, S. Lapa, N. Roudinskii, M. Donnikov, S. Pan'kov, O. Markova, A. Kuz'min, L. Chernousova, O. Skotnikova, A. Moroz, A. Zasedatelev, A. Mirzabekov // Clinical Microbiology and Infection. – 2005. – Vol. 11, № 7. – P. 531-539.
152. Hänscheid, T. The future looks bright: low-cost fluorescent microscopes for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Coccidia* / T. Hänscheid // Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene – 2008. – Vol. 102, № 6. – P. 520-521.
153. Harmsen, D. RIDOM: Comprehensive and public sequence database for identification of *Mycobacterium* species / D. Harmsen, S. Dostal, A. Roth, S. Niemann, J. Rothganger, M. Sammeth, J. Albert, M. Frosch, E. Richter // BMC Infectious Diseases. – 2003. - № 3, article number: 26.
154. Hashish, E. *Mycobacterium marinum* infection in fish and man: Epidemiology, pathophysiology and management: a review / E. Hashish, A. Merwad, S. Elgaml, A. Amer, H. Kamal, A. Elsadek, A. Marei, M. Sitohy // Veterinary Quarterly. – 2018. – Vol. 38, № 1. – P. 35 – 46.
155. Hawkins, C. C. *Mycobacterium avium* complex infections in patients with the acquired immunodeficiency syndrome / C.C. Hawkins, J.W. Gold, E. Whimbey, T.E.

- Kiehn, P. Brannon, R. Cammarata, A.E. Brown, D. Armstrong // *Annals of Internal Medicine*. – 1986. – Vol. 105, № 2. – P. 184-188.
156. Heifets, L. Mycobacterial infections caused by nontuberculous mycobacteria / L. Heifets // *Seminars in respiratory and critical care medicine*. – 2004. – Vol. 25, № 3. – P. 283-295.
 157. Hernandez, S. M. Identification of *Mycobacterium* species by PCR-restriction fragment length polymorphism analyses using fluorescence capillary electrophoresis / S.M. Hernandez, G.P. Morlock, W.R. Butler, J.T. Crawford, R.C. Cooksey// *Journal of Clinical Microbiology*. – 1999. – Vol. 37, № 11. – P. 3688-3692.
 158. Hoefsloot, W. No human transmission of *Mycobacterium malmoense* in a perfect storm setting / W. Hoefsloot, M.J. Boeree, C. Van Nieuwkoop, A.T. Bernards, P.H. Savelkoul, J. van Ingen, D. van Soolingen // *European Respiratory Journal* – 2012. – Vol. 40. – P. 1576 – 1578.
 159. Hoffmann, C. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure / C. Hoffmann, A. Leis, M. Niederweis, J.M. Plitzko, H. Engelhardt // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – Vol. 105, № 10. – P. 3963 – 3967.
 160. Hoffner, S.E. Pulmonary infections caused by less frequently encountered slow-growing environmental mycobacteria / S.E. Hoffner // *European journal of clinical microbiology and infectious diseases*. – 1994. – Vol. 13, № 11. – P. 937-941.
 161. Hong, Y.J. Usefulness of three-channel multiplex real-time PCR and melting curve analysis for simultaneous detection and identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria / Y.J. Hong, Y.H. Chung, T.S. Kim, S.H. Song, K.U. Park, J.J. Yim, J. Song, J.H. Lee, E.C. Kim // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2011. – Vol. 49, № 11. - P. 3963 – 3966.
 162. Horita, N. Sensitivity and specificity of Cobas TaqMan MTB real-time polymerase chain reaction for culture-proven *Mycobacterium tuberculosis*: Meta-analysis of 26999 specimens from 17 Studies / N. Horita, M. Yamamoto, T. Sato, T. Tsukahara, H. Nagakura, K. Tashiro, Y. Shibata, H. Watanabe, K. Nagai, K.

- Nakashima, R. Ushio, M. Ikeda, K. Sakamaki, T. Yoshiyama, T. Kaneko // Scientific Reports. – 2016. - № 5, article number: 18113.
163. Horsburgh, Jr. C.R. The Pathophysiology of Disseminated *Mycobacterium avium* Complex Disease in AIDS / C.R. Horsburgh, Jr. // The journal of infectious diseases. – 1999. – Vol. 179, Suppl. 3. – P. S461-S465.
 164. Hoza, A. S. Increased isolation of nontuberculous mycobacteria among TB suspects in Northeastern, Tanzania: Public health and diagnostic implications for control programmes / A.S. Hoza, S.G. Mfinanga, A.C. Rodloff, I. Moser, B. Konig // BMC Research Notes. – 2016. – №9 – article № 109.
 165. Huang, T. S. Comparison of the Roche amplicor mycobacterium assay and Digene SHARP Signal System with in-house PCR and culture for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens / T.S. Huang, Y.C. Liu, H.H. Linn, W.K. Huang, D.L. Cheng // Journal of Clinical Microbiology. – 1996. – Vol. 34, № 12. – P. 3092 – 3096.
 166. Hwang, S.M. Simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria in respiratory specimens / S.M. Hwang, M.S. Lim, Y.J. Hong, T.S. Kim, K.U. Park, J. Song, J.H. Lee, E.C. Kim // Tuberculosis (Edinb). – 2013. – Vol. 93, № 6. – P. 642 – 646.
 167. Ichikawa, K. Genetic diversity of clinical *Mycobacterium avium* subsp. hominissuis and *Mycobacterium intracellulare* isolates causing pulmonary diseases recovered from different geographical regions / K. Ichikawa, J. van Ingen, W.J. Koh, D. Wagner, M. Salfinger, T. Inagaki, K.I. Uchiya, T. Nakagawa, K. Ogawa, K. Yamada, T. Yagi // Infection, Genetics and Evolution. – 2015. – Vol. 36. – P. 250 – 255.
 168. Ishiekwene, C. Case report on pulmonary disease due to coinfection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium abscessus*: Difficulty in diagnosis / C. Ishiekwene, M. Subran, M. Ghitan, M. Kuhn-Basti, E. Chapnik, Y.S. Lin // Respiratory Medicine Case Reports. – 2017. – Vol. 20. – P. 123-124.
 169. Iwamoto, T. Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. hominissuis strains isolated from humans, pigs, and human living environment / T. Iwamoto, C.

- Nakajima, Y. Nishiuchi, T. Kato, S. Yoshida, N. Nakanishi, A. Tamaru, Y. Tamura, Y. Suzuki, M. Nasu // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2012. – Vol. 12, № 4. – P. 846-852.
170. Iwamoto, T. Intra-subspecies sequence variability of the MACPPE12 gene in *Mycobacterium avium* subsp. hominissuis / T. Iwamoto, M. Arikawa, C. Nakajima, N. Nakanishi, Y. Nishiuchi, S. Yoshida, A. Tamaru, Y. Tamura, Y. Hoshino, H. Yoo, Y.K. Park, H. Saito, Y. Suzuki // *Infection, Genetics and Evolution*. – 2014. - № 21. – P. 479 – 483.
 171. Jarikre, L.N. *Mycobacterium gordonae* genitourinary disease / L.N. Jarikre // *Genitourinary medicine*. – 1992. –Vol. 68, № 1. – P. 45 – 46.
 172. Kanehisa, M. KEGG as a reference resource for gene and protein annotation / M. Kanehisa, Y. Sato, M. Kawashima, M. Furumichi, M. Tanabe // *Nucleic Acids Research*. – 2016. – Vol. 44, № D1. – P. D457 – D462.
 173. Keane, J. Virulent *Mycobacterium tuberculosis* Strains Evade Apoptosis of Infected Alveolar Macrophages / J. Keane, H.G. Remold, H. Kornfeld // *The Journal of Immunology*. – 2000. – Vol. 164, № 4. – P. 2016 – 2020.
 174. Keerthirathne, T.P. Real time PCR for the rapid identification and drug susceptibility of Mycobacteria present in Bronchial washings / T.P. Keerthirathne, D.N. Magana-Arachchi, D. Madegedara, S.S. Sooryapathirana // *BMC Infectious Diseases*. – 2016. – Vol. 16, № 1. – P. 607.
 175. Khatter, S. Mycobacterial infections in human immuno-deficiency virus seropositive patients: role of non-tuberculous mycobacteria / S. Khatter, U.B. Singh, J. Arora, T. Rana, P. Seth // *The Indian journal of tuberculosis*. – 2008. – Vol. 55, № 1, P. 28-33.
 176. Kiers, A. Transmission of *Mycobacterium pinnipedii* to humans in a zoo with marine mammals / A. Kiers, A. Klarenbeek, B. Mendelts, D. Van Soolingen, G. Koeter // *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. – 2008. -Vol. 12, № 12. – P. 1469 – 1473.
 177. Kim, H. Differentiation of *Mycobacterium* species by analysis of the heat-shock protein 65 gene (hsp65) / H. Kim, S.H. Kim, T.S. Shim, M.N. Kim, G.H. Bai, Y.G.

- Park, S.H. Lee, G.T. Chae, C.Y. Cha, Y.H. Kook, B.J. Kim // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2005. – Vol. 55 (Pt 4). – P. 1649-1656.
178. Kim, J. Frequency and clinical implications of the isolation of rare nontuberculous mycobacteria / J. Kim, M.W. Seong, E.C. Kim, S.K. Han, J.J. Yim // BMC Infectious Diseases. – 2015. – Vol. 15. – P. 9.
179. Kim, J. K. Identification and distribution of nontuberculous mycobacteria from 2005 to 2011 in Cheonan, Korea / J.K. Kim, I. Rheem // Tuberculosis and Respiratory Diseases. – 2013. – Vol. 74, № 5. – P. 215–221.
180. Kim, J.U. Paradigm for diagnosing mycobacterial disease: Direct detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* complex and non-tuberculous mycobacteria in clinical specimens using multiplex real-time PCR / J.U. Kim, D.S. Ryu, C.H. Cha, S.H. Park // Journal of Clinical Pathology. - 2018. – Vol. 71, № 9. – P. 774-780.
181. Koch, R. Die Aetiologie der Tuberculose (Nach einem in der physiologischen Gesellschaft zu Berlin am 24. März gehaltenem Vortrage) / R. Koch // Abt. Originale. A, Medizinische Mikrobiologie, Infektionskrankheiten und Parasitologie. – 1882. – Vol. 251, № 3. – P. 287 - 296.
182. Kodama, A. Evaluation of CapiliaTB for identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex, with special reference to the culture medium / A. Kodama, H. Saito // The Journal of Japanese Society for Clinical Microbiology. – 2007. – Vol. 14. – P. 109-118.
183. Koh, W. J. Clinical significance of nontuberculous mycobacteria isolated from respiratory specimens in Korea / W. J. Koh, O.J. Kwon, K. Jeon, T.S. Kim, K.S. Lee, Y.K. Park, G.H. Bai // Chest. – 2006. – Vol. 129, № 2. – P. 341 – 348.
184. Kothavade, R. J. Clinical and laboratory aspects of the diagnosis and management of cutaneous and subcutaneous infections caused by rapidly growing mycobacteria / R.J. Kothavade, R.S. Dhurat, S.N. Mishra, U.R. Kothavade // European journal of clinical microbiology and infectious diseases. – 2013. – Vol. 32, № 2. – P. 161 – 188.

185. Kox, L. F. PCR assay based on DNA coding for 16S rRNA for detection and identification of mycobacteria in clinical samples / L. F. Kox, J. van Leeuwen, S. Knijper, H.M. Jansen, A.H. Kolk // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1995. – Vol. 33, № 12. – P. 3225 – 3233.
186. Krüüner, A. Evaluation of MGIT 960-based antimicrobial testing and determination of critical concentrations of first- and second-line antimicrobial drugs with drug-resistant clinical strains of *Mycobacterium tuberculosis* / A. Krüüner, M.D. Yates, F.A. Drobniewski // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2006. – Vol. 44, № 3. – P. 811 – 818.
187. Kubica, G. Public health mycobacteriology: a guide for the level III laboratory / G. Kubica, K. Kent // Atlanta: Department of Health and Human Services, Public Health Service, Centers for Disease Control. – 1985. – 226 p.
188. Kurbatova, E. V. Performance of Cepheid® Xpert MTB/RIF® and TB-Biochip® MDR in two regions of Russia with a high prevalence of drug-resistant tuberculosis / E. V. Kurbatova, D.A. Kaminski, V.V. Erokhin, G.V. Volchenkov, S.N. Andreevskaya, L.N. Chernousova, O.V. Demikhova, J.V. Ershova, N.V. Kaunetis, t.A. Kuznetsova, E.E. Larionova, T.G. Smirnova, T.R. Somova, I.A. Vasilieva, A.V. Vorobieva, S.S. Zolkina, J.P. Cegielski // *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. – 2013. – Vol. 32, № 6. – P. 735–743.
189. Kwon, Y.S. Diagnosis of pulmonary tuberculosis and nontuberculous mycobacterial lung disease in Korea / Y.S. Kwon, W.J. Koh // *Tuberculosis and respiratory diseases (Seoul)*. – 2014. – Vol. 77, № 1. – P. 1 – 5.
190. Lara-Oya, A. Evaluation of the speed-oligo direct *Mycobacterium tuberculosis* assay for molecular detection of mycobacteria in clinical respiratory specimens / A. Lara-Oya, P. Mendoza-Lopez, J. Rodriguez-Granger, A.M. Fernandez-Sanchez, M.P. Bermudez-Ruiz, I. Toro-Peinado, B. Palop-Borras, J.M. Navarro-Mari, M.J. Martinez- Lirola // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2013. – Vol. 51, № 1. – P. 77 – 82.
191. Lawn, S.D. Xpert® MTB/RIF assay: Development, evaluation and implementation of a new rapid molecular diagnostic for tuberculosis and rifampicin

- resistance / S.D. Lawn, M.P. Nicol // *Future microbiology*. – 2011. – Vol. 6, № 9: 1067 - 1082.
192. Leão, C. Relatedness of *Mycobacterium avium* subspecies hominissuis clinical isolates of human and porcine origins assessed by MLVA / C. Leão, A. Canto, D. Machado, I.S. Sanches, I. Couto, M. Viveiros, J. Inácio, A. Botelho // *Veterinary Microbiology*. – 2014. – Vol. 173 (1-2). – P. 92 – 100.
 193. Lebrun, L. Use of the INNO-LiPA-MYCOBACTERIA assay (Version 2) for identification of *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare-Mycobacterium scrofulaceum* complex isolates / L. Lebrun, F.-X. Weill, L. Lafendi, F. Houriez, F. Casanova, M.C. Gutierrez, D. Ingrand, P. Lagrange, V. Vincent, J.L. Herrmann // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2005. – Vol. 43, № 6. – P. 2567-2574.
 194. Lee, H. Species identification of mycobacteria by PCR-restriction fragment length polymorphism of the rpoB gene / H. Lee, H.J. Park, S.N. Cho, G.H. Bai, S.J. Kim // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2000. – Vol. 38, № 8. – P. 2966 – 2971.
 195. Lee, M. R. Evaluation of the Cobas TaqMan MTB real-time PCR assay for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* in respiratory specimens / M.R. Lee, K.-P. Chung, H.-C. Wang, C.-B. Lin, C.-J. Yu, J.-J. Lee, P.-R. Hsueh // *Journal of Medical Microbiology*. – 2013. – Vol. 62 (Pt 8). – P. 1160-1164.
 196. Lee, W. I. Immune defects in active mycobacterial diseases in patients with primary immunodeficiency diseases (PIDs) / W. I. Lee, J.-L. Huang, K.-W. Yeh, T.-H. Jaing, T.-Y. Lin, Y.-C. Huang, C.-H. Chiu // *Journal of the formosan medical association*– 2011. – Vol. 110, № 12. – P. 750 – 758.
 197. Lempp, J. M. Assessment of the quantiferon-tb gold in-tube test for the detection of mycobacterium tuberculosis infection in United States navy recruits / J.M. Lempp, M.J. Zajdowicz, A.L. Hankinson, S.R. Toney, L.W. Keep, J.D. Mancuso, G.H. Mazurek // *PLoS ONE*. – 2017. – Vol. 12, №5. – P. e0177752.
 198. Leung, K. L. Development of a simple and low-cost real-time PCR method for the identification of commonly encountered mycobacteria in a high throughput

- laboratory / K.L. Leung, C.W. Yip, W.F. Cheung, A.C.T. Lo, W.M. Ko, K.M. Kam // Journal of Applied Microbiology. – 2009. – Vol. 107, № 5. – P. 1433 – 1439.
199. Lewis, F. M. T. Fish tank exposure and cutaneous infections due to *Mycobacterium marinum*: tuberculin skin testing, treatment, and prevention / F. M. T. Lewis, B. J. Marsh, C. F. von Reyn // Clinical Infectious Disease. – 2003. – Vol. 37, № 3. – P. 390 – 397.
200. Ley, S. Non-tuberculous mycobacteria: baseline data from three sites in Papua New Guinea, 2010–2012 / S. Ley, R. Carter, K. Millan, S. Phuanukoonnon, S. Pandey, C. Coulter, P. Siba, H.-P. Beck // Western Pacific Surveillance and Response Journal. – 2015. – Vol. 6, № 4. – P. 24 – 29.
201. Li, G. Antimicrobial susceptibility and MIC distribution of 41 drugs against clinical isolates from China and reference strains of nontuberculous mycobacteria / G. Li, H. Pang, Q. Guo, M. Huang, Y. Tan, C. Li, J. Wei, Y. Xia, Y. Jiang, X. Zhao, H. Liu, L.-L. Zhao, Z. Liu, D. Xu, K. Wan // International journal of antimicrobial agents. – 2017. – Vol. 49, № 3. – P. 364 – 374.
202. Litvinov, V. Drug susceptibility testing of slowly growing non-tuberculous mycobacteria using slomyco test-system / V. Litvinov, M. Makarova, K. Galkina, E. Khachatourians, M. Krasnova, L. Guntupova, S. Safonova // PLoS ONE. – 2018. – Vol. 13, № 9: e0203108.
203. Livak, K. J. Oligonucleotides with Fluorescent Dyes at System Useful for Detecting PCR Product and Nucleic Acid Hybridization / K.J. Livak, S.J. Flood, J. Marmaro, W. Giusti, K. Deetz // PCR Methods and Applications. – 1995. – Vol. 4, № 6. – P. 357 – 362.
204. Longiaru, M. Probes in DNA/RNA Hybridization / M. Longiaru // Biologicals. – 1996. – Vol. 24. – № 3. – P. 187-188.
205. Maiga, M. Failure to recognize nontuberculous mycobacteria leads to misdiagnosis of chronic pulmonary tuberculosis / M. Maiga, S. Siddiqui, S. Diallo, B. Diarra, B. Traoré, Y.R. Shea, A.M. Zelazny, B.P.P. Dembele, D. Goita, H. Kassambara, A.S. Hammond, M.A. Polis, A. Tounkara // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7, №5: e36902.

206. Manjunath, N. Evaluation of a polymerase chain reaction for the diagnosis of tuberculosis / N. Manjunath, P. Shankar, L. Rajan, A. Bhargava, S. Saluja, Shriniwas // *Tubercle and Lung Disease*. – 1991. – Vol. 72. – № 1. – P. 21-27.
207. Markham, N.R. DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction / N.R. Markham, M. Zuker // *Nucleic Acids Research*. – 2005. - № 33 (Web Server issue): W577 - 81.
208. Marras, T.K. Isolation prevalence of pulmonary non-tuberculous mycobacteria in Ontario 1997-2003 / T.K. Marras, P. Chedore, A.M. Ying, F. Jamieson // *Thorax*. – 2007. – Vol. 62. – № 8. – P. 1997-2003.
209. Marras, T. K. Pulmonary nontuberculous mycobacteria-associated deaths, Ontario, Canada, 2001 – 2013 / T. K. Marras, M.A. Campitelli, H. Lu, H. Chung, S.K. Brode, A. Marchand-Austin, K.L. Winthrop, A.S. Gershon, J.C. Kwong, F.B. Jamieson // *Emerging Infectious Diseases* – 2017. – Vol. 23. – № 3. – P. 468 - 476.
210. Marras, T.K. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria / T.K. Marras, C.L. Daley // *Clinics in Chest Medicine* – 2002. – Vol. 23, № 3. – P. 553-567.
211. Marzouk, M. Comparison of LED and conventional fluorescence microscopy for detection of acid-fast bacilli in an area with high tuberculosis incidence / M. Marzouk, A. Ferjani, M. Dhaou, M.H. Ali, N. Hannachi, J. Boukadida // *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. – 2013. – Vol. 76, № 3. – P. 306 – 308.
212. Mazumder, S. A. *Mycobacterium gordonae* pulmonary infection in an immunocompetent adult / S. A. Mazumder, A. Hicks, J. Norwood // *North American journal of medical sciences*. – 2010. – Vol. 2, № 4. – P. 205 - 207.
213. Mazurek, G. H. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* Infection in United States Navy Recruits Using the Tuberculin Skin Test or Whole-Blood Interferon - Release Assays / G.H. Mazurek, M.J. Zajdowicz, A.L. Hankinson, D.J. Costigan, S.R. Toney, J.S. Rothel, L.J. Daniels, F.B. Pascual, N. Shang, L.W. Keep, P.A. LoBue // *Clinical Infectious Diseases*. – 2007. – Vol. 45, № 7. – P. 826 – 836.

214. McMullen, L. Current roles of specific bacteria in the pathogenesis of inflammatory bowel disease / L. McMullen, S.T. Leach, D.A. Lemberg, A.S. Day // Microbiology. – 2015. – Vol. 1. – P. 82–91.
215. Meaza, A. Evaluation of genotype MTBDRplus VER 2.0 line probe assay for the detection of MDR-TB in smear positive and negative sputum samples / A. Meaza, A. Kebede, Z. Yaregal, Z. Dagne, S. Moga, B. Yenew, G. Diriba, H. Molalign, M. Tadesse, D. Adisse, M. Getahun, K. Desta // BMC Infectious Diseases. – 2017. – Vol. 17, № 1. – P. 280.
216. Menzies, D. Meta-analysis: New tests for the diagnosis of latent tuberculosis infection: Areas of uncertainty and recommendations for research / D. Menzies, M. Pai, G. Comstock // Annals of Internal Medicine. – 2007. – Vol. 146, № 5. – P. 340–354.
217. Migliori, G. Extensively drug-resistant tuberculosis is worse than multidrug-resistant tuberculosis: different methodology and settings, same results / G. Migliori, C. Lange, E. Girardi, R. Centis, G. Besozzi, K. Kliiman, J. Ortmann, A. Matteelli, A. Spanevello, D.M. Cirillo; SMIRA/TBNET Study Group // Clinical Infectious Diseases. – 2008. – Vol. 46, № 6. – P. 958–959.
218. Mignard, S. Identification of Mycobacterium using the EF-Tu encoding (*tuf*) gene and the tmRNA encoding (*ssrA*) gene / S. Mignard, J.P. Flandrois // Journal of Medical Microbiology. – 2007. – Vol. 56 (Pt 8). – P. 1033–1041.
219. Miller, N. Rapid and specific detection of *Mycobacterium tuberculosis* from acid-fast bacillus smear-positive respiratory specimens and BacT/ALERT MP culture bottles by using fluorogenic probes and real-time PCR / N. Miller, T. Cleary, G. Kraus, A.K. Young, G. Spruill, H.J. Hnatyszyn // Journal of Clinical Microbiology. – 2002a. – Vol. 40. – P. 4143–4147.
220. Minion, J. Comparison of led and conventional fluorescence microscopy for detection of acid fast bacilli in a Low-Incidence setting / J. Minion, M. Pai, A. Ramsay, D. Menzies, C. Greenaway // PLoS ONE. – 2011. – Vol. 6, № 7. – P. e22495.

221. Mizoshita, T. A Rare Case of Infectious Colitis with Ulcers in the Cecum Caused by *Mycobacterium gordonae* / T. Mizoshita, S. Tanida, T. Mizushima, Y. Hirata, K. Murakami, T. Shimura, Y. Mori, H. Kataoka, T. Kamiya, T. Joh // Internal Medicine. – 2011. – Vol. 50, № 21. – P. 2583 – 2586.
222. Mohamed, A. M. Computational approach involving use of the internal transcribed spacer 1 region for identification of *Mycobacterium* species / A.M. Mohamed, D.J. Kuyper, P.C. Iwen, H.H. Ali, D.R. Bastola, S.H. Hinrichs // Journal of Clinical Microbiology. – 2005. – Vol. 43, № 8. – P. 3811 – 3817.
223. Molloy, A. Apoptosis, but not necrosis, of infected monocytes is coupled with killing of intracellular bacillus Calmette-Guerin / A. Molloy // Journal of Experimental Medicine. – 1994. – Vol. 180, № 4. – P. 1499 – 1509.
224. Moore, J. E. Increasing reports of non-tuberculous mycobacteria in England, Wales and Northern Ireland, 1995-2006 / J.E. Moore, M.E. Kruijshaar, L.P. Ormerod, F. Drobniewski, I. Abubakar // BMC Public Health. – 2010. -№ 10. – P. 612.
225. Morimoto, K. A steady increase in nontuberculous mycobacteriosis mortality and estimated prevalence in Japan / K. Morimoto, K. Iwai, K. Uchimura, M. Okumura, T. Yoshiyama, K. Yoshimori, H. Ogata, A. Kurashima, A. Gemma, S. Kudoh // Annals of the American Thoracic Society. – 2014. – Vol. 11, № 1. – P. 1 – 8.
226. Morimoto, K. Clinical and microbiological features of definite *Mycobacterium gordonae* pulmonary disease: The establishment of diagnostic criteria for low-virulence mycobacteria / K. Morimoto, Y. Kazumi, Y. Shiraishi, T. Yoshiyama, Y. Murase, S. Ikushima, A. Kurashima, S. Kudoh, H. Goto, S. Maeda // Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. – 2015. – Vol. 109, № 9. – P. 589 – 593.
227. Mpanyane, D.M. The diagnostic utility of anyplex plus™ MTB/NTM cycle threshold for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex among new and retreatment cases from a referral hospital in Limpopo Province, South Africa / D.M. Mpanyane, T. Maguga, F. Mashinya, L. Malinga // Biomedical and biotechnology research journal. – 2017. – Vol. 1, № 2. – P. 141-146.

228. Müller, B. Zoonotic *Mycobacterium bovis*-induced tuberculosis in humans / B. Müller, S. Dürr, S. Alonso, J. Hattendorf, C.J.M. Laise, S.D.C. Parsons, P.D. van Helden, J. Zinsstag // *Emerging Infectious Diseases*. – 2013. – Vol. 19, № 6. – P. 899 – 908.
229. Myneedu, V. P. A pilot study of same day sputum smear examination, its feasibility and usefulness in diagnosis of pulmonary TB / V. P. Myneedu, A.K. Verma, P.P. Sharma, D. Behera // *Indian Journal of Tuberculosis*. – 2011. – Vol. 58, № 4. – P. 160 – 167.
230. Namkoong, H. Epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease, Japan / H. Namkoong, A. Kurashima, K. Morimoto, Y. Hoshino, N. Hasegawa, M. Ato, S. Mitarai – 2016. – Vol. 22, № 6. – P. 1116 - 1117.
231. Narain, J.P. HIV-associated tuberculosis in developing countries: epidemiology and strategies for prevention / J.P. Narain, M.C. Raviglione, A. Kochi // *Tubercle and Lung Disease*. – 1992. – Vol. 73, № 6. – P. 311 – 321.
232. Nathavitharana, R. R. Multicenter noninferiority evaluation of hain GenoType MTBDRplus Version 2 and Nipro NTM+MDRTB line probe assays for detection of rifampin and isoniazid resistance / R.R. Nathavitharana, D. Hillemann, S.G. Schumacher, B. Schlueter, N. Ismail, S.V. Omar, W. Sikhondze, Joshua Havumaki 3, Eloise Valli 3, Catharina Boehme 3, Claudia M Denking 6 // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2016. – Vol. 54, № 6. – P. 1624 – 1630.
233. Neelsen, F. Ein Casuistischer Beitrag zur Lehre von der Tuberkulose / F. Neelsen // *Centralblatt für die Medizinischen Wissenschaften*. – 1883. – Vol. 28. – P. 497–501.
234. Ngabonziza, J.C.S. Diagnostic performance of smear microscopy and incremental yield of Xpert in detection of pulmonary tuberculosis in Rwanda / J.C.S. Ngabonziza, W. Ssengooba, F. Mutua, G. Torrea, A. Dushime, M. Gasana, E. Andre, S. Uwamungu, A.U. Nyaruhirira, D. Mwaengo, C.M. Muvunyi // *BMC Infectious Diseases*. – 2016. – Vol. 16, № 1. – P. 660.

235. Ni, S. Inhaled corticosteroids (ICS) and risk of mycobacterium in patients with chronic respiratory diseases: A meta-analysis / S. Ni, Z. Fu, J. Zhao, H. Liu // *Journal of Thoracic Disease*. – 2014. – Vol. 6, № 7. – P. 971 – 978.
236. Noordhoek, G. T. Multicentre quality control study for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in clinical samples by nucleic amplification methods / G.T. Noordhoek, S. Mulder, P. Wallace, A.M. van Loon // *Clinical Microbiology and Infection*. – 2004. – Vol. 10, № 4, P. 295-301.
237. Nour-Neamatollahie, A. Distribution of non-tuberculosis mycobacteria strains from suspected tuberculosis patients by heat shock protein 65 PCR–RFLP / A. Nour-Neamatollahie, N. Ebrahimzadeh, S.D. Siadat, F. Vaziri, M. Eslami, A.A. Sepahi, S. Khanipour, M. Masoumi, F. Sakhaee, M.G. Jajin, A. Bahrmand, A. Fateh // *Saudi Journal of Biological Sciences*. – 2017. – Vol. 24, № 6. – P. 1380-1386.
238. Oddo, M. Fas ligand-induced apoptosis of infected human macrophages reduces the viability of intracellular *Mycobacterium tuberculosis* / M. Oddo, T. Renno, A. Attinger, T. Bakker, H.R. MacDonald, P.R. Meylan // *Journal of Immunology*. – 1998. – Vol. 160, № 11. – P. 5448 – 5454.
239. Okonechnikov, K. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / K. Okonechnikov, O. Golosova, M. Fursov; UGENE team // *Bioinformatics*. – 2012. – Vol. 28, № 8. – P. 1166-1167.
240. Padilla, E. Comparative evaluation of the new version of the INNO-LiPA mycobacteria and genotype mycobacterium assays for identification of *Mycobacterium* species from MB/BacT liquid cultures artificially inoculated with mycobacterial strains / E. Padilla, V. González, J.M. Manterola, A. Pérez, M.D. Quesada, S. Gordillo, C. Vilaplana, M.A. Pallarés, S. Molinos, M.D. Sánchez, V. Ausina // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2004. – Vol. 42, № 7. – P. 3083 – 3088.
241. Pai, M. Tuberculosis / M. Pai, M.A. Behr, D. Dowdy, K. Dheda, M. Divangahi, C.C. Boehme, A. Ginsberg, S. Swaminathan, M. Spigelman, H. Getahun, D. Menzies, M. Raviglione // *Nature Reviews Disease Primers* 2. - №16076. – 2016.
242. Palomino, J. Drug Resistance Mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis* / J. Palomino, A. Martin // *Antibiotics*. – 2014. – Vol. 3, № 3. – P. 317 – 340.

243. Pao, C. C. Detection and identification of *Mycobacterium tuberculosis* by DNA amplification / C.C. Pao, T.S. Yen, J.B. You, J.S. Maa, E.H. Fiss, C.H. Chang // Journal of Clinical Microbiology. – 1990. – Vol. 28, № 9. – P. 1877 - 1880.
244. Park, H. Detection and genotyping of *Mycobacterium* species from clinical isolates and specimens by oligonucleotide array / H. Park, H. Jang, E. Song, C.L. Chang, M. Lee, S. Jeong, J. Park, B. Kang, C. Kim // Journal of Clinical Microbiology. – 2005. – Vol. 43, № 4. – P. 1782 – 1788.
245. Park, S.H. Evaluation and Comparison of Molecular and Conventional Diagnostic Tests for Detecting Tuberculosis in Korea, 2013 / S.H. Park, C.-K. Kim, H.-R. Jeong, H. Son, S.-H. Kim, M.-S. Park // Osong Public Health and Research Perspectives. – 2014. – № 5 (Suppl): P. S3 - S7.
246. Perng, C. L. Identification of non-tuberculous mycobacteria by real-time PCR coupled with a high-resolution melting system / C.L. Perng, H.-Y. Chen, T.-S. Chiueh, W.-Y. Wang, C.-T. Huang, J.-R. Sun // Journal of Medical Microbiology. – 2012. – Vol. 61(Pt 7). – P. 944-951.
247. Perry, M. Potential for use of the seegene anyplex MTB/NTM real-time detection assay in a regional reference laboratory / M. Perry, P. White, M. Ruddy // Journal of Clinical Microbiology. – 2014. – Vol. 52, № 5. – P. 1708-1710.
248. Pfyffer, G. E. *Mycobacterium canettii*, the smooth variant of *M. tuberculosis*, isolated from a Swiss patient exposed in Africa / G.E. Pfyffer, R. Auckenthaler, J.D. van Embden, D. van Soolingen – 1998. – Vol. 4, № 4. – P. 631 – 634.
249. Piersimoni, C. Extrapulmonary infections associated with nontuberculous mycobacteria in immunocompetent persons / C. Piersimoni, C. Scarparo // Emerging infectious diseases. – 2009. - Vol. 15, № 9. – P. 1351 – 1358.
250. Pinho, L. *Mycobacterium gordonae* urinary infection in a renal transplant recipient / L. Pinho, J. Santos, G. Oliveira, M. Pestana // Transplant Infectious Disease. – 2009. – Vol. 11, № 3. – P. 253 – 256.
251. Plikaytis, B. B. Differentiation of slowly growing *Mycobacterium* species, including *Mycobacterium tuberculosis*, by gene amplification and restriction fragment length polymorphism analysis / B.B. Plikaytis, B.D. Plikaytis, M.A.

- Yakrus, W.R. Butler, C.L. Woodley, V.A. Silcox, T.M. Shinnick // Journal of Clinical Microbiology. – 1992. – Vol. 30, № 7. – P. 1815-22.
252. Prevots, D.R. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria: a review / D.R. Prevots, T.K. Marras // Clinics in Chest Medicine. – 2015. – Vol.36, №1. – P. 13 – 34.
253. Raja, S. Technology for automated, rapid, and quantitative PCR or reverse transcription-PCR clinical testing / S. Raja, J. Ching, L. Xi, S.J. Hughes, R. Chang, W. Wong, W. McMillan, W.E. Gooding, K.S. McCarty Jr, M. Chestney, J.D. Luketich, T.E. Godfrey // Clinical Chemistry. – 2005. – Vol. 51, № 5 – P. 882 – 890.
254. Reed, J.L. XtracTB Assay, a *Mycobacterium tuberculosis* molecular screening test with sensitivity approaching culture / J.L. Reed, D. Basu, M.A. Butzler, S.M. McFall // Scientific Reports. – 2017. – Vol. 7, № 1: 3653. – 12 p.
255. Reichenbach, J. Mycobacterial diseases in primary immunodeficiencies / J. Reichenbach, S. Rosenzweig, R. Döffinger, S. Dupuis, S.M. Holland, J.L. Casanova // Current opinion in allergy and clinical immunology. – 2001. – Vol. 1, № 6. – P. 503 - 511.
256. Richardson, E.T. Rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacteria by multiplex, real-time PCR / E.T. Richardson, D. Samson, N. Banaei // Journal of Clinical Microbiology. – 2009. – Vol. 47, № 5. – P. 1497 – 1502.
257. Ricketts, W.M. Human-to-human transmission of *Mycobacterium kansasii* or victims of a shared source? / W.M. Ricketts, T.C. O'Shaughnessy, J. Van Ingen. // European respiratory journal. – 2014. – № 44. - P. 1085 – 1087.
258. Rogall, T. Differentiation of mycobacterial species by direct sequencing of amplified DNA / T. Rogall, T. Flohr, E. Bottger // Journal of General Microbiology. – 1990. – Vol. 136. – P. 1915-1920.
259. Rozen, S. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers / S. Rozen, H. Skaletsky // Methods in molecular biology. – 2000. – Vol. 132. – P. 365 – 386.

260. Ryu, Y.J. Diagnosis and treatment of nontuberculous mycobacterial lung disease: Clinicians' perspectives / Y.J. Ryu, W.J. Koh, C.L. Daley // Tuberculosis & respiratory diseases (Seoul) – 2016. – Vol. 79, №2. – P. 74 – 84.
261. Sali, M. Multicenter evaluation of anyplex plus MTB/NTM MDR-TB assay for rapid detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and multidrug-resistant isolates in pulmonary and extrapulmonary specimens / M. Sali, F. De Maio, F. Caccuri, F. Campilongo, M. Sanguinetti, S. Fiorentini, G. Delogu, C. Giagulli // Journal of Clinical Microbiology. – 2016. – Vol. 54. – № 1. – P. 59-63.
262. Santa Lucia, J. Physical principles and visual-OMP software for optimal PCR design / J. Santa Lucia // Methods in Molecular Biology. – 2007. – Vol. 402. – P. 3 – 34.
263. Sarkola, A. Prospective evaluation of the GenoType Assay for routine identification of mycobacteria / A. Sarkola, J. Mäkinen, M. Marjamäki, H.J. Marttila, M.K. Viljanen, H. Soini // European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. – 2004. – Vol. 23, №8. – P. 642 – 645.
264. Sarro, Y.D. Simultaneous diagnosis of tuberculous and nontuberculous mycobacterial diseases: Time for a better patient management / Y.D. Sarro, B. Kone, B. Diarra, A. Kumar, O. Kodio, D.B. Fofana, C.J. Achenbach, A.H. Beavogui, M. Seydi, J.L. Holl, B. Taiwo, S. Diallo, S. Doumbia, R.L. Murphy, S.M. McFall, M. Maiga // Clinical Microbiology and Infection Disease. – 2018a. – Vol. 3. – № 3. – P. 1-4.
265. Sawatpanich, A. Diagnostic performance of the Anyplex MTB/NTM real-time PCR in detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria from pulmonary and extrapulmonary specimens / A. Sawatpanich, S. Petsong, S. Tumwasorn, S. Rotcheewaphan // Heliyon. – 2022. – Vol. 8, № 12: e11935.
266. Schönenbrücher, H. New triplex real-time PCR assay for detection of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis in bovine feces / H. Schönenbrücher, A. Abdulmawjood, K. Failing, M. Bülte // Applied and Environmental Microbiology. – 2008. – Vol. 74, № 9. – P. 2751 – 2758.

267. Schuman, J. S. Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) / J.S. Schuman, J. Orellana, A.H. Friedman, S.A. Teich // Survey of ophthalmology. – 1987. – Vol. 31, № 6. – P. 384 – 410.
268. Sebastian, G. Identification of Non-Tuberculous Mycobacterium by LPA (CM/AS) assay, HPLC and biochemical test: which is feasible for RNTCP? / G. Sebastian, S.B. Nagaraja, T. Vishwanatha, K. Hemalatha, N. Vijayalakshmi, P. Kumar // The Indian Journal of Tuberculosis. – 2018. – Vol. 65, № 4. – P. 329-334.
269. Sekyere, J. A Comparative Evaluation of the New Genexpert MTB/RIF Ultra and other Rapid Diagnostic Assays for Detecting Tuberculosis in Pulmonary and Extra Pulmonary Specimens / J. Sekyere, N. Maphalala, L.A. Malinga, N.M. Mbelle, N.E. Maningi // Scientific Reports. – 2019. – Vol. 9, №1: e16587.
270. Sevilla, I. A. Detection of mycobacteria, *Mycobacterium avium* subspecies, and *Mycobacterium tuberculosis* complex by a novel tetraplex real-time PCR assay / I.A. Sevilla, E. Molina, N. Elguezabal, V. Pérez, J.M. Garrido, R.A. Juste // Journal of Clinical Microbiology. – 2015. – Vol. 53, № 3. – P. 930 - 940.
271. Shamputa, I.C. Molecular genetic methods for diagnosis and antibiotic resistance detection of mycobacteria from clinical specimens / I.C. Shamputa, L. Rigouts, F. Portaels // APMIS. – 2004. – Vol. 112, № 11-12. – P. 728 – 752.
272. Shin, J. H. Novel diagnostic algorithm using tuf gene amplification and restriction fragment length polymorphism is promising tool for identification of nontuberculous mycobacteria / J.H. Shin, E.-J. Cho, J.-Y. Lee, J.-Y. Yu, Y.-H. Kang // Journal of Microbiology and Biotechnology. – 2009. – Vol.19, № 3. – P. 323 – 330.
273. Shin, J.H. Targeting the rpoB gene using nested PCR-restriction fragment length polymorphism for identification of nontuberculous mycobacteria in hospital tap water / J.H. Shin, H.-K. Lee, E.-J. Cho, J.-Y. Yu, Y.-H. Kang // Journal of Microbiology. – 2008. – Vol. 46, № 6. – P. 608 -614.
274. Shitikov, E. Mass spectrometry based methods for the discrimination and typing of mycobacteria / E. Shitikov, E. Ilina, L. Chernousova, A. Borovskaya, I. Rukin, M. Afanas'ev, T. Smirnova, A. Vorobyeva, E. Larionova, S. Andreevskaya, M.

- Kostrzewa, V. Govorun // Infection, Genetics and Evolution. – 2012. – Vol. 12. – № 4. – P. 838-845.
275. Siddiqui, S. MGIT procedure manual. For BACTEC MGIT 960 TB System (Also applicable for Manual MGIT) Mycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) Culture and Drug Susceptibility Demonstration Projects / S. Siddiqui, S. Rusch-Gerdes, H. Alexander. – 2007. – 89 p.
276. Simons, S. Nontuberculous mycobacteria in respiratory tract infections, Eastern Asia / S. Simons, J. van Ingen, P.-R. Hsueh, N.V. Hung, P.N.R. Dekhuijzen, M.J. Boeree, D. van Soolingen // Emerging Infectious Diseases. – 2011. – Vol. 17, № 3. – P. 343 – 349.
277. Smith, T. Molecular biology of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* / T. Smith, K.A. Wolff, L. Nguyen // Current Topics in Microbiology and Immunology. – 2013. – Vol. 374. – P. 53 – 80.
278. Stop TB Partnership Mycobacteriology Laboratory Manual [Электронный ресурс]: 2014. URL: http://www.stoptb.org/wg/gli/assets/documents/gli_mycobacteriology_lab_manual_web.pdf (188)
279. Stout, J.E. Update on pulmonary disease due to non-tuberculous mycobacteria / J.E. Stout, W.J. Koh, W.W. Yew // International Journal of Infectious Diseases – 2016. – Vol. 45. – P. 123 – 134.
280. Strollo, S.E. The burden of pulmonary nontuberculous mycobacterial disease in the United States / S.E. Strollo, J. Adjemian, M.K. Adjemian, D.R. Prevots // Annals of the American Thoracic Society. – 2015. – Vol. 12, № 10. – P. 1458 – 1464.
281. Tang, N. Analytical and clinical performance of Abbott RealTime MTB, an assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* in pulmonary specimens / N. Tang, A. Frank, V. Pahalawatta, J. Lampinen, A. Coblenz-Korte, C. Dunn, C. Li, G. Cloherty, K. Abravaya, G. Leckie // Tuberculosis. – 2015. – Vol. 95, № 5. – P. 613 – 619.
282. Taylor, S. A practical approach to RT-qPCR-Publishing data that conform to the MIQE guidelines / S. Taylor, M. Wakem, G. Dijkman, M. Alsarraj, M. Nguyen // Methods. – 2010. – Vol. 50, № 4: S 1 – 5.

283. Telenti, A. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis / A. Telenti, F. Marchesi, M. Balz, F. Bally, E.C. Böttger, T. Bodmer // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1993. – Vol. 31, № 2. – P. 175 – 178.
284. Thierry, D. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* insertion sequence, IS6110, and its application in diagnosis / D. Thierry, A. Brisson-Noël, V. Vincent-Lévy-Frébault, S. Nguyen, J.L. Guesdon, B. Gicquel // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1990. – Vol. 28, № 12. – P. 2668 – 2673.
285. Thomson, R. Isolation of nontuberculous mycobacteria (NTM) from household water and shower aerosols in patients with pulmonary disease caused by NTM / R. Thomson, C. Tolson, R. Carter, C. Coulter, F. Huygens, M. Hargreaves // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2013. – Vol. 51, № 9. – P. 3006 – 3011.
286. Thomson, R. Changing epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacteria infections / R. M. Thomson // *Emerging Infectious Diseases*. – 2010. – Vol. 16, № 10. – P. 1576 – 1583.
287. Timpe, A. The relationship of “atypical” acid-fast bacteria to human disease: A preliminary report / A. Timpe, E.H. Runyon // *The journal of laboratory and clinical medicine*. – 1954. – Vol. 54, № 2. – P. 202-209.
288. Tokars, J. I. *Mycobacterium gordonae* pseudoinfection associated with a contaminated antimicrobial solution / J.I. Tokars, M.M. McNeil, O.C. Tablan, K. Chapin-Robertson, J.E. Patterson, S.C. Edberg, W.R. Jarvis // *Journal of Clinical Microbiology*. – 1990. – Vol. 28, № 12. – P. 2765–2769.
289. Tortoli, E. Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections / E. Tortoli // *Clinical microbiology and infection*. – 2009. – Vol. 15, № 10. – P. 906 – 910.
290. Tortoli, E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: The new mycobacteria of the 1990s / E. Tortoli // *Clinical microbiology review*. – 2003. – Vol. 16, № 2. – P. 319 – 354.
291. Tortoli, E. Proposal to elevate the genetic variant MAC-A included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. Nov

- / E. Tortoli, L. Rindi, M.J. Garcia, P. Chiaradonna, R. Dei, C. Garzelli, R.M. Kroppenstedt, N. Lari, R. Mattei, A. Mariottini, G. Mazzearelli, M.I. Murcia, A. Nanetti, P. Piccoli, C. Scarparo // International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. – 2004. – Vol.54. – P. 1277 – 1285.
292. Trudzinski, F. C. Clinical implications of *Mycobacterium chimaera* detection in thermoregulatory devices used for extracorporeal membrane oxygenation (ECMO), Germany, 2015 to 2016 / F.C. Trudzinski, U. Schlotthauer, A. Kamp, K. Hennemann, R.M. Muellenbach, U. Reischl, B. Gärtner, H. Wilkens, R. Bals, M. Herrmann, P.M. Lepper, S.L. Becker // Eurosurveillance. – 2016. – Vol. 21, № 46. – P. 30398.
293. Van der Werf, M. J. Inventory study of non-tuberculous mycobacteria in the European Union / M.J. Van der Werf, C. Ködmön, V. Katalinić-Janković, T. Kummik, H. Soini, E. Richter, D. Papaventsis, E. Tortoli, M. Perrin, D. van Soolingen, M. Zolnir-Dovč, V.O. Thomsen // BMC Infectious Diseases. – 2014. - № 14. – P. 62.
294. Van Ingen, J. Environmental sources of rapid growing nontuberculous mycobacteria causing disease in humans / J. van Ingen, M.J. Boeree, P N R Dekhuijzen, D van Soolingen – 2009. – Vol. 15, № 10. – P. 888-893.
295. Van Ingen, J. Global outbreak of severe *Mycobacterium chimaera* disease after cardiac surgery: a molecular epidemiological study / J. van Ingen, T.A. Kohl, K. Kranzer, B. Hasse, P.M. Keller, A.K. Szafrńska, D. Hillemann, M. Chand, P.W. Schreiber, R. Sommerstein, C. Berger, M. Genoni, C. Rüegg, N. Troillet, A.F. Widmer, S.L. Becker, M. Herrmann, T. Eckmanns, S. Haller, C. Höller, S.B. Debast, M.J. Wolfhagen, J. Hopman, J. Kluytmans, M. Langelaar, D.W. Notermans, J.T. Oever, P. van den Barselaar, A.B.A. Vonk, M.C. Vos, N. Ahmed, T. Brown, D. Crook, T. Lamagni, N. Phin, E.G. Smith, M. Zambon, A. Serr, T. Götting, W. Ebner, A. Thürmer, C. Utpatel, C. Spröer, B. Bunk, U. Nübel, G.V. Bloemberg, E.C. Böttger, S. Niemann, D. Wagner, H. Sax // The Lancet Infectious Diseases. – 2017. – Vol. 17, № 10. – P. 1033-1041.
296. Van Ingen, J. Region of difference 1 in nontuberculous *Mycobacterium* species adds a phylogenetic and taxonomical character / J. Van Ingen, R. de Zwaan, R.

- Dekhuijzen, M. Boeree, D. van Soolingen // *Journal of Bacteriology*. – 2009. – Vol. 191, № 18. – P. 5865 – 5867.
297. Van Ingen, J. Resistance mechanisms and drug susceptibility testing of nontuberculous mycobacteria / J. Van Ingen, M.J. Boeree, D. van Soolingen, J.W. Mouton // *Drug resistance updates*. – 2012. – Vol. 15, № 3. – P. 149 – 161.
298. Van Soolingen, D. A Novel Pathogenic Taxon of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex, Canetti: Characterization of an Exceptional Isolate from Africa / D. Van Soolingen, T. Hoogenboezem, P.E. de Haas, P.W. Hermans, M.A. Koedam, K.S. Teppema, P.J. Brennan, G.S. Besra, F. Portaels, J. Top, L.M. Schouls, J.D. van Embden // *International Journal of Systematic Bacteriology*. – 1997. – Vol. 47, № 4. – P. 1236 – 1245.
299. Varma-Basil, M. Development of a novel pcr restriction analysis of the hsp65 gene as a rapid method to screen for the *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria in high-burden countries / M. Varma-Basil, K. Garima, R. Pathak, S.K.D. Dwivedi, A. Narang, A. Bhatnagar, M. Bose // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2013a. – Vol. 51, № 4. – P. 1165 – 1170.
300. Vassall, A. Rapid diagnosis of tuberculosis with the Xpert MTB/RIF assay in high burden countries: A cost-effectiveness analysis / A. Vassall, S. van Kampen, H. Sohn, J.S. Michael, K.R. John, S. den Boon, J.L. Davis, A. Whitelaw, M.P. Nicol, M.T. Gler, A. Khaliqov, C. Zamudio, M.D. Perkins, C.C. Boehme, F. Cobelens // *PLoS Medicine*. – 2011. – Vol. 8, № 11: e1001120.
301. Vynnycky, E. The natural history of tuberculosis: The implications of age-dependent risks of disease and the role of reinfection / E. Vynnycky, P.E.M. Fine // *Epidemiology and Infection*. – 1997. – Vol. 119, №2. – P. 183 – 201.
302. Wagner, D. Nontuberculous mycobacterial infections: A clinical review / D. Wagner, L.S. Young // *Infection* – 2004. – Vol. 32. – P. 257 – 270.
303. Wang, H. Performance of a real-time PCR assay for the rapid identification of *Mycobacterium* species / H. Wang, H. Kim, S. Kim, D.-k. Kim, S.-N. Cho, H. Lee // *Journal of Microbiology (Seoul, Korea)*. – 2015. – Vol. 53, № 1. – P. 38-46.

304. Wassilew, N. Pulmonary Disease Caused by Non-Tuberculous Mycobacteria / N. Wassilew, H. Hoffmann, C. Andrejak, C. Lange // *Respiration*. – 2016. – Vol. 91, №5. – P. 386 – 402.
305. Weinberger, M. Disseminated Infection with *Mycobacterium gordonae*: Report of a Case and Critical Review of the Literature / M. Weinberger, S.L. Berg, I.M. Feuerstein, P.A. Pizzo, F.G. Witebsky // *Clinical Infectious Diseases*. – 1992. – Vol. 14, № 6. – P. 1229 - 1239.
306. Weyer, K. Rapid molecular TB diagnosis: Evidence, policy making and global implementation of Xpert MTB/RIF / K. Weyer, F. Mirzayev, G.B. Migliori, W.V. Gemert, L. D'Ambrosio, M. Zignol, K. Floyd, R. Centis, D.M. Cirillo, E. Tortoli, C. Gilpin, J. de Dieu Iragena, D. Falzon, M. Raviglione // *European respiratory journal*. – 2013. – Vol. 42, № 1. – P. 252 – 271.
307. Winthrop, K. L. Nontuberculous Mycobacteria Infections and Anti-Tumor Necrosis Factor- α Therapy / K.L. Winthrop, Chang E, Yamashita S, Iademarco MF, L. PA. // *Emerging Infectious Diseases*. – 2009. – Vol. 15, №10. – P. 1556-1561.
308. Woods, G.L. Mycobacteria Other than *Mycobacterium tuberculosis*: Review of Microbiologic and Clinical Aspects / G.L. Woods, J.A. Washington // *Clinical Infectious Diseases*. – 1987. – Vol. 9, № 2. – P. 275–294.
309. World Health Organisation. 2016 Global Tuberculosis Report. [Электронный ресурс] / World Health Organisation. – 2016. – 214 p. - Режим доступа: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/250441/9789241565394-eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
310. World Health Organisation. Fluorescent Light-Emitting Diode (LED) Microscopy for Diagnosis of Tuberculosis: Policy Statement. [Электронный ресурс] // World Health Organisation. – 2011. – 16 p. - Режим доступа: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44602/9789241501613_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y
311. World Health Organization. Global tuberculosis report 2017. [Электронный ресурс] // World Health Organization – Geneva, 2017. – 262 p. - Режим доступа: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/259366>

312. World Health Organization. Global tuberculosis report 2018. [Электронный ресурс] // World Health Organization. – Geneva, 2018. - 277 p. - Режим доступа: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/274453>
313. World Health Organization. Global tuberculosis report 2020. [Электронный ресурс] // World Health Organization. – Geneva, 2020. - 232 p. Режим доступа: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240013131>
314. World Health Organization. Global tuberculosis report 2021. [Электронный ресурс] // World Health Organization. – Geneva, 2021. - 25 p. Режим доступа: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240037021>
315. World Health Organization. Global tuberculosis report 2022. [Электронный ресурс] // World Health Organization. – Geneva, 2022. - 68 p. Режим доступа: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240061729>
316. World Health Organization. Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis. [Электронный ресурс] // World Health Organization. – 2008. - 174 p. Режим доступа: <https://www.who.int/publications/i/item/9789241501583>
317. Wu, T.L. Rapid identification of mycobacteria from smear-positive sputum samples by nested PCR-restriction fragment length polymorphism analysis / T.L. Wu, J.H. Chia, A.J. Kuo, L.H. Su, T.S. Wu, H.C. Lai // Journal of Clinical Microbiology. – 2008. – Vol. 46, № 11. – P. 3591 – 3594.
318. Xu, K. Distinguishing nontuberculous mycobacteria from multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*, China / K. Xu, S. Bi, Z. Ji, H. Hu, F. Hu, B. Zheng, B. Wang, J. Ren, S. Yang, M. Deng, P. Chen, B. Ruan, J. Sheng, L. Li // Emerging infectious disease. – 2014. – Vol. 20, № 6. – P. 1060 - 1062.
319. Yang, Y. C. Evaluation of the Cobas TaqMan MTB test for direct detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens / Y.C. Yang, P.L. Lu, S.C. Huang, Y.S. Jenh, R. Jou, T.C. Chang // Journal of Clinical Microbiology. – 2011. – Vol. 49, № 3. – P. 797-801.
320. Zhao, X.Y. A Retrospective Study of Culture-confirmed Mycobacterial Infection among Hospitalized HIV-infected Patients in Beijing, China / X.Y. Zhao, Z.Y. Zeng,

- W.H. Hua, Y.H. Yu, C.P. Guo, X.Q. Zhao, H.Y. Dong, J. Liu, K.L. Wan // Biomedical & Environmental Sciences. – 2018. – Vol. 31, № 6. – P. 459 – 462.
321. Zhou, L. Biochip system for rapid and accurate identification of mycobacterial species from isolates and sputum / L. Zhou, G. Jiang, S. Wang, C. Wang, Q. Li, H. Yu, Y. Zhou, B. Zhao, H. Huang, W. Xing, K. Mitchelson, J. Cheng, Y. Zhao, Y. Guo // Journal of Clinical Microbiology. – 2010. – Vol. 48, № 10. – P. 3654 – 3660.
322. Ziehl, F. Zur Färbung des Tuberkelbacillus / Ziehl F. // Deutsche Medizinische Wochenschrift. – 1882. – Vol. 8. – P. 451.
323. Zimenkov, D. V. Detection of second-line drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* using oligonucleotide microarrays / D.V. Zimenkov, O.V. Antonova, A.V. Kuz'min, Y.D. Isaeva, L.Y. Krylova, S.A. Popov, A.S. Zasedatelev, V.M. Mikhailovich, D.A. Gryadunov // BMC Infectious Diseases. – 2013. – Vol. 13: 240.
324. Zimenkov, D. V. Evaluation of a low-density hydrogel microarray technique for mycobacterial species identification / D.V. Zimenkov, E.V. Kulagina, O.V. Antonova, M.A. Krasnova, E.N. Chernyaeva, V.Y. Zhuravlev, A.V. Kuz'min, S.A. Popov, A.S. Zasedatelev, D.A. Gryadunov // Journal of Clinical Microbiology. – 2015. – Vol. 53, № 4. – P. 1103 – 1114.
325. Zuber, B. Direct visualization of the outer membrane of mycobacteria and corynebacteria in their native state / B. Zuber, M. Chami, C. Houssin, J. Dubochet, G. Griffiths, M. Daffé // Journal of Bacteriology. – 2008. – Vol. 190, № 16. – P. 5672 - 5680.

ПРИЛОЖЕНИЯ

Приложение №1

Список геномов медленно растущих НТМБ из базы данных NCBI, использованных для предварительного выбора локусов для разработки тест-системы для видовой дифференциации

№	Название штамма	Идентификатор последовательности, Genbank, Nucleotide
1	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> strain MAH-E-63-1 MAH-E-63-1_S8_NODE_34	NZ_LMVV01000015.1
2	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> strain MAH-E-149-7 MAH-E-149-7_S5CLC_contig_48	NZ_LNAZ01000007.1
3	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> strain MAH-P-709-08 scf7180000003497	NZ_LNBN01000041.1
4	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> strain MAH-E-96-2 MAH-E-96-2_S9_NODE_176	NZ_LMVW01000101.1
5	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> strain MAH-E-61-1y contig_211	NZ_LNAI01000020.1
6	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> strain MAH-E-104-1 MAH-E-104-1_S11_NODE_22	NZ_LMVY01000008.1
7	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> strain MAH-E-101-6 MAH-E-101-6_S10_NODE_90	NZ_LMVX01000036.1
8	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> strain MAH-P-9060-06 scf7180000003890	NZ_LNBF01000066.1
9	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> strain MAH-E-89-1 MAH-E-89-1_S5_NODE_105	NZ_LMVS01000040.1
10	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> strain DH-2	NZ_BDMW01000099.1
11	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> strain MAHE-22-1 MAHE-22-1_S21_NODE_19	NZ_LMVT01000025.1
12	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> strain MAH-E-57-3 scf7180000003365	NZ_LMVU01000121.1
13	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> strain MAH-E-61-1t contig_186	NZ_LNAH01000007.1
14	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> strain MAHP-10058-06 scf7180000004963	NZ_LNBG01000171.1
15	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> strain MAH-E-108 MAH-E-108_S23_NODE_132	NZ_LMWA01000082.1
16	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> strain MAH-P-11082-03 scf7180000002786	NZ_LNAW01000023.1
17	<i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>hominissuis</i> strain MAH-P-772-08 scf7180000003823	NZ_LNBO01000022.1
18	<i>Mycobacterium chimaera</i> strain ZUERICH-1 chromosome complete genome	CP015272.1
19	<i>Mycobacterium chimaera</i> strain ZUERICH-2 chromosome complete genome	CP015267.1
20	<i>Mycobacterium chimaera</i> strain DSM 44623 chromosome complete genome	CP015278.1
21	<i>Mycobacterium chimaera</i> strain CDC 2015-22-71 complete genome	CP019221.1

Продолжение приложения №1

№	Название штамма	Идентификатор последовательности, Genbank, Nucleotide
22	<i>Mycobacterium chimaera</i> strain Mycobacterium chimaera MC045 genome assembly	LT703505.1
23	<i>Mycobacterium chimaera</i> strain AH16 chromosome complete genome	CP012885.2
24	<i>Mycobacterium indicus pranii</i> MTCC 9506 complete genome	CP002275.1
25	<i>Mycobacterium intracellulare</i> MOTT-64 complete genome	CP003324.1
26	<i>Mycobacterium intracellulare</i> ATCC 13950 complete genome	CP003322.1
27	<i>Mycobacterium intracellulare</i> subsp. <i>yongonense</i> 05-1390 chromosome complete genome	CP003347.1
28	<i>Mycobacterium intracellulare</i> MOTT-02 complete genome	CP003323.1
29	<i>Mycobacterium intracellulare</i> strain FLAC0181 complete genome	CP023149.1
30	<i>Mycobacterium intracellulare</i> strain FLAC0133 complete genome	CP023146.1
31	<i>Mycobacterium gordonae</i> strain CTRI 14-8773, whole genome shotgun sequencing project	NZ_LKTM00000000.1
32	<i>Mycobacterium kansasii</i> 824 complete genome	CP009483.1
34	<i>Mycobacterium kansasii</i> ATCC 12478 complete genome	CP006835.1
35	<i>Mycobacterium lentiflavum</i> strain CSUR P1491, whole genome shotgun sequence	NZ_CTEE01000001.1
36	<i>Mycobacterium marinum</i> strain CCUG20998 chromosome complete genome	CP024190.1
37	<i>Mycobacterium marinum</i> strain 1218R chromosome complete genome	CP025779.1
38	<i>Mycobacterium marinum</i> ATCC 927 DNA complete genome	AP018496.1
39	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i> strain DSM 43992 NODE_10, whole genome shotgun sequence	MVIJ01000010.1
40	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i> strain E3039 contig_60, whole genome shotgun sequence	LZJW01000141.1
41	<i>Mycobacterium scrofulaceum</i> strain E2838 contig_350, whole genome shotgun sequence	LZJY01000280.1
42	<i>Mycobacterium simiae</i> ATCC 25275 = DSM 44165 WGS project CBMJ000000000 data, contig 00006, whole genome shotgun sequence	CBMJ020000006.1
43	<i>Mycobacterium xenopi</i> 4042 GMX4042.contig.25, whole genome shotgun sequence	JA0B01000026.1
44	<i>Mycobacterium xenopi</i> RIVM700367 contig5, whole genome shotgun sequence	AJFI01000005.1
45	<i>Mycobacterium xenopi</i> 3993 GMX3993.contig.21, whole genome shotgun sequence	JAOC01000022.1

Приложение №2

Список геномов быстрорастущих НТМБ из базы данных NCBI, использованных для предварительного выбора локусов для разработки тест-системы для видовой дифференциации

№	Название штамма	Идентификатор последовательности, Genbank, Nucleotide
1	<i>Mycobacterium abscessus</i> strain FLAC055, complete genome	CP016193.1
2	<i>Mycobacterium abscessus</i> strain FLAC006, complete genome	CP016188.1
3	<i>Mycobacterium abscessus</i> strain FLAC054, complete genome	CP014961.1
4	<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> strain MM1513, complete genome	CP009447.1
5	<i>Mycobacterium abscessus</i> strain FLAC049, complete genome	CP014960.1
6	<i>Mycobacterium abscessus</i> strain FLAC003, complete genome	CP014950.1
7	<i>Mycobacterium abscessus</i> strain FLAC046, complete genome	CP016192.1
8	<i>Mycobacterium abscessus</i> strain FLAC028, complete genome	CP016190.1
9	<i>Mycobacterium abscessus</i> strain FLAC029, complete genome	CP014956.1
10	<i>Mycobacterium abscessus</i> strain FLAC013, complete genome	CP014955.1
11	<i>Mycobacterium abscessus</i> strain NOV0213, complete genome	CP013049.1
12	<i>Mycobacterium abscessus</i> UC22, complete genome	CP012044.1
13	<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> strain MC1518, complete genome	CP009613.1
14	<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> strain MA 1948, complete genome	CP009408.1
15	<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i> 103, complete genome	CP009407.1
16	<i>Mycobacterium abscessus</i> ATCC 19977 chromosome, complete sequence	CU458896.1
17	<i>Mycobacterium abscessus</i> strain FLAC031, complete genome	CP014957.1
18	<i>Mycobacterium chelonae</i> CCUG 47445, complete genome	CP007220.1
19	<i>Mycobacterium chelonae</i> genome	CP010946.1
20	<i>Mycobacterium fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i> DSM 46621 = ATCC 6841 genome	CP014258.1
21	<i>Mycobacterium mucogenicum</i> genome assembly <i>Mycobacterium mucogenicum</i> , contig contig00007, whole genome shotgun sequence	CYSI01000007.1
22	<i>Mycobacterium mucogenicum</i> strain 1127319.6 contig_179, whole genome shotgun sequence	LZLC01000089.1
23	<i>Mycobacterium mucogenicum</i> strain CCH12-A2 CCH12-A2_contig260, whole genome shotgun sequence	LSKL01000260.1
24	<i>Mycobacterium mucogenicum</i> strain CCH10-A2 CCH10-A2_contig215, whole genome shotgun sequence	LSKA01000198.1
25	<i>Mycobacterium peregrinum</i> strain ACS819 contig_13, whole genome shotgun sequence	LZIB01000005.1
26	<i>Mycobacterium peregrinum</i> strain 852002-10433_SCH5171157 contig_185, whole genome shotgun sequence	LZSY01000096.1
27	<i>Mycobacterium peregrinum</i> strain TRL0025866 contig_57, whole genome shotgun sequence	NCSV01000057.1
28	<i>Mycobacterium peregrinum</i> strain DSM 43271 contig_31, whole genome shotgun sequence	LQPP01000025.1

Продолжение приложения № 2

29	<i>Mycobacterium peregrinum</i> genome assembly <i>Mycobacterium peregrinum</i> , contig contig00007, whole genome shotgun sequence	CYSH01000007.1
30	<i>Mycobacterium smegmatis</i> strain INHR2, complete genome	CP009496.1
31	<i>Mycobacterium smegmatis</i> strain INHR1, complete genome	CP009495.1
32	<i>Mycobacterium smegmatis</i> str. MC2 155 complete genome	CP009494.1
33	<i>Mycobacterium smegmatis</i> genome assembly NCTC8159 chromosome	LN831039.1

Области посадки разработанных праймеров и зондов, входящих в состав тест-системы для
идентификации 12 видов НТМБ

Вид НТМБ	Область посадки прямого праймера	Область посадки зондов	Область посадки обратного праймера
<i>M. intracellulare</i>			
<i>M. xenopi</i>			
<i>M. avium</i>			

[illegible]

[illegible]

[illegible]

Приложение №4

Показатели внутривыставочной сходимости результатов выявления ДНК микобактерий, полученные с помощью тест-системы ПЦР-РВ(д) для одновременного выявления ДНК МБТК и НТМБ на амплификаторах CFX*, ДТ*, АНК*

№	Образец, содержащий	Показатель	Пороговое значение				Интерпретация	№	Образец, содержащий	Показатель	Пороговое значение				Интерпретация
			FAM	ROX	HEX	Cy5					FAM	ROX	HEX	Cy5	
Результаты, полученные на амплификаторе CFX*															
1	<i>M.tuberculosis</i>	Cp	32,68	36,31	30,33	-	МБТК	9	<i>M.kansasii</i>	Cp	-	-	32,38	28,30	НТМБ
		CO	0,11	0,22	0,11	-				CO	-	-	0,07	0,29	
		CV(%)	0,34	0,61	0,38	-				CV(%)	-	-	0,21	1,01	
2	<i>M.tuberculosis</i>	Cp	28,84	32,58	30,34	-	МБТК	10	<i>M.xenopi</i>	Cp	-	-	33,87	30,61	НТМБ
		CO	0,18	0,37	0,06	-				CO	-	-	0,09	0,18	
		CV(%)	0,62	1,12	0,18	-				CV(%)	-	-	0,26	0,59	
3	<i>M.tuberculosis</i>	Cp	29,81	34,30	30,10	-	МБТК	11	<i>M.xenopi</i>	Cp	-	-	32,41	29,30	НТМБ
		CO	0,11	0,16	0,10	-				CO	-	-	0,07	0,11	
		CV(%)	0,37	0,46	0,32	-				CV(%)	-	-	0,23	0,38	
4	<i>M.avium</i>	Cp	-	-	32,43	29,59	НТМБ	12	<i>M.xenopi</i>	Cp	-	-	32,91	29,48	НТМБ
		CO	-	-	0,10	0,14				CO	-	-	0,09	0,21	
		CV(%)	-	-	0,32	0,48				CV(%)	-	-	0,27	0,70	
5	<i>M.avium</i>	Cp	-	-	32,97	30,39	НТМБ	13	<i>M.malmoense</i>	Cp	-	-	31,14	30,35	НТМБ
		CO	-	-	0,11	0,11				CO	-	-	0,09	0,23	
		CV(%)	-	-	0,32	0,36				CV(%)	-	-	0,30	0,77	
6	<i>M.avium</i>	Cp	-	-	31,39	29,80	НТМБ	14	<i>M.malmoense</i>	Cp	-	-	32,06	30,50	НТМБ
		CO	-	-	0,09	0,17				CO	-	-	0,06	0,22	
		CV(%)	-	-	0,30	0,58				CV(%)	-	-	0,19	0,71	
7	<i>M.kansasii</i>	Cp	-	-	32,55	29,21	НТМБ	15	<i>M.malmoense</i>	Cp	-	-	32,33	30,06	НТМБ
		CO	-	-	0,04	0,09				CO	-	-	0,06	0,30	
		CV(%)	-	-	0,12	0,31				CV(%)	-	-	0,19	0,99	
8	<i>M.kansasii</i>	Cp	-	-	32,73	29,23	НТМБ	16	Микобактерии отсутствуют	Cp	-	-	30,19	-	Микобактерии отсутствуют
		CO	-	-	0,12	0,25				CO	-	-	0,09	-	
		CV(%)	-	-	0,37	0,84				CV(%)	-	-	0,31	-	

Продолжение приложения №4

№	Образец, содержащий	Показатель	Пороговое значение				Интерпретация	№	Образец, содержащий	Показатель	Пороговое значение				Интерпретация
			FAM	ROX	HEX	Cy5					FAM	ROX	HEX	Cy5	
Результаты, полученные на амплификаторе CFX*															
17	Микобактерии отсутствуют	Ср	-	-	30,78	-	Микобактерии отсутствуют	18	Микобактерии отсутствуют	Ср	-	-	30,97	-	Микобактерии отсутствуют
		СО	-	-	0,13	-				СО	-	-	0,02	-	
		CV(%)	-	-	0,41	-				CV(%)	-	-	0,05	-	
Результаты, полученные на амплификаторе ДТ*															
1	<i>M.tuberculosis</i>	Ср	30,89	33,62	27,45	-	МБТК	8	<i>M.kansasii</i>	Ср	-	-	31,00	26,79	НТМБ
		СО	0,11	0,22	0,11	-				СО	-	-	0,12	0,25	
		CV(%)	0,36	0,66	0,42	-				CV(%)	-	-	0,39	0,92	
2	<i>M.tuberculosis</i>	Ср	26,49	30,13	28,31	-	МБТК	9	<i>M.kansasii</i>	Ср	-	-	29,58	26,68	НТМБ
		СО	0,18	0,37	0,06	-				СО	-	-	0,07	0,29	
		CV(%)	0,67	1,21	0,20	-				CV(%)	-	-	0,22	1,07	
3	<i>M.tuberculosis</i>	Ср	27,96	32,00	27,76	-	МБТК	10	<i>M.xenopi</i>	Ср	-	-	31,77	28,04	НТМБ
		СО	0,11	0,23	0,10	-				СО	-	-	0,09	0,18	
		CV(%)	0,39	0,71	0,35	-				CV(%)	-	-	0,28	0,64	
4	<i>M.avium</i>	Ср	-	-	30,39	27,03	НТМБ	11	<i>M.xenopi</i>	Ср	-	-	30,70	27,45	НТМБ
		СО	-	-	0,10	0,14				СО	-	-	0,07	0,11	
		CV(%)	-	-	0,34	0,52				CV(%)	-	-	0,24	0,41	
5	<i>M.avium</i>	Ср	-	-	29,96	28,22	НТМБ	12	<i>M.xenopi</i>	Ср	-	-	30,43	27,47	НТМБ
		СО	-	-	0,11	0,11				СО	-	-	0,09	0,21	
		CV(%)	-	-	0,35	0,39				CV(%)	-	-	0,29	0,76	
6	<i>M.avium</i>	Ср	-	-	29,63	26,83	НТМБ	13	<i>M.malmoense</i>	Ср	-	-	28,95	27,95	НТМБ
		СО	-	-	0,09	0,17				СО	-	-	0,09	0,23	
		CV(%)	-	-	0,32	0,64				CV(%)	-	-	0,32	0,83	
7	<i>M.kansasii</i>	Ср	-	-	30,26	27,33	НТМБ	14	<i>M.malmoense</i>	Ср	-	-	29,60	28,64	НТМБ
		СО	-	-	0,04	0,09				СО	-	-	0,06	0,22	
		CV(%)	-	-	0,13	0,33				CV(%)	-	-	0,20	0,75	

Продолжение приложения №4

№	Образец, содержащий	Показатель	Пороговое значение				Интерпретация	№	Образец, содержащий	Показатель	Пороговое значение				Интерпретация
			FAM	ROX	HEX	Cy5					FAM	ROX	HEX	Cy5	
Результаты, полученные на амплификаторе ДТ*															
15	M.malmoense	Ср	-	-	30,34	27,80	НТМБ	17	микобактерии отсутствуют	Ср	-	-	28,79	-	микобактерии отсутствуют
		СО	-	-	0,06	0,30				СО	-	-	0,13	-	
		CV(%)	-	-	0,20	1,07				CV(%)	-	-	0,44	-	
16	микобактерии отсутствуют	Ср	-	-	27,70	-	микобактерии отсутствуют	18	микобактерии отсутствуют	Ср	-	-	29,58	-	микобактерии отсутствуют
		СО	-	-	0,09	-				СО	-	-	0,02	-	
		CV(%)	-	-	0,33	-									
Результаты, полученные на амплификаторе АНК*															
1	M.tuberculosis	Ср	32,76	35,73	30,59	-	МБТК	7	M.kansasii	Ср	-	-	32,82	29,31	НТМБ
		СО	0,22	0,18	0,08	-				СО	-	-	0,19	0,16	
		CV(%)	0,67	0,49	0,27	-				CV(%)	-	-	0,57	0,55	
2	M.tuberculosis	Ср	29,00	32,40	30,12	-	МБТК	8	M.kansasii	Ср	-	-	33,01	29,42	НТМБ
		СО	0,37	0,06	0,10	-				СО	-	-	0,10	0,10	
		CV(%)	1,26	0,20	0,33	-				CV(%)	-	-	0,31	0,35	
3	M.tuberculosis	Ср	30,33	33,94	30,04	-	МБТК	9	M.kansasii	Ср	-	-	32,65	28,10	НТМБ
		СО	0,23	0,10	0,11	-				СО	-	-	0,07	0,09	
		CV(%)	0,75	0,31	0,35	-				CV(%)	-	-	0,22	0,33	
4	M.avium	Ср	-	-	32,30	29,59	НТМБ	10	M.xenopi	Ср	-	-	34,56	30,95	НТМБ
		СО	-	-	0,11	0,24				СО	-	-	0,17	0,13	
		CV(%)	-	-	0,36	0,82				CV(%)	-	-	0,50	0,42	
5	M.avium	Ср	-	-	33,33	30,43	НТМБ	11	M.xenopi	Ср	-	-	32,43	29,26	НТМБ
		СО	-	-	0,07	0,15				СО	-	-	0,10	0,17	
		CV(%)	-	-	0,20	0,49				CV(%)	-	-	0,32	0,57	
6	M.avium	Ср	-	-	31,54	30,60	НТМБ	12	M.xenopi	Ср	-	-	33,12	29,89	НТМБ
		СО	-	-	0,05	0,12				СО	-	-	0,05	0,23	
		CV(%)	-	-	0,15	0,39				CV(%)	-	-	0,14	0,75	

Продолжение приложения №4

№	Образец, содержащий	Показатель	Пороговое значение				Интерпретация	№	Образец, содержащий	Показатель	Пороговое значение				Интерпретация
			FAM	ROX	HEX	Cy5					FAM	ROX	HEX	Cy5	
Результаты, полученные на амплификаторе АНК*															
13	M.malmoense	Ср	-	-	31,65	30,28	НТМБ	16	микобактерии отсутствуют	Ср	-	-	29,92	-	микобактерии отсутствуют
		CO	-	-	0,16	0,33				CO	-	-	0,13	-	
		CV(%)	-	-	0,50	1,10				CV(%)	-	-	0,44	-	
14	M.malmoense	Ср	-	-	31,93	31,08	НТМБ	17	микобактерии отсутствуют	Ср	-	-	31,05	-	микобактерии отсутствуют
		CO	-	-	0,04	0,08				CO	-	-	0,08	-	
		CV(%)	-	-	0,14	0,27				CV(%)	-	-	0,25	-	
15	M.malmoense	Ср	-	-	31,70	29,73	НТМБ	18	микобактерии отсутствуют	Ср	-	-	30,47	-	микобактерии отсутствуют
		CO	-	-	0,02	0,22				CO	-	-	0,12	-	
		CV(%)	-	-	0,08	0,75				CV(%)	-	-	0,41	-	

Примечание:

- CFX - термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот с модулем CFX96 (BioRad Laboratories, Inc, США);
- ДТ - амплификатор ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ», Россия);
- АНК - амплификатор АНК 32 М (ФГБУН ИАП РАН, Россия)
- Ср - среднее значение величины порогового цикла амплификации (пять повторностей)
- СО - стандартное отклонение
- CV(%) - коэффициент вариации значений пороговых циклов амплификации

Приложение №5

Показатели внутривыставочной сходимости результатов видового определения микобактерий, полученные с помощью тест-системы ПЦР-РВ(и) для видовой идентификации НТМБ на амплификаторах CFX*, ДТ*, АНК*

№	Образец, содержащий	Показатель	Пороговое значение																				Интерпретация	
			1 пробирка				2 пробирка				3 пробирка				4 пробирка				5 пробирка					
			FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5		
Результаты, полученные на амплификаторе CFX*																								
1	M.tuberculosis	Cp	32,43	-	36,33	30,66	-	-	-	30,79	-	-	-	30,06	-	-	-	30,08	-	-	-	30,16	МБТК	
		CO	0,17	-	0,11	0,10	-	-	-	0,17	-	-	-	0,16	-	-	-	0,15	-	-	-	0,10		
		CV(%)	0,52	-	0,31	0,34	-	-	-	0,55	-	-	-	0,54	-	-	-	0,54	-	-	-	0,34		
2	M.tuberculosis	Cp	29,21	-	32,52	30,49	-	-	-	30,50	-	-	-	30,32	-	-	-	30,30	-	-	-	30,59	МБТК	
		CO	0,13	-	0,18	0,17	-	-	-	0,11	-	-	-	0,14	-	-	-	0,16	-	-	-	0,06		
		CV(%)	0,43	-	0,55	0,57	-	-	-	0,36	-	-	-	0,47	-	-	-	0,47	-	-	-	0,19		
3	M.tuberculosis	Cp	30,34	-	33,75	30,49	-	-	-	30,95	-	-	-	30,41	-	-	-	30,41	-	-	-	30,55	МБТК	
		CO	0,14	-	0,11	0,11	-	-	-	0,09	-	-	-	0,06	-	-	-	0,06	-	-	-	0,06		
		CV(%)	0,47	-	0,32	0,37	-	-	-	0,31	-	-	-	0,19	-	-	-	0,19	-	-	-	0,20		
4	M.intracellulare	Cp	-	29,02	-	32,53	29,80	-	-	32,63	-	-	-	31,29	-	-	-	32,18	-	-	-	30,79	M.intracellulare	
		CO	-	0,18	-	0,12	0,11	-	-	0,03	-	-	-	0,05	-	-	-	0,03	-	-	-	0,11		
		CV(%)	-	0,62	-	0,36	0,38	-	-	0,10	-	-	-	0,16	-	-	-	0,11	-	-	-	0,35		
5	M.intracellulare	Cp	-	29,58	-	33,50	30,23	-	-	33,80	-	-	-	32,86	-	-	-	31,98	-	-	-	30,87	M.intracellulare	
		CO	-	0,10	-	0,06	0,18	-	-	0,11	-	-	-	0,06	-	-	-	0,10	-	-	-	0,26		
		CV(%)	-	0,34	-	0,18	0,58	-	-	0,32	-	-	-	0,17	-	-	-	0,32	-	-	-	0,85		
6	M.intracellulare	Cp	-	30,38	-	31,34	31,09	-	-	32,03	-	-	-	31,16	-	-	-	31,02	-	-	-	30,75	M.intracellulare	
		CO	-	0,10	-	0,08	0,10	-	-	0,09	-	-	-	0,06	-	-	-	0,06	-	-	-	0,12		
		CV(%)	-	0,32	-	0,24	0,32	-	-	0,29	-	-	-	0,20	-	-	-	0,18	-	-	-	0,40		
7	M.xenopi	Cp	-	30,48	-	33,83	-	31,16	-	34,88	-	-	-	33,36	-	-	-	33,81	-	-	-	32,10	M.xenopi	
		CO	-	0,12	-	0,11	-	0,12	-	0,06	-	-	-	0,09	-	-	-	0,16	-	-	-	0,07		
		CV(%)	-	0,39	-	0,33	-	0,39	-	0,17	-	-	-	0,26	-	-	-	0,46	-	-	-	0,21		
8	M.xenopi	Cp	-	29,30	-	32,49	-	30,01	-	32,56	-	-	-	31,34	-	-	-	31,94	-	-	-	32,86	M.xenopi	
		CO	-	0,20	-	0,03	-	0,16	-	0,05	-	-	-	0,12	-	-	-	0,10	-	-	-	0,07		
		CV(%)	-	0,70	-	0,09	-	0,52	-	0,17	-	-	-	0,38	-	-	-	0,32	-	-	-	0,23		
9	M.xenopi	Cp	-	29,45	-	32,93	-	30,13	-	33,14	-	-	-	31,87	-	-	-	31,68	-	-	-	31,66	M.xenopi	
		CO	-	0,10	-	0,19	-	0,13	-	0,19	-	-	-	0,12	-	-	-	0,11	-	-	-	0,09		
		CV(%)	-	0,36	-	0,58	-	0,42	-	0,58	-	-	-	0,38	-	-	-	0,33	-	-	-	0,30		
10	M.avium	Cp	-	29,24	-	32,48	-	-	29,77	32,57	-	-	-	32,51	-	-	-	32,40	-	-	-	31,78	M.avium	
		CO	-	0,09	-	0,10	-	-	0,14	0,11	-	-	-	0,15	-	-	-	0,14	-	-	-	0,08		
		CV(%)	-	0,32	-	0,31	-	-	0,46	0,34	-	-	-	0,45	-	-	-	0,45	-	-	-	0,26		

Продолжение приложения №5

№	Образец, содержащий	Показатель	Пороговое значение																				Интерпретация	
			1 пробирка				2 пробирка				3 пробирка				4 пробирка				5 пробирка					
			FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5		
Результаты, полученные на амплификаторе CFX*																								
11	M.avium	Cp	-	30,74	-	32,75	-	-	31,32	32,69	-	-	-	32,22	-	-	-	31,87	-	-	-	31,50	M.avium	
		CO	-	0,17	-	0,10	-	-	0,27	0,04	-	-	-	0,15	-	-	-	0,06	-	-	-	0,12		
		CV(%)	-	0,54	-	0,30	-	-	0,85	0,12	-	-	-	0,47	-	-	-	0,19	-	-	-	0,39		
12	M.avium	Cp	-	30,06	-	31,36	-	-	30,81	32,09	-	-	-	31,57	-	-	-	30,78	-	-	-	31,52	M.avium	
		CO	-	0,14	-	0,09	-	-	0,11	0,09	-	-	-	0,05	-	-	-	0,03	-	-	-	0,09		
		CV(%)	-	0,48	-	0,28	-	-	0,35	0,28	-	-	-	0,15	-	-	-	0,10	-	-	-	0,27		
13	M.kansasii	Cp	-	29,62	-	32,70	-	-	-	32,99	-	-	-	32,16	-	-	-	31,72	-	-	-	32,26	M.kansasii	
		CO	-	0,23	-	0,08	-	-	-	0,14	-	-	-	0,13	-	-	-	0,09	-	-	-	0,08		
		CV(%)	-	0,79	-	0,25	-	-	-	0,42	-	-	-	0,41	-	-	-	0,28	-	-	-	0,23		
14	M.kansasii	Cp	-	29,68	-	32,96	-	-	-	33,61	-	-	-	32,12	-	-	-	32,89	-	-	-	32,63	M.kansasii	
		CO	-	0,19	-	0,08	-	-	-	0,06	-	-	-	0,02	-	-	-	0,04	-	-	-	0,06		
		CV(%)	-	0,65	-	0,26	-	-	-	0,17	-	-	-	0,07	-	-	-	0,12	-	-	-	0,20		
15	M.kansasii	Cp	-	28,65	-	31,82	-	-	-	33,19	-	-	-	31,79	-	-	-	32,21	-	-	-	31,50	M.kansasii	
		CO	-	0,20	-	0,20	-	-	-	0,08	-	-	-	0,04	-	-	-	0,12	-	-	-	0,06		
		CV(%)	-	0,69	-	0,62	-	-	-	0,24	-	-	-	0,12	-	-	-	0,39	-	-	-	0,18		
16	M.gordonae	Cp	-	29,12	-	33,28	-	-	-	33,59	-	29,89	-	33,48	-	-	-	32,27	-	-	-	33,28	M.gordonae	
		CO	-	0,24	-	0,12	-	-	-	0,05	-	0,31	-	0,04	-	-	-	0,10	-	-	-	0,09		
		CV(%)	-	0,83	-	0,35	-	-	-	0,16	-	1,03	-	0,12	-	-	-	0,31	-	-	-	0,27		
17	M.gordonae	Cp	-	30,36	-	33,28	-	-	-	34,36	-	31,01	-	33,11	-	-	-	32,84	-	-	-	33,86	M.gordonae	
		CO	-	0,20	-	0,10	-	-	-	0,07	-	0,29	-	0,06	-	-	-	0,12	-	-	-	0,14		
		CV(%)	-	0,66	-	0,30	-	-	-	0,20	-	0,94	-	0,19	-	-	-	0,36	-	-	-	0,41		
18	M.gordonae	Cp	-	30,70	-	32,99	-	-	-	33,13	-	31,38	-	33,64	-	-	-	32,86	-	-	-	32,28	M.gordonae	
		CO	-	0,07	-	0,08	-	-	-	0,04	-	0,11	-	0,11	-	-	-	0,19	-	-	-	0,10		
		CV(%)	-	0,24	-	0,23	-	-	-	0,12	-	0,35	-	0,33	-	-	-	0,58	-	-	-	0,32		
19	M.lentiflavum	Cp	-	30,04	-	33,81	-	-	-	34,65	-	-	30,90	33,24	-	-	-	32,76	-	-	-	33,07	M.lentiflavum	
		CO	-	0,12	-	0,06	-	-	-	0,12	-	-	0,14	0,18	-	-	-	0,08	-	-	-	0,16		
		CV(%)	-	0,41	-	0,16	-	-	-	0,35	-	-	0,44	0,54	-	-	-	0,23	-	-	-	0,47		
20	M.lentiflavum	Cp	-	29,67	-	30,79	-	-	-	32,14	-	-	30,25	30,43	-	-	-	29,86	-	-	-	32,81	M.lentiflavum	
		CO	-	0,17	-	0,04	-	-	-	0,06	-	-	0,18	0,16	-	-	-	0,07	-	-	-	0,12		
		CV(%)	-	0,58	-	0,14	-	-	-	0,19	-	-	0,60	0,53	-	-	-	0,24	-	-	-	0,36		
21	M.lentiflavum	Cp	-	29,55	-	33,55	-	-	-	34,46	-	-	30,33	33,26	-	-	-	32,93	-	-	-	33,54	M.lentiflavum	
		CO	-	0,28	-	0,18	-	-	-	0,05	-	-	0,27	0,08	-	-	-	0,08	-	-	-	0,17		
		CV(%)	-	0,95	-	0,52	-	-	-	0,16	-	-	0,87	0,23	-	-	-	0,25	-	-	-	0,51		

Продолжение приложения №5

№	Образец, содержащий	Показатель	Пороговое значение																				Интерпретация
			1 пробирка				2 пробирка				3 пробирка				4 пробирка				5 пробирка				
			FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	
Результаты, полученные на амплификаторе CFX*																							
22	M.abscessus	Cp	-	29,87	-	32,24	-	-	-	32,61	-	-	-	32,20	30,70	-	-	32,24	-	-	-	32,74	M.abscessus
		CO	-	0,28	-	0,18	-	-	-	0,05	-	-	-	0,08	0,31	-	-	0,08	-	-	-	0,04	
		CV(%)	-	0,94	-	0,55	-	-	-	0,17	-	-	-	0,24	1,00	-	-	0,26	-	-	-	0,12	
23	M.abscessus	Cp	-	29,48	-	31,83	-	-	-	31,92	-	-	-	32,41	30,26	-	-	32,20	-	-	-	32,62	M.abscessus
		CO	-	0,27	-	0,16	-	-	-	0,13	-	-	-	0,06	0,32	-	-	0,04	-	-	-	0,09	
		CV(%)	-	0,93	-	0,49	-	-	-	0,40	-	-	-	0,19	1,06	-	-	0,12	-	-	-	0,27	
24	M.abscessus	Cp	-	28,81	-	30,94	-	-	-	32,00	-	-	-	30,78	29,50	-	-	30,52	-	-	-	32,72	M.abscessus
		CO	-	0,19	-	0,12	-	-	-	0,09	-	-	-	0,04	0,14	-	-	0,09	-	-	-	0,05	
		CV(%)	-	0,66	-	0,38	-	-	-	0,29	-	-	-	0,12	0,48	-	-	0,29	-	-	-	0,17	
25	M.chelonae	Cp	-	28,99	-	31,02	-	-	-	31,46	-	-	-	30,84	-	29,60	-	30,45	-	-	-	32,47	M.chelonae
		CO	-	0,21	-	0,12	-	-	-	0,15	-	-	-	0,04	-	0,21	-	0,06	-	-	-	0,06	
		CV(%)	-	0,73	-	0,38	-	-	-	0,47	-	-	-	0,13	-	0,72	-	0,21	-	-	-	0,19	
26	M.chelonae	Cp	-	29,66	-	31,45	-	-	-	32,27	-	-	-	30,89	-	30,42	-	30,95	-	-	-	32,57	M.chelonae
		CO	-	0,13	-	0,18	-	-	-	0,06	-	-	-	0,12	-	0,23	-	0,16	-	-	-	0,04	
		CV(%)	-	0,44	-	0,57	-	-	-	0,17	-	-	-	0,39	-	0,74	-	0,53	-	-	-	0,11	
27	M.chelonae	Cp	-	30,46	-	31,82	-	-	-	31,77	-	-	-	31,56	-	31,29	-	30,60	-	-	-	33,28	M.chelonae
		CO	-	0,11	-	0,06	-	-	-	0,20	-	-	-	0,04	-	0,13	-	0,05	-	-	-	0,08	
		CV(%)	-	0,35	-	0,18	-	-	-	0,63	-	-	-	0,14	-	0,43	-	0,17	-	-	-	0,25	
28	M. mucogenicum	Cp	-	30,20	-	32,95	-	-	-	33,48	-	-	-	33,05	-	-	30,50	33,15	-	-	-	32,74	M. mucogenicum
		CO	-	0,13	-	0,06	-	-	-	0,10	-	-	-	0,08	-	-	0,33	0,03	-	-	-	0,04	
		CV(%)	-	0,43	-	0,19	-	-	-	0,31	-	-	-	0,23	-	-	1,07	0,10	-	-	-	0,12	
29	M. mucogenicum	Cp	-	29,77	-	32,28	-	-	-	32,83	-	-	-	32,39	-	-	29,40	32,48	-	-	-	32,62	M. mucogenicum
		CO	-	0,28	-	0,07	-	-	-	0,10	-	-	-	0,06	-	-	0,10	0,03	-	-	-	0,09	
		CV(%)	-	0,95	-	0,21	-	-	-	0,29	-	-	-	0,17	-	-	0,34	0,11	-	-	-	0,27	
30	M. mucogenicum	Cp	-	28,83	-	30,63	-	-	-	31,53	-	-	-	31,36	-	-	30,33	31,82	-	-	-	32,72	M. mucogenicum
		CO	-	0,23	-	0,08	-	-	-	0,08	-	-	-	0,03	-	-	0,13	0,13	-	-	-	0,05	
		CV(%)	-	0,79	-	0,28	-	-	-	0,26	-	-	-	0,10	-	-	0,44	0,42	-	-	-	0,17	
31	M. fortuitum	Cp	-	29,80	-	33,00	-	-	-	33,53	-	-	-	32,73	-	-	-	31,73	30,40	-	-	31,31	M. fortuitum
		CO	-	0,24	-	0,08	-	-	-	0,02	-	-	-	0,09	-	-	-	0,08	0,32	-	-	0,09	
		CV(%)	-	0,81	-	0,25	-	-	-	0,07	-	-	-	0,29	-	-	-	0,26	1,05	-	-	0,27	
32	M. fortuitum	Cp	-	28,68	-	31,78	-	-	-	31,73	-	-	-	31,79	-	-	-	31,74	29,30	-	-	31,38	M. fortuitum
		CO	-	0,11	-	0,11	-	-	-	0,11	-	-	-	0,10	-	-	-	0,11	0,10	-	-	0,09	
		CV(%)	-	0,40	-	0,34	-	-	-	0,33	-	-	-	0,30	-	-	-	0,35	0,30	-	-	0,29	

Продолжение приложения №5

№	Образец, содержащий	Показатель	Пороговое значение																				Интерпретация
			1 пробирка				2 пробирка				3 пробирка				4 пробирка				5 пробирка				
			FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	
Результаты, полученные на амплификаторе CFX*																							
33	M. fortuitum	Cp	-	29,61	-	32,77	-	-	-	32,81	-	-	-	32,20	-	-	-	31,35	30,30	-	-	32,22	M. fortuitum
		CO	-	0,10	-	0,17	-	-	-	0,08	-	-	-	0,12	-	-	-	0,09	0,13	-	-	0,09	
		CV(%)	-	0,35	-	0,51	-	-	-	0,24	-	-	-	0,38	-	-	-	0,28	0,42	-	-	0,29	
34	M. smegmatis	Cp	-	29,01	-	31,78	-	-	-	33,14	-	-	-	31,88	-	-	-	32,18	-	29,65	-	31,38	M. smegmatis
		CO	-	0,17	-	0,06	-	-	-	0,10	-	-	-	0,07	-	-	-	0,10	-	0,16	-	0,16	
		CV(%)	-	0,58	-	0,20	-	-	-	0,31	-	-	-	0,21	-	-	-	0,31	-	0,54	-	0,51	
35	M. smegmatis	Cp	-	30,97	-	32,18	-	-	-	33,04	-	-	-	31,62	-	-	-	31,54	-	31,71	-	32,45	M. smegmatis
		CO	-	0,18	-	0,07	-	-	-	0,11	-	-	-	0,02	-	-	-	0,06	-	0,16	-	0,06	
		CV(%)	-	0,57	-	0,21	-	-	-	0,32	-	-	-	0,06	-	-	-	0,18	-	0,53	-	0,18	
36	M. smegmatis	Cp	-	29,65	-	31,08	-	-	-	31,99	-	-	-	30,01	-	-	-	30,87	-	30,22	-	32,81	M. smegmatis
		CO	-	0,12	-	0,08	-	-	-	0,09	-	-	-	0,10	-	-	-	0,07	-	0,18	-	0,12	
		CV(%)	-	0,42	-	0,25	-	-	-	0,29	-	-	-	0,33	-	-	-	0,21	-	0,59	-	0,36	
37	M.peregrinum	Cp	-	29,73	-	33,73	-	-	-	34,81	-	-	-	33,75	-	-	-	33,31	-	-	29,85	32,47	M.peregrinum
		CO	-	0,09	-	0,11	-	-	-	0,07	-	-	-	0,12	-	-	-	0,08	-	-	0,19	0,06	
		CV(%)	-	0,32	-	0,32	-	-	-	0,19	-	-	-	0,35	-	-	-	0,24	-	-	0,64	0,19	
38	M.peregrinum	Cp	-	29,21	-	30,53	-	-	-	30,56	-	-	-	31,18	-	-	-	31,63	-	-	30,27	32,57	M.peregrinum
		CO	-	0,26	-	0,06	-	-	-	0,10	-	-	-	0,08	-	-	-	0,07	-	-	0,32	0,04	
		CV(%)	-	0,88	-	0,18	-	-	-	0,32	-	-	-	0,26	-	-	-	0,21	-	-	1,07	0,11	
39	M.peregrinum	Cp	-	29,74	-	32,27	-	-	-	32,44	-	-	-	32,59	-	-	-	30,91	-	-	30,14	33,28	M.peregrinum
		CO	-	0,17	-	0,09	-	-	-	0,09	-	-	-	0,11	-	-	-	0,10	-	-	0,18	0,08	
		CV(%)	-	0,56	-	0,29	-	-	-	0,28	-	-	-	0,33	-	-	-	0,33	-	-	0,61	0,25	
40	микобактерии отсутствуют	Cp	-	-	-	30,79	-	-	-	30,74	-	-	-	30,78	-	-	-	30,39	-	-	-	30,73	микобактерии отсутствуют
		CO	-	-	-	0,07	-	-	-	0,04	-	-	-	0,11	-	-	-	0,15	-	-	-	0,15	
		CV(%)	-	-	-	0,23	-	-	-	0,12	-	-	-	0,35	-	-	-	0,48	-	-	-	0,52	
41	микобактерии отсутствуют	Cp	-	-	-	31,52	-	-	-	31,39	-	-	-	30,81	-	-	-	31,33	-	-	-	30,67	микобактерии отсутствуют
		CO	-	-	-	0,12	-	-	-	0,10	-	-	-	0,14	-	-	-	0,05	-	-	-	0,11	
		CV(%)	-	-	-	0,38	-	-	-	0,32	-	-	-	0,45	-	-	-	0,17	-	-	-	0,37	
42	микобактерии отсутствуют	Cp	-	-	-	30,90	-	-	-	31,24	-	-	-	30,86	-	-	-	30,34	-	-	-	30,70	микобактерии отсутствуют
		CO	-	-	-	0,04	-	-	-	0,07	-	-	-	0,07	-	-	-	0,11	-	-	-	0,11	
		CV(%)	-	-	-	0,14	-	-	-	0,22	-	-	-	0,24	-	-	-	0,37	-	-	-	0,38	

Продолжение приложения №5

№	Образец, содержащий	Показатель	Пороговое значение																		Интерпретация		
			1 пробирка				2 пробирка				3 пробирка				4 пробирка				5 пробирка				
			FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX		HEX	Cy5
Результаты, полученные на амплификаторе ДТ*																							
1	M.tuberculosis	Cp	29,89	-	33,28	27,62	-	-	-	29,17	-	-	-	27,64	-	-	-	27,55	-	-	-	29,76	M.tuberculosis
		CO	0,16	-	0,12	0,07	-	-	-	0,11	-	-	-	0,17	-	-	-	0,07	-	-	-	0,10	
		CV(%)	0,54	-	0,36	0,24	-	-	-	0,37	-	-	-	0,62	-	-	-	0,27	-	-	-	0,32	
2	M.tuberculosis	Cp	26,53	-	30,12	28,11	-	-	-	28,61	-	-	-	28,16	-	-	-	28,29	-	-	-	29,92	M.tuberculosis
		CO	0,17	-	0,13	0,11	-	-	-	0,17	-	-	-	0,11	-	-	-	0,11	-	-	-	0,05	
		CV(%)	0,63	-	0,42	0,38	-	-	-	0,61	-	-	-	0,39	-	-	-	0,38	-	-	-	0,18	
3	M.tuberculosis	Cp	28,16	-	31,66	28,13	-	-	-	28,38	-	-	-	28,17	-	-	-	28,74	-	-	-	28,90	M.tuberculosi
		CO	0,15	-	0,17	0,08	-	-	-	0,11	-	-	-	0,09	-	-	-	0,17	-	-	-	0,09	
		CV(%)	0,54	-	0,52	0,28	-	-	-	0,40	-	-	-	0,34	-	-	-	0,59	-	-	-	0,32	
4	M.intracellulare	Cp	-	27,43	-	30,00	28,21	-	-	30,72	-	-	-	28,98	-	-	-	29,92	-	-	-	29,91	M.intracellulare
		CO	-	0,11	-	0,16	0,20	-	-	0,12	-	-	-	0,03	-	-	-	0,09	-	-	-	0,09	
		CV(%)	-	0,40	-	0,53	0,70	-	-	0,39	-	-	-	0,12	-	-	-	0,29	-	-	-	0,29	
5	M.intracellulare	Cp	-	27,33	-	30,96	27,90	-	-	31,86	-	-	-	30,56	-	-	-	29,58	-	-	-	29,66	M.intracellulare
		CO	-	0,08	-	0,06	0,11	-	-	0,06	-	-	-	0,11	-	-	-	0,09	-	-	-	0,09	
		CV(%)	-	0,29	-	0,19	0,40	-	-	0,19	-	-	-	0,35	-	-	-	0,31	-	-	-	0,31	
6	M.intracellulare	Cp	-	28,18	-	29,23	28,91	-	-	29,84	-	-	-	28,64	-	-	-	28,54	-	-	-	30,83	M.intracellulare
		CO	-	0,13	-	0,12	0,10	-	-	0,08	-	-	-	0,09	-	-	-	0,09	-	-	-	0,09	
		CV(%)	-	0,47	-	0,41	0,34	-	-	0,25	-	-	-	0,33	-	-	-	0,32	-	-	-	0,30	
7	M.xenopi	Cp	-	28,06	-	31,59	-	28,80	-	32,36	-	-	-	31,26	-	-	-	31,09	-	-	-	31,26	M.xenopi
		CO	-	0,09	-	0,07	-	0,16	-	0,11	-	-	-	0,06	-	-	-	0,11	-	-	-	0,08	
		CV(%)	-	0,31	-	0,21	-	0,57	-	0,34	-	-	-	0,19	-	-	-	0,35	-	-	-	0,24	
8	M.xenopi	Cp	-	26,88	-	30,27	-	27,66	-	30,76	-	-	-	29,45	-	-	-	29,72	-	-	-	31,02	M.xenopi
		CO	-	0,13	-	0,10	-	0,15	-	0,03	-	-	-	0,05	-	-	-	0,06	-	-	-	0,06	
		CV(%)	-	0,47	-	0,33	-	0,55	-	0,10	-	-	-	0,18	-	-	-	0,19	-	-	-	0,21	
9	M.xenopi	Cp	-	27,29	-	30,54	-	28,13	-	31,56	-	-	-	29,56	-	-	-	29,11	-	-	-	28,90	M.xenopi
		CO	-	0,18	-	0,01	-	0,15	-	0,19	-	-	-	0,19	-	-	-	0,03	-	-	-	0,09	
		CV(%)	-	0,67	-	0,02	-	0,55	-	0,60	-	-	-	0,65	-	-	-	0,10	-	-	-	0,32	
10	M.avium	Cp	-	27,20	-	30,46	-	-	27,63	29,96	-	-	-	30,08	-	-	-	30,04	-	-	-	30,38	M.avium
		CO	-	0,11	-	0,10	-	-	0,10	0,10	-	-	-	0,11	-	-	-	0,11	-	-	-	0,09	
		CV(%)	-	0,41	-	0,34	-	-	0,38	0,33	-	-	-	0,36	-	-	-	0,36	-	-	-	0,29	
11	M.avium	Cp	-	28,46	-	29,89	-	-	29,24	30,68	-	-	-	29,78	-	-	-	30,40	-	-	-	30,57	M.avium
		CO	-	0,11	-	0,04	-	-	0,17	0,10	-	-	-	0,04	-	-	-	0,08	-	-	-	0,14	
		CV(%)	-	0,37	-	0,15	-	-	0,60	0,32	-	-	-	0,13	-	-	-	0,26	-	-	-	0,45	

Продолжение приложения №5

№	Образец, содержащий	Показатель	Пороговое значение																		Интерпретация		
			1 пробирка				2 пробирка				3 пробирка				4 пробирка				5 пробирка				
			FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX		HEX	Cy5
Результаты, полученные на амплификаторе ДТ*																							
12	M.avium	Cp	-	27,72	-	29,38	-	-	28,59	29,70	-	-	-	28,69	-	-	-	28,35	-	-	-	29,49	M.avium
		CO	-	0,15	-	0,19	-	-	0,13	0,09	-	-	-	0,09	-	-	-	0,11	-	-	-	0,10	
		CV(%)	-	0,55	-	0,64	-	-	0,47	0,29	-	-	-	0,32	-	-	-	0,40	-	-	-	0,35	
13	M.kansasii	Cp	-	27,51	-	30,46	-	-	-	30,78	28,14	-	-	29,89	-	-	-	28,85	-	-	-	30,08	M.kansasii
		CO	-	0,14	-	0,07	-	-	-	0,08	0,14	-	-	0,14	-	-	-	0,09	-	-	-	0,16	
		CV(%)	-	0,49	-	0,25	-	-	-	0,27	0,51	-	-	0,46	-	-	-	0,31	-	-	-	0,54	
14	M.kansasii	Cp	-	26,84	-	31,28	-	-	-	31,30	27,67	-	-	29,98	-	-	-	30,08	-	-	-	29,98	M.kansasii
		CO	-	0,08	-	0,09	-	-	-	0,08	0,10	-	-	0,06	-	-	-	0,10	-	-	-	0,10	
		CV(%)	-	0,30	-	0,29	-	-	-	0,27	0,38	-	-	0,19	-	-	-	0,34	-	-	-	0,34	
15	M.kansasii	Cp	-	26,64	-	29,88	-	-	-	30,29	27,28	-	-	30,17	-	-	-	30,25	-	-	-	29,34	M.kansasii
		CO	-	0,20	-	0,08	-	-	-	0,20	0,18	-	-	0,08	-	-	-	0,17	-	-	-	0,07	
		CV(%)	-	0,75	-	0,26	-	-	-	0,65	0,65	-	-	0,26	-	-	-	0,56	-	-	-	0,24	
16	M.gordonae	Cp	-	27,10	-	30,20	-	-	-	31,39	-	27,62	-	31,13	-	-	-	30,57	-	-	-	31,26	M.gordonae
		CO	-	0,08	-	0,13	-	-	-	0,12	-	0,09	-	0,05	-	-	-	0,11	-	-	-	0,08	
		CV(%)	-	0,31	-	0,44	-	-	-	0,37	-	0,31	-	0,17	-	-	-	0,35	-	-	-	0,24	
17	M.gordonae	Cp	-	28,03	-	30,74	-	-	-	32,00	-	28,77	-	30,99	-	-	-	30,65	-	-	-	31,02	M.gordonae
		CO	-	0,12	-	0,06	-	-	-	0,10	-	0,13	-	0,07	-	-	-	0,08	-	-	-	0,06	
		CV(%)	-	0,44	-	0,18	-	-	-	0,31	-	0,44	-	0,22	-	-	-	0,25	-	-	-	0,21	
18	M.gordonae	Cp	-	28,65	-	31,04	-	-	-	30,85	-	29,33	-	31,09	-	-	-	30,30	-	-	-	29,59	M.gordonae
		CO	-	0,10	-	0,10	-	-	-	0,08	-	0,09	-	0,04	-	-	-	0,15	-	-	-	0,06	
		CV(%)	-	0,35	-	0,31	-	-	-	0,25	-	0,29	-	0,13	-	-	-	0,49	-	-	-	0,19	
19	M.lentiflavum	Cp	-	28,38	-	31,48	-	-	-	32,50	-	-	29,11	31,28	-	-	-	30,36	-	-	-	30,57	M.lentiflavum
		CO	-	0,08	-	0,11	-	-	-	0,06	-	-	0,10	0,12	-	-	-	0,06	-	-	-	0,09	
		CV(%)	-	0,27	-	0,34	-	-	-	0,17	-	-	0,33	0,39	-	-	-	0,21	-	-	-	0,29	
20	M.lentiflavum	Cp	-	27,55	-	28,32	-	-	-	29,30	-	-	28,29	28,87	-	-	-	27,27	-	-	-	30,51	M.lentiflavum
		CO	-	0,29	-	0,10	-	-	-	0,04	-	-	0,31	0,06	-	-	-	0,13	-	-	-	0,07	
		CV(%)	-	1,06	-	0,36	-	-	-	0,14	-	-	1,08	0,21	-	-	-	0,48	-	-	-	0,24	
21	M.lentiflavum	Cp	-	27,15	-	31,65	-	-	-	32,30	-	-	27,88	30,66	-	-	-	30,50	-	-	-	31,57	M.lentiflavum
		CO	-	0,17	-	0,03	-	-	-	0,18	-	-	0,12	0,05	-	-	-	0,08	-	-	-	0,16	
		CV(%)	-	0,62	-	0,08	-	-	-	0,54	-	-	0,44	0,18	-	-	-	0,25	-	-	-	0,50	
22	M.abscessus	Cp	-	27,64	-	29,38	-	-	-	30,97	-	-	-	30,02	28,21	-	-	30,12	-	-	-	31,74	M.abscessus
		CO	-	0,17	-	0,03	-	-	-	0,18	-	-	-	0,05	0,18	-	-	0,08	-	-	-	0,16	
		CV(%)	-	0,61	-	0,09	-	-	-	0,57	-	-	-	0,18	0,63	-	-	0,26	-	-	-	0,49	

Продолжение приложения №5

№	Образец, содержащий	Показатель	Пороговое значение																		Интерпретация		
			1 пробирка				2 пробирка				3 пробирка				4 пробирка				5 пробирка				
			FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX		HEX	Cy5
Результаты, полученные на амплификаторе ДТ*																							
23	M.abscessus	Cp	-	27,37	-	30,03	-	-	-	30,36	-	-	-	29,54	28,23	-	-	30,36	-	-	-	31,07	M.abscessus
		CO	-	0,11	-	0,09	-	-	-	0,16	-	-	-	0,13	0,12	-	-	0,10	-	-	-	0,12	
		CV(%)	-	0,41	-	0,30	-	-	-	0,51	-	-	-	0,43	0,42	-	-	0,33	-	-	-	0,38	
24	M.abscessus	Cp	-	26,69	-	28,25	-	-	-	29,33	-	-	-	28,93	27,42	-	-	28,50	-	-	-	30,88	M.abscessus
		CO	-	0,11	-	0,07	-	-	-	0,12	-	-	-	0,09	0,19	-	-	0,08	-	-	-	0,17	
		CV(%)	-	0,43	-	0,26	-	-	-	0,40	-	-	-	0,32	0,69	-	-	0,27	-	-	-	0,56	
25	M.chelonae	Cp	-	27,37	-	29,03	-	-	-	29,10	-	-	-	28,65	-	28,11	-	28,05	-	-	-	30,54	M.chelonae
		CO	-	0,10	-	0,14	-	-	-	0,12	-	-	-	0,15	-	0,25	-	0,08	-	-	-	0,13	
		CV(%)	-	0,37	-	0,49	-	-	-	0,40	-	-	-	0,52	-	0,90	-	0,30	-	-	-	0,41	
26	M.chelonae	Cp	-	26,87	-	29,85	-	-	-	29,72	-	-	-	29,18	-	27,74	-	29,47	-	-	-	30,74	M.chelonae
		CO	-	0,22	-	0,10	-	-	-	0,18	-	-	-	0,06	-	0,22	-	0,11	-	-	-	0,09	
		CV(%)	-	0,82	-	0,34	-	-	-	0,60	-	-	-	0,19	-	0,78	-	0,37	-	-	-	0,30	
27	M.chelonae	Cp	-	28,33	-	29,53	-	-	-	29,87	-	-	-	28,83	-	28,90	-	28,48	-	-	-	30,74	M.chelonae
		CO	-	0,09	-	0,04	-	-	-	0,06	-	-	-	0,20	-	0,19	-	0,07	-	-	-	0,13	
		CV(%)	-	0,32	-	0,13	-	-	-	0,19	-	-	-	0,69	-	0,64	-	0,25	-	-	-	0,44	
28	M.mucogenicum	Cp	-	28,69	-	30,69	-	-	-	31,01	-	-	-	31,42	-	-	28,85	31,05	-	-	-	29,59	M.mucogenicum
		CO	-	0,23	-	0,06	-	-	-	0,06	-	-	-	0,10	-	-	0,24	0,08	-	-	-	0,15	
		CV(%)	-	0,81	-	0,20	-	-	-	0,20	-	-	-	0,33	-	-	0,73	0,25	-	-	-	0,53	
29	M.mucogenicum	Cp	-	28,89	-	29,85	-	-	-	30,82	-	-	-	30,35	-	-	28,13	30,88	-	-	-	29,64	M.mucogenicum
		CO	-	0,18	-	0,11	-	-	-	0,07	-	-	-	0,10	-	-	0,11	0,12	-	-	-	0,09	
		CV(%)	-	0,61	-	0,36	-	-	-	0,22	-	-	-	0,31	-	-	0,35	0,39	-	-	-	0,30	
30	M.mucogenicum	Cp	-	28,22	-	28,53	-	-	-	28,76	-	-	-	29,42	-	-	28,34	29,08	-	-	-	29,37	M.mucogenicum
		CO	-	0,15	-	0,13	-	-	-	0,08	-	-	-	0,08	-	-	0,17	0,09	-	-	-	0,09	
		CV(%)	-	0,52	-	0,44	-	-	-	0,29	-	-	-	0,28	-	-	0,63	0,30	-	-	-	0,31	
31	M.fortuitum	Cp	-	28,11	-	30,47	-	-	-	31,12	-	-	-	30,90	-	-	-	29,43	28,76	-	-	30,63	M.fortuitum
		CO	-	0,26	-	0,12	-	-	-	0,08	-	-	-	0,02	-	-	-	0,14	0,24	-	-	0,10	
		CV(%)	-	0,94	-	0,41	-	-	-	0,26	-	-	-	0,07	-	-	-	0,48	0,83	-	-	0,32	
32	M.fortuitum	Cp	-	26,38	-	29,81	-	-	-	29,83	-	-	-	29,04	-	-	-	29,15	27,04	-	-	29,88	M.fortuitum
		CO	-	0,06	-	0,11	-	-	-	0,11	-	-	-	0,11	-	-	-	0,17	0,10	-	-	0,08	
		CV(%)	-	0,24	-	0,37	-	-	-	0,36	-	-	-	0,36	-	-	-	0,60	0,37	-	-	0,26	
33	M.fortuitum	Cp	-	27,43	-	30,94	-	-	-	31,07	-	-	-	29,43	-	-	-	29,15	28,20	-	-	30,97	M.fortuitum
		CO	-	0,10	-	0,09	-	-	-	0,17	-	-	-	0,08	-	-	-	0,11	0,16	-	-	0,13	
		CV(%)	-	0,38	-	0,31	-	-	-	0,54	-	-	-	0,26	-	-	-	0,39	0,55	-	-	0,42	

Продолжение приложения №5

№	Образец, содержащий	Показатель	Пороговое значение																		Интерпретация		
			1 пробирка				2 пробирка				3 пробирка				4 пробирка				5 пробирка				
			FAM	ROX	HEX	CY5	FAM	ROX	HEX	CY5	FAM	ROX	HEX	CY5	FAM	ROX	HEX	CY5	FAM	ROX		HEX	CY5
Результаты, полученные на амплификаторе ДТ*																							
34	M.smegmatis	Cp	-	27,36	-	30,08	-	-	-	30,98	-	-	-	29,61	-	-	-	30,63	-	27,52	-	28,90	M.smegmatis
		CO	-	0,08	-	0,12	-	-	-	0,06	-	-	-	0,10	-	-	-	0,15	-	0,08	-	0,03	
		CV(%)	-	0,28	-	0,41	-	-	-	0,21	-	-	-	0,35	-	-	-	0,49	-	0,21	-	0,12	
35	M.smegmatis	Cp	-	28,71	-	29,87	-	-	-	30,48	-	-	-	29,59	-	-	-	29,43	-	28,77	-	29,75	M.smegmatis
		CO	-	0,07	-	0,02	-	-	-	0,07	-	-	-	0,11	-	-	-	0,10	-	0,12	-	0,11	
		CV(%)	-	0,24	-	0,07	-	-	-	0,22	-	-	-	0,36	-	-	-	0,35	-	0,44	-	0,36	
36	M.smegmatis	Cp	-	27,04	-	29,33	-	-	-	29,46	-	-	-	28,26	-	-	-	28,78	-	28,33	-	30,08	M.smegmatis
		CO	-	0,25	-	0,12	-	-	-	0,08	-	-	-	0,09	-	-	-	0,04	-	0,09	-	0,09	
		CV(%)	-	0,91	-	0,42	-	-	-	0,27	-	-	-	0,33	-	-	-	0,14	-	0,28	-	0,31	
37	M.peregrinum	Cp	-	26,90	-	32,09	-	-	-	32,30	-	-	-	31,56	-	-	-	31,21	-	-	27,53	27,80	M.peregrinum
		CO	-	0,10	-	0,06	-	-	-	0,11	-	-	-	0,07	-	-	-	0,11	-	-	0,21	0,12	
		CV(%)	-	0,36	-	0,19	-	-	-	0,33	-	-	-	0,21	-	-	-	0,36	-	-	0,75	0,43	
38	M.peregrinum	Cp	-	26,63	-	28,26	-	-	-	29,16	-	-	-	28,52	-	-	-	28,86	-	-	27,69	29,52	M.peregrinum
		CO	-	0,16	-	0,05	-	-	-	0,06	-	-	-	0,10	-	-	-	0,03	-	-	0,14	0,06	
		CV(%)	-	0,61	-	0,19	-	-	-	0,19	-	-	-	0,35	-	-	-	0,10	-	-	0,46	0,20	
39	M.peregrinum	Cp	-	27,41	-	29,76	-	-	-	29,99	-	-	-	30,63	-	-	-	28,62	-	-	28,48	29,85	M.peregrinum
		CO	-	0,21	-	0,07	-	-	-	0,09	-	-	-	0,09	-	-	-	0,14	-	-	0,26	0,08	
		CV(%)	-	0,75	-	0,23	-	-	-	0,31	-	-	-	0,29	-	-	-	0,49	-	-	0,92	0,25	
40	микобактерии отсутствуют	Cp	-	-	-	27,70	-	-	-	28,96	-	-	-	28,12	-	-	-	29,16	-	-	-	29,19	микобактерии отсутствуют
		CO	-	-	-	0,09	-	-	-	0,12	-	-	-	0,16	-	-	-	0,17	-	-	-	0,10	
		CV(%)	-	-	-	0,33	-	-	-	0,40	-	-	-	0,57	-	-	-	0,57	-	-	-	0,35	
41	микобактерии отсутствуют	Cp	-	-	-	28,79	-	-	-	29,63	-	-	-	29,45	-	-	-	28,96	-	-	-	30,86	микобактерии отсутствуют
		CO	-	-	-	0,13	-	-	-	0,10	-	-	-	0,06	-	-	-	0,11	-	-	-	0,04	
		CV(%)	-	-	-	0,44	-	-	-	0,33	-	-	-	0,21	-	-	-	0,38	-	-	-	0,13	
42	микобактерии отсутствуют	Cp	-	-	-	29,58	-	-	-	30,35	-	-	-	28,94	-	-	-	28,26	-	-	-	30,00	микобактерии отсутствуют
		CO	-	-	-	0,02	-	-	-	0,09	-	-	-	0,11	-	-	-	0,09	-	-	-	0,11	
		CV(%)	-	-	-	0,06	-	-	-	0,30	-	-	-	0,40	-	-	-	0,31	-	-	-	0,38	

Продолжение приложения №5

№	Образец, содержащий	Показатель	Пороговое значение																				Интерпретация
			1 пробирка				2 пробирка				3 пробирка				4 пробирка				5 пробирка				
			FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	
Результаты, полученные на амплификаторе АНК*																							
1	M.tuberculosis	Cp	32,01	-	35,56	30,46	-	-	-	30,30	-	-	-	30,65	-	-	-	30,23	-	-	-	30,30	M.tuberculosis
		CO	0,12	-	0,09	0,03	-	-	-	0,11	-	-	-	0,10	-	-	-	0,06	-	-	-	0,09	
		CV(%)	0,38	-	0,25	0,10	-	-	-	0,38	-	-	-	0,33	-	-	-	0,21	-	-	-	0,28	
2	M.tuberculosis	Cp	28,77	-	32,18	30,43	-	-	-	30,81	-	-	-	30,46	-	-	-	30,65	-	-	-	33,04	M.tuberculosis
		CO	0,13	-	0,12	0,10	-	-	-	0,06	-	-	-	0,05	-	-	-	0,13	-	-	-	0,17	
		CV(%)	0,44	-	0,39	0,32	-	-	-	0,18	-	-	-	0,17	-	-	-	0,44	-	-	-	0,52	
3	M.tuberculosis	Cp	29,99	-	34,19	30,79	-	-	-	30,49	-	-	-	30,14	-	-	-	30,69	-	-	-	31,71	M.tuberculosis
		CO	0,17	-	0,10	0,13	-	-	-	0,10	-	-	-	0,07	-	-	-	0,10	-	-	-	0,09	
		CV(%)	0,55	-	0,29	0,41	-	-	-	0,32	-	-	-	0,23	-	-	-	0,32	-	-	-	0,28	
4	M.intracellulare	Cp	-	29,32	-	33,05	29,99	-	-	32,44	-	-	-	31,66	-	-	-	32,38	-	-	-	32,76	M.intracellulare
		CO	-	0,17	-	0,11	0,15	-	-	0,11	-	-	-	0,10	-	-	-	0,09	-	-	-	0,10	
		CV(%)	-	0,57	-	0,35	0,51	-	-	0,33	-	-	-	0,33	-	-	-	0,29	-	-	-	0,31	
5	M.intracellulare	Cp	-	29,08	-	33,62	29,76	-	-	33,59	-	-	-	32,81	-	-	-	32,49	-	-	-	33,36	M.intracellulare
		CO	-	0,09	-	0,06	0,09	-	-	0,10	-	-	-	0,15	-	-	-	0,06	-	-	-	0,10	
		CV(%)	-	0,32	-	0,19	0,32	-	-	0,30	-	-	-	0,46	-	-	-	0,19	-	-	-	0,28	
6	M.intracellulare	Cp	-	30,51	-	31,51	31,16	-	-	32,46	-	-	-	31,01	-	-	-	31,08	-	-	-	32,53	M.intracellulare
		CO	-	0,10	-	0,10	0,13	-	-	0,03	-	-	-	0,07	-	-	-	0,06	-	-	-	0,08	
		CV(%)	-	0,34	-	0,32	0,41	-	-	0,08	-	-	-	0,22	-	-	-	0,20	-	-	-	0,26	
7	M.xenopi	Cp	-	30,81	-	33,77	-	31,40	-	34,56	-	-	-	33,26	-	-	-	33,06	-	-	-	31,72	M.xenopi
		CO	-	0,09	-	0,10	-	0,17	-	0,09	-	-	-	0,05	-	-	-	0,06	-	-	-	0,10	
		CV(%)	-	0,30	-	0,29	-	0,54	-	0,26	-	-	-	0,15	-	-	-	0,19	-	-	-	0,32	
8	M.xenopi	Cp	-	29,26	-	32,38	-	29,85	-	32,84	-	-	-	31,93	-	-	-	31,62	-	-	-	33,04	M.xenopi
		CO	-	0,14	-	0,10	-	0,14	-	0,07	-	-	-	0,10	-	-	-	0,02	-	-	-	0,17	
		CV(%)	-	0,49	-	0,30	-	0,47	-	0,23	-	-	-	0,33	-	-	-	0,05	-	-	-	0,52	
9	M.xenopi	Cp	-	29,73	-	33,19	-	30,41	-	33,36	-	-	-	31,79	-	-	-	31,91	-	-	-	31,71	M.xenopi
		CO	-	0,10	-	0,07	-	0,15	-	0,09	-	-	-	0,13	-	-	-	0,04	-	-	-	0,09	
		CV(%)	-	0,32	-	0,22	-	0,49	-	0,27	-	-	-	0,41	-	-	-	0,12	-	-	-	0,28	
10	M.avium	Cp	-	29,22	-	32,41	-	-	30,02	32,65	-	-	-	32,04	-	-	-	33,01	-	-	-	32,76	M.avium
		CO	-	0,15	-	0,04	-	-	0,10	0,10	-	-	-	0,05	-	-	-	0,09	-	-	-	0,10	
		CV(%)	-	0,53	-	0,13	-	-	0,34	0,31	-	-	-	0,15	-	-	-	0,28	-	-	-	0,31	
11	M.avium	Cp	-	30,56	-	33,19	-	-	31,29	32,83	-	-	-	32,13	-	-	-	32,15	-	-	-	33,36	M.avium
		CO	-	0,37	-	0,10	-	-	0,42	0,11	-	-	-	0,09	-	-	-	0,09	-	-	-	0,10	
		CV(%)	-	1,22	-	0,31	-	-	1,35	0,32	-	-	-	0,29	-	-	-	0,27	-	-	-	0,28	

Продолжение приложения №5

№	Образец, содержащий	Показатель	Пороговое значение																				Интерпрета-ция
			1 пробирка				2 пробирка				3 пробирка				4 пробирка				5 пробирка				
			FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	
Результаты, полученные на амплификаторе АНК*																							
12	M.avium	Cp	-	30,37	-	31,46	-	-	30,92	32,18	-	-	-	30,92	-	-	-	30,87	-	-	-	31,72	M.avium
		CO	-	0,27	-	0,06	-	-	0,30	0,09	-	-	-	0,10	-	-	-	0,04	-	-	-	0,10	
		CV(%)	-	0,88	-	0,18	-	-	0,96	0,29	-	-	-	0,32	-	-	-	0,12	-	-	-	0,32	
13	M.kansasii	Cp	-	29,78	-	32,61	-	-	-	32,99	30,31	-	-	31,99	-	-	-	31,49	-	-	-	32,30	M.kansasii
		CO	-	0,15	-	0,10	-	-	-	0,04	0,15	-	-	0,11	-	-	-	0,04	-	-	-	0,09	
		CV(%)	-	0,50	-	0,30	-	-	-	0,12	0,49	-	-	0,35	-	-	-	0,12	-	-	-	0,28	
14	M.kansasii	Cp	-	29,48	-	33,17	-	-	-	33,82	30,07	-	-	32,41	-	-	-	32,46	-	-	-	33,04	M.kansasii
		CO	-	0,15	-	0,14	-	-	-	0,12	0,11	-	-	0,09	-	-	-	0,05	-	-	-	0,17	
		CV(%)	-	0,52	-	0,42	-	-	-	0,35	0,38	-	-	0,28	-	-	-	0,16	-	-	-	0,52	
15	M.kansasii	Cp	-	28,42	-	32,48	-	-	-	32,76	29,08	-	-	32,24	-	-	-	31,81	-	-	-	31,71	M.kansasii
		CO	-	0,07	-	0,10	-	-	-	0,07	0,08	-	-	0,06	-	-	-	0,05	-	-	-	0,09	
		CV(%)	-	0,24	-	0,30	-	-	-	0,20	0,27	-	-	0,20	-	-	-	0,17	-	-	-	0,28	
16	M.gordonae	Cp	-	29,69	-	32,71	-	-	-	33,60	-	30,39	-	33,22	-	-	-	32,70	-	-	-	33,01	M.gordonae
		CO	-	0,15	-	0,15	-	-	-	0,10	-	0,15	-	0,07	-	-	-	0,08	-	-	-	0,18	
		CV(%)	-	0,50	-	0,47	-	-	-	0,30	-	0,49	-	0,23	-	-	-	0,25	-	-	-	0,54	
17	M.gordonae	Cp	-	29,52	-	33,37	-	-	-	34,27	-	30,22	-	33,01	-	-	-	33,10	-	-	-	33,36	M.gordonae
		CO	-	0,22	-	0,08	-	-	-	0,01	-	0,21	-	0,09	-	-	-	0,08	-	-	-	0,15	
		CV(%)	-	0,75	-	0,23	-	-	-	0,02	-	0,68	-	0,28	-	-	-	0,24	-	-	-	0,45	
18	M.gordonae	Cp	-	31,41	-	33,02	-	-	-	33,61	-	32,04	-	33,72	-	-	-	32,02	-	-	-	33,76	M.gordonae
		CO	-	0,11	-	0,07	-	-	-	0,10	-	0,24	-	0,09	-	-	-	0,07	-	-	-	0,19	
		CV(%)	-	0,36	-	0,22	-	-	-	0,31	-	0,75	-	0,27	-	-	-	0,23	-	-	-	0,56	
19	M.lentiflavum	Cp	-	31,36	-	34,50	-	-	-	34,10	-	-	32,07	32,83	-	-	-	32,67	-	-	-	32,51	M.lentiflavum
		CO	-	0,37	-	0,19	-	-	-	0,14	-	-	0,33	0,05	-	-	-	0,06	-	-	-	0,11	
		CV(%)	-	1,18	-	0,55	-	-	-	0,41	-	-	1,03	0,15	-	-	-	0,17	-	-	-	0,34	
20	M.lentiflavum	Cp	-	29,68	-	31,05	-	-	-	31,65	-	-	30,33	30,22	-	-	-	30,46	-	-	-	30,36	M.lentiflavum
		CO	-	0,27	-	0,13	-	-	-	0,20	-	-	0,28	0,06	-	-	-	0,04	-	-	-	0,10	
		CV(%)	-	0,90	-	0,41	-	-	-	0,63	-	-	0,91	0,18	-	-	-	0,14	-	-	-	0,36	
21	M.lentiflavum	Cp	-	30,37	-	33,67	-	-	-	33,84	-	-	30,87	33,88	-	-	-	32,80	-	-	-	32,58	M.lentiflavum
		CO	-	0,14	-	0,15	-	-	-	0,12	-	-	0,11	0,06	-	-	-	0,18	-	-	-	0,03	
		CV(%)	-	0,45	-	0,45	-	-	-	0,35	-	-	0,37	0,19	-	-	-	0,54	-	-	-	0,08	
22	M.abscessus	Cp	-	30,07	-	31,85	-	-	-	32,90	-	-	-	32,35	30,68	-	-	31,65	-	-	-	33,36	M.abscessus
		CO	-	0,15	-	0,12	-	-	-	0,16	-	-	-	0,08	0,21	-	-	0,13	-	-	-	0,10	
		CV(%)	-	0,49	-	0,37	-	-	-	0,49	-	-	-	0,25	0,68	-	-	0,41	-	-	-	0,30	

Продолжение приложения №5

№	Образец, содержащий	Показатель	Пороговое значение																		Интерпретация		
			1 пробирка				2 пробирка				3 пробирка				4 пробирка				5 пробирка				
			FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX		HEX	Cy5
Результаты, полученные на амплификаторе АНК*																							
23	M.abscessus	Cp	-	28,89	-	32,28	-	-	-	31,91	-	-	-	32,36	29,84	-	-	32,57	-	-	-	33,36	M.abscessus
		CO	-	0,13	-	0,18	-	-	-	0,10	-	-	-	0,08	0,16	-	-	0,04	-	-	-	0,10	
		CV(%)	-	0,45	-	0,55	-	-	-	0,31	-	-	-	0,24	0,52	-	-	0,12	-	-	-	0,30	
24	M.abscessus	Cp	-	28,91	-	30,93	-	-	-	31,62	-	-	-	30,79	29,65	-	-	29,98	-	-	-	33,45	M.abscessus
		CO	-	0,17	-	0,15	-	-	-	0,07	-	-	-	0,10	0,28	-	-	0,11	-	-	-	0,07	
		CV(%)	-	0,57	-	0,49	-	-	-	0,22	-	-	-	0,34	0,93	-	-	0,36	-	-	-	0,21	
25	M.chelonae	Cp	-	29,12	-	31,02	-	-	-	31,00	-	-	-	30,70	-	29,67	-	30,62	-	-	-	34,12	M.chelonae
		CO	-	0,17	-	0,20	-	-	-	0,11	-	-	-	0,16	-	0,18	-	0,05	-	-	-	0,07	
		CV(%)	-	0,59	-	0,64	-	-	-	0,35	-	-	-	0,53	-	0,59	-	0,16	-	-	-	0,22	
26	M.chelonae	Cp	-	29,50	-	31,84	-	-	-	32,46	-	-	-	31,52	-	30,25	-	31,29	-	-	-	33,45	M.chelonae
		CO	-	0,18	-	0,05	-	-	-	0,16	-	-	-	0,05	-	0,18	-	0,09	-	-	-	0,07	
		CV(%)	-	0,62	-	0,17	-	-	-	0,48	-	-	-	0,16	-	0,60	-	0,29	-	-	-	0,21	
27	M.chelonae	Cp	-	30,27	-	32,25	-	-	-	31,92	-	-	-	30,51	-	30,88	-	30,83	-	-	-	34,12	M.chelonae
		CO	-	0,10	-	0,04	-	-	-	0,04	-	-	-	0,15	-	0,15	-	0,08	-	-	-	0,07	
		CV(%)	-	0,34	-	0,13	-	-	-	0,14	-	-	-	0,48	-	0,50	-	0,25	-	-	-	0,22	
28	M.mucogenicum	Cp	-	28,93	-	33,01	-	-	-	33,36	-	-	-	33,01	-	-	30,78	31,93	-	-	-	32,77	M.mucogenicum
		CO	-	0,13	-	0,18	-	-	-	0,10	-	-	-	0,08	-	-	0,10	0,16	-	-	-	0,04	
		CV(%)	-	0,45	-	0,54	-	-	-	0,30	-	-	-	0,24	-	-	0,33	0,51	-	-	-	0,12	
29	M.mucogenicum	Cp	-	29,69	-	33,36	-	-	-	33,45	-	-	-	32,76	-	-	29,52	31,31	-	-	-	32,90	M.mucogenicum
		CO	-	0,17	-	0,15	-	-	-	0,07	-	-	-	0,10	-	-	0,12	0,06	-	-	-	0,11	
		CV(%)	-	0,56	-	0,45	-	-	-	0,21	-	-	-	0,32	-	-	0,39	0,18	-	-	-	0,33	
30	M.mucogenicum	Cp	-	29,83	-	33,76	-	-	-	34,12	-	-	-	32,76	-	-	30,29	31,19	-	-	-	33,01	M.mucogenicum
		CO	-	0,12	-	0,19	-	-	-	0,07	-	-	-	0,17	-	-	0,43	0,10	-	-	-	0,16	
		CV(%)	-	0,39	-	0,56	-	-	-	0,22	-	-	-	0,52	-	-	1,42	0,31	-	-	-	0,47	
31	M.fortuitum	Cp	-	30,19	-	33,01	-	-	-	33,29	-	-	-	32,67	-	-	-	32,77	30,99	-	-	30,26	M.fortuitum
		CO	-	0,19	-	0,05	-	-	-	0,04	-	-	-	0,05	-	-	-	0,04	0,25	-	-	0,11	
		CV(%)	-	0,64	-	0,14	-	-	-	0,13	-	-	-	0,14	-	-	-	0,12	0,80	-	-	0,35	
32	M.fortuitum	Cp	-	28,78	-	31,67	-	-	-	32,12	-	-	-	31,64	-	-	-	32,90	31,00	-	-	31,85	M.fortuitum
		CO	-	0,11	-	0,05	-	-	-	0,13	-	-	-	0,10	-	-	-	0,11	0,28	-	-	0,10	
		CV(%)	-	0,39	-	0,16	-	-	-	0,42	-	-	-	0,31	-	-	-	0,33	0,90	-	-	0,32	
33	M.fortuitum	Cp	-	29,53	-	32,66	-	-	-	32,83	-	-	-	31,46	-	-	-	33,01	30,43	-	-	30,95	M.fortuitum
		CO	-	0,30	-	0,07	-	-	-	0,10	-	-	-	0,13	-	-	-	0,16	0,18	-	-	0,03	
		CV(%)	-	1,02	-	0,21	-	-	-	0,30	-	-	-	0,40	-	-	-	0,47	0,58	-	-	0,08	

Продолжение приложения №5

№	Образец, содержащий	Показатель	Пороговое значение																		Интерпретация		
			1 пробирка				2 пробирка				3 пробирка				4 пробирка				5 пробирка				
			FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX		HEX	Cy5
Результаты, полученные на амплификаторе АНК*																							
34	M.smegmatis	Ср	-	29,53	-	31,22	-	-	-	33,64	-	-	-	32,20	-	-	-	32,43	-	31,11	-	32,76	M.smegmatis
		CO	-	0,10	-	0,10	-	-	-	0,02	-	-	-	0,09	-	-	-	0,01	-	0,07	-	0,10	
		CV(%)	-	0,33	-	0,31	-	-	-	0,06	-	-	-	0,29	-	-	-	0,02	-	0,23	-	0,31	
35	M.smegmatis	Ср	-	30,66	-	32,59	-	-	-	32,76	-	-	-	31,92	-	-	-	31,83	-	29,85	-	33,36	M.smegmatis
		CO	-	0,18	-	0,04	-	-	-	0,06	-	-	-	0,07	-	-	-	0,04	-	0,13	-	0,10	
		CV(%)	-	0,59	-	0,11	-	-	-	0,19	-	-	-	0,22	-	-	-	0,11	-	0,42	-	0,28	
36	M.smegmatis	Ср	-	29,37	-	31,50	-	-	-	31,76	-	-	-	29,93	-	-	-	30,55	-	29,73	-	32,53	M.smegmatis
		CO	-	0,29	-	0,04	-	-	-	0,11	-	-	-	0,04	-	-	-	0,05	-	0,07	-	0,08	
		CV(%)	-	0,98	-	0,14	-	-	-	0,34	-	-	-	0,13	-	-	-	0,16	-	0,23	-	0,26	
37	M.peregrinum	Ср	-	29,86	-	30,12	-	-	-	30,49	-	-	-	30,99	-	-	-	30,05		30,99	30,26	M.peregrinum	
		CO	-	0,32	-	0,05	-	-	-	0,06	-	-	-	0,10	-	-	-	0,09		0,25	0,11		
		CV(%)	-	1,08	-	0,15	-	-	-	0,19	-	-	-	0,28	-	-	-	0,27		0,80	0,35		
38	M.peregrinum	Ср	-	29,40	-	30,09	-	-	-	31,07	-	-	-	31,50	-	-	-	30,91	-	-	31,00	31,85	M.peregrinum
		CO	-	0,20	-	0,10	-	-	-	0,02	-	-	-	0,10	-	-	-	0,07	-	-	0,28	0,10	
		CV(%)	-	0,68	-	0,35	-	-	-	0,05	-	-	-	0,31	-	-	-	0,24	-	-	0,90	0,32	
39	M.peregrinum	Ср	-	29,76	-	32,19	-	-	-	32,61	-	-	-	32,55	-	-	-	30,71	-	-	30,43	30,95	M.peregrinum
		CO	-	0,20	-	0,07	-	-	-	0,10	-	-	-	0,09	-	-	-	0,16	-	-	0,18	0,03	
		CV(%)	-	0,66	-	0,20	-	-	-	0,31	-	-	-	0,29	-	-	-	0,51	-	-	0,58	0,08	
40	микобактерии отсутствуют	Ср	-	-	-	29,92	-	-	-	30,66	-	-	-	30,46	-	-	-	30,24	-	-	-	30,02	микобактерии отсутствуют
		CO	-	-	-	0,13	-	-	-	0,04	-	-	-	0,12	-	-	-	0,07	-	-	-	0,09	
		CV(%)	-	-	-	0,44	-	-	-	0,13	-	-	-	0,38	-	-	-	0,24	-	-	-	0,32	
41	микобактерии отсутствуют	Ср	-	-	-	31,05	-	-	-	31,45	-	-	-	31,26	-	-	-	30,94	-	-	-	29,98	микобактерии отсутствуют
		CO	-	-	-	0,08	-	-	-	0,12	-	-	-	0,10	-	-	-	0,12	-	-	-	0,13	
		CV(%)	-	-	-	0,25	-	-	-	0,37	-	-	-	0,33	-	-	-	0,39	-	-	-	0,45	
42	микобактерии отсутствуют	Ср	-	-	-	30,47	-	-	-	31,58	-	-	-	31,35	-	-	-	31,02	-	-	-	29,94	микобактерии отсутствуют
		CO	-	-	-	0,12	-	-	-	0,06	-	-	-	0,14	-	-	-	0,04	-	-	-	0,10	
		CV(%)	-	-	-	0,41	-	-	-	0,18	-	-	-	0,44	-	-	-	0,14	-	-	-	0,33	

Примечание:

- CFX - термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот с модулем CFX96 (BioRad Laboratories, Inc, США);
- ДТ - амплификатор ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ», Россия);
- АНК - амплификатор АНК 32 М (ФГБУН ИАП РАН, Россия)
- Ср - среднее значение величины порогового цикла амплификации (пять повторностей)
- CO - стандартное отклонение
- CV(%) - коэффициент вариации значений пороговых циклов амплификации

Приложение №6

Межпостановочная воспроизводимость результатов выявления ДНК микобактерий, полученных двумя исследователями с помощью тест-системы ПЦР-РВ(д) для одновременного выявления ДНК МБТК и НТМБ на амплификаторах CFX*, ДТ*, АНК*

№	Образец, содержащий	CV(%)				№	Образец, содержащий	CV(%)				№	Образец, содержащий	CV(%)			
		FAM	ROX	HEX	Cy5			FAM	ROX	HEX	Cy5			FAM	ROX	HEX	Cy5
Результаты, полученные на амплификаторе CFX*						Результаты, полученные на амплификаторе ДТ*						Результаты, полученные на амплификаторе АНК*					
1	<i>M.tuberculosis</i>	0,84	0,85	0,97	-	1	<i>M.tuberculosis</i>	0,39	0,35	0,43	-	1	<i>M.tuberculosis</i>	0,72	0,73	0,84	-
2	<i>M.tuberculosis</i>	1,59	1,28	0,82	-	2	<i>M.tuberculosis</i>	0,39	0,17	0,33	-	2	<i>M.tuberculosis</i>	1,47	1,16	0,70	-
3	<i>M.tuberculosis</i>	0,84	0,87	0,45	-	3	<i>M.tuberculosis</i>	0,45	0,71	0,46	-	3	<i>M.tuberculosis</i>	0,71	0,75	0,33	-
4	<i>M.avium</i>	-	-	0,23	0,67	4	<i>M.avium</i>	-	-	0,32	0,73	4	<i>M.avium</i>	-	-	0,18	0,55
5	<i>M.avium</i>	-	-	0,26	0,65	5	<i>M.avium</i>	-	-	0,46	0,73	5	<i>M.avium</i>	-	-	0,19	0,53
6	<i>M.avium</i>	-	-	0,56	0,26	6	<i>M.avium</i>	-	-	0,29	0,68	6	<i>M.avium</i>	-	-	0,42	0,14
7	<i>M.kansasii</i>	-	-	0,18	0,66	7	<i>M.kansasii</i>	-	-	0,31	0,92	7	<i>M.kansasii</i>	-	-	0,26	0,54
8	<i>M.kansasii</i>	-	-	0,53	0,43	8	<i>M.kansasii</i>	-	-	0,48	1,07	8	<i>M.kansasii</i>	-	-	0,53	0,43
9	<i>M.kansasii</i>	-	-	0,29	0,56	9	<i>M.kansasii</i>	-	-	0,98	1,06	9	<i>M.kansasii</i>	-	-	0,29	0,56
10	<i>M.xenopi</i>	-	-	0,48	0,53	10	<i>M.xenopi</i>	-	-	0,30	0,54	10	<i>M.xenopi</i>	-	-	0,48	0,53
11	<i>M.xenopi</i>	-	-	0,42	0,53	11	<i>M.xenopi</i>	-	-	0,21	0,56	11	<i>M.xenopi</i>	-	-	0,42	0,53
12	<i>M.xenopi</i>	-	-	0,28	0,70	12	<i>M.xenopi</i>	-	-	0,45	0,56	12	<i>M.xenopi</i>	-	-	0,28	0,70
13	<i>M.malmoense</i>	-	-	0,31	0,54	13	<i>M.malmoense</i>	-	-	0,40	0,72	13	<i>M.malmoense</i>	-	-	0,43	0,66
14	<i>M.malmoense</i>	-	-	0,22	1,07	14	<i>M.malmoense</i>	-	-	1,10	1,05	14	<i>M.malmoense</i>	-	-	0,20	1,00
15	<i>M.malmoense</i>	-	-	0,55	0,84	15	<i>M.malmoense</i>	-	-	0,29	0,75	15	<i>M.malmoense</i>	-	-	0,43	0,72
16	микобактерии отсутствуют	-	-	0,43	-	16	микобактерии отсутствуют	-	-	1,02	-	16	микобактерии отсутствуют	-	-	0,31	-
17	микобактерии отсутствуют	-	-	0,41	-	17	микобактерии отсутствуют	-	-	1,25	-	17	микобактерии отсутствуют	-	-	0,32	-
18	микобактерии отсутствуют	-	-	0,43	-	18	микобактерии отсутствуют	-	-	0,15	-	18	микобактерии отсутствуют	-	-	0,31	-

Примечание:

- CFX - термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот с модулем CFX96 (BioRad Laboratories, Inc, США);
- ДТ - амплификатор ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ», Россия);
- АНК - амплификатор АНК 32 М (ФГБУН ИАП РАН, Россия);
- CV(%) - коэффициент вариации значений пороговых циклов амплификации

Приложение №7

Межпостановочная воспроизводимость результатов видового определения микобактерий, полученных двумя исследователями с помощью тест-системы ПЦР-РВ(и) на амплификаторах CFX*, ДТ*, АНК*

№	Образец, содержащий	CV(%)																			
		1 пробирка				2 пробирка				3 пробирка				4 пробирка				5 пробирка			
		FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5
Результаты, полученные на амплификаторе CFX*																					
1	<i>M.tuberculosis</i>	0,59	0,48	-	0,65	-	-	-	0,45	-	-	-	0,49	-	-	-	0,36	-	-	-	0,38
2	<i>M.tuberculosis</i>	0,84	0,89	-	0,49	-	-	-	1,26	-	-	-	0,53	-	-	-	0,41	-	-	-	0,99
3	<i>M.tuberculosis</i>	0,99	0,90	-	0,73	-	-	-	0,47	-	-	-	0,32	-	-	-	1,00	-	-	-	0,77
4	<i>M.intracellulare</i>	-	0,64	-	0,36	0,74	-	-	0,63	-	-	-	0,96	-	-	-	1,38	-	-	-	0,34
5	<i>M.intracellulare</i>	-	0,42	-	0,26	0,52	-	-	0,28	-	-	-	0,39	-	-	-	0,74	-	-	-	0,40
6	<i>M.intracellulare</i>	-	0,62	-	0,18	0,49	-	-	0,61	-	-	-	0,66	-	-	-	0,17	-	-	-	0,51
7	<i>M.xenopi</i>	-	0,54	-	0,30	-	0,53	-	0,66	-	-	-	0,63	-	-	-	0,61	-	-	-	1,06
8	<i>M.xenopi</i>	-	0,56	-	0,21	-	0,54	-	0,13	-	-	-	0,92	-	-	-	0,28	-	-	-	0,43
9	<i>M.xenopi</i>	-	0,56	-	0,45	-	0,59	-	0,78	-	-	-	0,77	-	-	-	0,48	-	-	-	0,57
10	<i>M.avium</i>	-	0,73	-	0,32	-	-	0,92	0,85	-	-	-	1,14	-	-	-	0,62	-	-	-	0,70
11	<i>M.avium</i>	-	0,73	-	0,46	-	-	0,72	0,27	-	-	-	0,40	-	-	-	0,74	-	-	-	0,81
12	<i>M.avium</i>	-	0,68	-	0,29	-	-	0,71	0,55	-	-	-	0,81	-	-	-	0,23	-	-	-	0,46
13	<i>M.kansasii</i>	-	0,97	-	0,83	-	-	-	1,04	1,32	-	-	0,49	-	-	-	0,51				1,13
14	<i>M.kansasii</i>	-	0,93	-	0,57	-	-	-	0,42	0,92	-	-	0,28	-	-	-	0,21				0,33
15	<i>M.kansasii</i>	-	0,61	-	0,77	-	-	-	0,81	0,86	-	-	0,82	-	-	-	0,26				0,34
16	<i>M.gordoniae</i>	-	1,10	-	0,35	-	-	-	1,06	-	1,02	-	0,80	-	-	-	0,65				1,18
17	<i>M.gordoniae</i>	-	0,44	-	0,83	-	-	-	0,87	-	0,50	-	0,29	-	-	-	0,37				1,15
18	<i>M.gordoniae</i>	-	0,88	-	0,48	-	-	-	0,33	-	0,97	-	0,43	-	-	-	0,68				0,42
19	<i>M.lentiflavum</i>	-	0,69	-	0,40	-	-	-	0,38	-	-	0,45	0,70	-	-	-	0,33	-	-	-	0,56
20	<i>M.lentiflavum</i>	-	0,62	-	0,27	-	-	-	0,41	-	-	0,72	0,80	-	-	-	1,10	-	-	-	0,21
21	<i>M.lentiflavum</i>	-	0,56	-	1,14	-	-	-	1,15	-	-	0,62	0,35	-	-	-	0,33	-	-	-	1,31
22	<i>M.abscessus</i>	-	0,70	-	1,52	-	-	-	0,51	-	-	-	0,29	0,66	-	-	0,27	-	-	-	0,33
23	<i>M.abscessus</i>	-	0,79	-	0,95	-	-	-	0,51	-	-	-	1,11	0,92	-	-	0,39	-	-	-	0,31
24	<i>M.abscessus</i>	-	0,53	-	0,34	-	-	-	0,50	-	-	-	0,63	0,38	-	-	1,03	-	-	-	0,76
25	<i>M.chelonae</i>	-	0,46	-	0,72	-	-	-	0,34	-	-	-	0,23	-	0,58	-	0,39	-	-	-	0,45
26	<i>M.chelonae</i>	-	1,00	-	1,03	-	-	-	0,29	-	-	-	0,32	-	1,02	-	0,59	-	-	-	0,93
27	<i>M.chelonae</i>	-	0,40	-	0,31	-	-	-	0,67	-	-	-	1,45	-	0,58	-	0,24	-	-	-	0,38
28	<i>M.mucogenicum</i>	-	0,61	-	0,69	-	-	-	0,31	-	-	-	0,27	-	-	0,96	1,26	-	-	-	0,34
29	<i>M.mucogenicum</i>	-	1,03	-	0,25	-	-	-	0,85	-	-	-	0,40	-	-	1,24	0,53	-	-	-	0,40
30	<i>M.mucogenicum</i>	-	1,03	-	0,57	-	-	-	0,38	-	-	-	0,74	-	-	0,66	0,47	-	-	-	0,51
31	<i>M.fortuitum</i>	-	0,69	-	0,48	-	-	-	1,04	-	-	-	0,27	-	-	-	0,34	0,62	-	-	0,98
32	<i>M.fortuitum</i>	-	1,23	-	1,02	-	-	-	0,42	-	-	-	0,33	-	-	-	0,40	1,16	-	-	1,39

Продолжение приложения №7

№	Образец, содержащий	CV(%)																			
		1 пробирка				2 пробирка				3 пробирка				4 пробирка				5 пробирка			
		FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5
Результаты, полученные на амплификаторе CFX*																					
33	<i>M.fortuitum</i>	-	0,63	-	0,73	-	-	-	0,29	-	-	-	0,65	-	-	-	0,51	0,64	-	-	0,18
34	<i>M.smegmatis</i>	-	0,94	-	0,28	-	-	-	1,06	-	-	-	0,35	-	-	-	0,84	-	1,14	-	1,19
35	<i>M.smegmatis</i>	-	1,19	-	0,21	-	-	-	0,32	-	-	-	0,60	-	-	-	0,24	-	1,00	-	1,29
36	<i>M.smegmatis</i>	-	0,72	-	0,50	-	-	-	0,50	-	-	-	0,26	-	-	-	0,57	-	0,88	-	1,03
37	<i>M.peregrinum</i>	-	0,33	-	0,79	-	-	-	1,11	-	-	-	0,53	-	-	-	0,42	-	-	0,96	1,26
38	<i>M.peregrinum</i>	-	0,68	-	0,21	-	-	-	0,35	-	-	-	0,67	-	-	-	0,38	-	-	1,24	0,53
39	<i>M.peregrinum</i>	-	0,59	-	0,30	-	-	-	0,41	-	-	-	0,28	-	-	-	0,62	-	-	0,66	0,47
40	микобактерии отсутствуют	-	-	-	1,02	-	-	-	0,38	-	-	-	0,76	-	-	-	0,68	-	-	-	1,10
41	микобактерии отсутствуют	-	-	-	1,25	-	-	-	0,31	-	-	-	0,41	-	-	-	0,88	-	-	-	0,23
42	микобактерии отсутствуют	-	-	-	0,15	-	-	-	0,33	-	-	-	0,30	-	-	-	1,02	-	-	-	0,49
Результаты, полученные на амплификаторе ДТ*																					
1	<i>M.tuberculosis</i>	1,72	-	0,73	0,46	-	-	-	0,74	-	-	-	0,48	-	-	-	0,23	-	-	-	1,21
2	<i>M.tuberculosis</i>	0,66	-	0,91	0,46	-	-	-	1,11	-	-	-	1,74	-	-	-	0,99	-	-	-	0,79
3	<i>M.tuberculosis</i>	0,59	-	0,83	0,74	-	-	-	0,36	-	-	-	0,34	-	-	-	0,58	-	-	-	0,62
4	<i>M.intracellulare</i>	-	1,07	-	0,81	1,32	-	-	0,44	-	-	-	1,09	-	-	-	0,65	-	-	-	0,56
5	<i>M.intracellulare</i>	-	0,44	-	0,85	0,63	-	-	0,76	-	-	-	0,30	-	-	-	0,72	-	-	-	0,54
6	<i>M.intracellulare</i>	-	1,23	-	0,61	1,08	-	-	0,24	-	-	-	0,41	-	-	-	0,87	-	-	-	0,77
7	<i>M.xenopi</i>	-	0,51	-	0,38	-	0,58	-	0,31	-	-	-	1,16	-	-	-	0,34	-	-	-	1,10
8	<i>M.xenopi</i>	-	1,14	-	0,77	-	1,10	-	0,30	-	-	-	0,40	-	-	-	0,39	-	-	-	0,61
9	<i>M.xenopi</i>	-	0,79	-	0,28	-	0,49	-	0,58	-	-	-	0,70	-	-	-	0,20	-	-	-	1,52
10	<i>M.avium</i>	-	0,56	-	0,36	-	-	0,59	0,34	-	-	-	1,24	-	-	-	0,34	-	-	-	0,45
11	<i>M.avium</i>	-	0,57	-	0,29	-	-	0,93	0,35	-	-	-	0,99	-	-	-	0,53	-	-	-	1,66
12	<i>M.avium</i>	-	1,74	-	0,65	-	-	1,96	0,31	-	-	-	0,24	-	-	-	0,32	-	-	-	0,39
13	<i>M.kansasii</i>	-	0,53	-	0,39	-	-	-	0,49	0,45	-	-	0,52	-	-	-	0,38	-	-	-	1,21
14	<i>M.kansasii</i>	-	0,69	-	0,56	-	-	-	0,47	0,99	-	-	0,71	-	-	-	0,79	-	-	-	0,79
15	<i>M.kansasii</i>	-	0,93	-	0,56	-	-	-	0,81	0,76	-	-	0,44	-	-	-	1,22	-	-	-	0,62
16	<i>M.gordonae</i>	-	1,79	-	0,43	-	-	-	0,97	-	1,38	-	0,52	-	-	-	0,97	-	-	-	0,44
17	<i>M.gordonae</i>	-	0,64	-	0,30	-	-	-	0,76	-	0,89	-	0,29	-	-	-	0,41	-	-	-	1,05
18	<i>M.gordonae</i>	-	0,98	-	0,94	-	-	-	0,80	-	1,18	-	0,20	-	-	-	0,95	-	-	-	0,39
19	<i>M.lentiflavum</i>	-	0,87	-	0,51	-	-	-	1,01	-	-	0,56	0,37	-	-	-	0,18	-	-	-	0,41
20	<i>M.lentiflavum</i>	-	1,11	-	0,95	-	-	-	0,34	-	-	0,89	0,46	-	-	-	0,63	-	-	-	0,63
21	<i>M.lentiflavum</i>	-	0,65	-	0,51	-	-	-	0,47	-	-	0,40	0,38	-	-	-	0,45	-	-	-	0,56
22	<i>M.abscessus</i>	-	0,55	-	1,67	-	-	-	0,45	-	-	-	0,33	0,56	-	-	0,34	-	-	-	0,48
23	<i>M.abscessus</i>	-	1,39	-	0,40	-	-	-	0,77	-	-	-	1,59	1,75	-	-	1,14	-	-	-	0,55
24	<i>M.abscessus</i>	-	1,28	-	0,33	-	-	-	0,38	-	-	-	0,87	1,17	-	-	0,42	-	-	-	0,57

Продолжение приложения №7

№	Образец, содержащий	CV(%)																			
		1 пробирка				2 пробирка				3 пробирка				4 пробирка				5 пробирка			
		FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5
Результаты, полученные на амплификаторе ДТ*																					
25	<i>M.chelonae</i>	-	0,36	-	0,63	-	-	-	0,69	-	-	-	0,95	-	0,80	-	0,32	-	-	-	0,32
26	<i>M.chelonae</i>	-	0,64	-	0,53	-	-	-	0,88	-	-	-	0,43	-	0,77	-	0,47	-	-	-	1,31
27	<i>M.chelonae</i>	-	1,25	-	0,14	-	-	-	1,02	-	-	-	1,53	-	1,02	-	0,43	-	-	-	0,84
28	<i>M.mucogenicum</i>	-	0,63	-	1,57	-	-	-	0,32	-	-	-	0,45	-	-	0,68	1,01	-	-	-	0,44
29	<i>M.mucogenicum</i>	-	0,44	-	0,64	-	-	-	0,71	-	-	-	1,66	-	-	0,48	0,59	-	-	-	1,05
30	<i>M.mucogenicum</i>	-	0,97	-	0,33	-	-	-	0,22	-	-	-	0,39	-	-	0,78	0,54	-	-	-	0,39
31	<i>M.fortuitum</i>	-	0,91	-	0,66	-	-	-	0,98	-	-	-	0,90	-	-	-	0,51	0,60	-	-	0,45
32	<i>M.fortuitum</i>	-	0,35	-	1,06	-	-	-	0,83	-	-	-	0,31	-	-	-	0,52	0,66	-	-	1,35
33	<i>M.fortuitum</i>	-	0,61	-	0,50	-	-	-	0,62	-	-	-	0,67	-	-	-	0,31	0,94	-	-	0,59
34	<i>M.smegmatis</i>	-	1,04	-	0,57	-	-	-	0,26	-	-	-	0,96	-	-	-	0,99	-	1,50	-	0,99
35	<i>M.smegmatis</i>	-	0,82	-	0,22	-	-	-	1,09	-	-	-	0,29	-	-	-	0,38	-	1,17	-	0,73
36	<i>M.smegmatis</i>	-	1,08	-	0,67	-	-	-	0,23	-	-	-	0,37	-	-	-	0,70	-	0,80	-	0,99
37	<i>M.peregrinum</i>	-	0,45	-	0,32	-	-	-	0,32	-	-	-	1,01	-	-	-	0,33	-	-	0,50	0,66
38	<i>M.peregrinum</i>	-	1,08	-	1,03	-	-	-	0,44	-	-	-	0,58	-	-	-	0,28	-	-	1,24	0,39
39	<i>M.peregrinum</i>	-	0,64	-	0,30	-	-	-	0,88	-	-	-	0,46	-	-	-	0,40	-	-	1,17	0,55
40	микобактерии отсутствуют	-	-	-	0,39	-	-	-	0,33	-	-	-	0,44	-	-	-	1,13	-	-	-	0,42
41	микобактерии отсутствуют	-	-	-	0,57	-	-	-	0,47	-	-	-	0,70	-	-	-	0,65	-	-	-	0,68
42	микобактерии отсутствуют	-	-	-	0,85	-	-	-	1,48	-	-	-	0,55	-	-	-	0,36	-	-	-	0,42
Результаты, полученные на амплификаторе АНК*																					
1	<i>M.tuberculosis</i>	1,28	-	0,46	0,30	-	-	-	0,52	-	-	-	0,41	-	-	-	0,34	-	-	-	0,44
2	<i>M.tuberculosis</i>	1,03	-	0,46	0,61	-	-	-	0,51	-	-	-	1,04	-	-	-	1,11	-	-	-	0,68
3	<i>M.tuberculosis</i>	0,87	-	0,48	1,28	-	-	-	0,30	-	-	-	1,19	-	-	-	0,75	-	-	-	0,74
4	<i>M.intracellulare</i>	-	1,64	-	0,43	1,62	-	-	0,56	-	-	-	1,07	-	-	-	0,45	-	-	-	0,80
5	<i>M.intracellulare</i>	-	1,42	-	0,43	1,42	-	-	0,23	-	-	-	0,34	-	-	-	0,41	-	-	-	0,44
6	<i>M.intracellulare</i>	-	0,42	-	0,88	0,43	-	-	0,39	-	-	-	0,29	-	-	-	0,27	-	-	-	0,57
7	<i>M.xenopi</i>	-	0,44	-	1,23	-	0,62	-	0,39	-	-	-	0,40	-	-	-	0,43	-	-	-	0,94
8	<i>M.xenopi</i>	-	0,53	-	0,32	-	0,52	-	0,50	-	-	-	0,25	-	-	-	0,30	-	-	-	1,06
9	<i>M.xenopi</i>	-	0,64	-	0,21	-	0,59	-	0,73	-	-	-	1,03	-	-	-	0,44	-	-	-	0,47
10	<i>M.avium</i>	-	0,93	-	0,31	-	-	0,72	0,59	-	-	-	0,64	-	-	-	0,52	-	-	-	0,29
11	<i>M.avium</i>	-	0,95	-	0,33	-	-	1,07	1,00	-	-	-	0,89	-	-	-	0,30	-	-	-	0,75
12	<i>M.avium</i>	-	0,78	-	0,21	-	-	0,81	0,54	-	-	-	0,67	-	-	-	1,15	-	-	-	0,55
13	<i>M.kansasii</i>	-	0,96	-	0,55	-	-	-	0,41	0,70	-	-	1,45	-	-	-	1,04	-	-	-	0,40
14	<i>M.kansasii</i>	-	0,45	-	0,43	-	-	-	0,30	0,41	-	-	0,63	-	-	-	0,62	-	-	-	0,73

Продолжение приложения №7

№	Образец, содержащий	CV(%)																			
		1 пробирка				2 пробирка				3 пробирка				4 пробирка				5 пробирка			
		FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5	FAM	ROX	HEX	Cy5
Результаты, полученные на амплификаторе АНК*																					
15	<i>M.kansasii</i>	-	0,64	-	0,37	-	-	-	0,33	0,45	-	-	0,39	-	-	-	1,53	-	-	-	0,47
16	<i>M.gordoniae</i>	-	1,08	-	0,93	-	-	-	0,26	-	1,05	-	0,74	-	-	-	0,33	-	-	-	0,79
17	<i>M.gordoniae</i>	-	0,65	-	0,78	-	-	-	0,74	-	0,73	-	0,62	-	-	-	0,38	-	-	-	0,27
18	<i>M.gordoniae</i>	-	0,72	-	1,09	-	-	-	0,73	-	0,72	-	0,76	-	-	-	0,44	-	-	-	0,23
19	<i>M.lentiflavum</i>	-	2,64	-	1,21	-	-	-	0,30	-	-	2,59	0,15	-	-	-	0,24	-	-	-	0,36
20	<i>M.lentiflavum</i>	-	0,79	-	0,45	-	-	-	0,70	-	-	0,88	0,34	-	-	-	0,43	-	-	-	0,47
21	<i>M.lentiflavum</i>	-	0,76	-	0,52	-	-	-	0,79	-	-	-	0,52	-	-	-	0,47	-	-	-	0,52
22	<i>M.abscessus</i>	-	0,50	-	1,05	-	-	-	1,03	-	-	-	0,68	0,50	-	-	0,66	-	-	-	0,39
23	<i>M.abscessus</i>	-	2,27	-	2,00	-	-	-	0,29	-	-	-	0,60	1,71	-	-	0,52	-	-	-	0,36
24	<i>M.abscessus</i>	-	0,79	-	0,97	-	-	-	0,32	-	-	-	0,84	0,88	-	-	0,52	-	-	-	0,70
25	<i>M.chelonae</i>	-	0,82	-	1,20	-	-	-	0,46	-	-	-	0,52	-	0,81	-	1,06	-	-	-	1,10
26	<i>M.chelonae</i>	-	1,54	-	0,66	-	-	-	0,56	-	-	-	0,29	-	1,41	-	0,43	-	-	-	0,61
27	<i>M.chelonae</i>	-	0,64	-	0,35	-	-	-	0,37	-	-	-	0,54	-	0,76	-	0,57	-	-	-	1,52
28	<i>M.mucogenicum</i>	-	0,49	-	0,38	-	-	-	0,70	-	-	-	0,93	-	-	0,98	0,86	-	-	-	0,32
29	<i>M.mucogenicum</i>	-	0,51	-	0,45	-	-	-	0,34	-	-	-	1,04	-	-	0,40	1,29	-	-	-	0,47
30	<i>M.mucogenicum</i>	-	0,59	-	0,40	-	-	-	0,47	-	-	-	0,43	-	-	0,41	1,15	-	-	-	0,43
31	<i>M.fortuitum</i>	-	0,77	-	0,35	-	-	-	0,93	-	-	-	0,20	-	-	-	0,32	0,96	-	-	0,63
32	<i>M.fortuitum</i>	-	1,41	-	0,82	-	-	-	1,47	-	-	-	0,99	-	-	-	1,31	1,51	-	-	0,43
33	<i>M.fortuitum</i>	-	1,15	-	1,18	-	-	-	0,47	-	-	-	0,69	-	-	-	0,84	0,75	-	-	0,22
34	<i>M.smegmatis</i>	-	0,47	-	0,42	-	-	-	0,39	-	-	-	0,41	-	-	-	0,83	-	1,06	-	0,29
35	<i>M.smegmatis</i>	-	0,54	-	1,05	-	-	-	0,40	-	-	-	0,41	-	-	-	0,55	-	0,52	-	0,91
36	<i>M.smegmatis</i>	-	0,82	-	0,50	-	-	-	0,47	-	-	-	0,77	-	-	-	0,47	-	0,71	-	0,40
37	<i>M.peregrinum</i>	-	0,95	-	0,50	-	-	-	0,58	-	-	-	0,78	-	-	-	0,34	-	-	0,68	1,01
38	<i>M.peregrinum</i>	-	0,61	-	0,67	-	-	-	1,11	-	-	-	0,96	-	-	-	0,71	-	-	0,79	0,59
39	<i>M.peregrinum</i>	-	0,75	-	0,30	-	-	-	0,60	-	-	-	0,29	-	-	-	0,57	-	-	0,78	0,54
40	микобактерии отсутствуют	-	-	-	1,75	-	-	-	0,25	-	-	-	0,67	-	-	-	0,47	-	-	-	0,38
41	микобактерии отсутствуют	-	-	-	0,60	-	-	-	0,60	-	-	-	0,45	-	-	-	0,31	-	-	-	1,03
42	микобактерии отсутствуют	-	-	-	0,67	-	-	-	0,14	-	-	-	0,38	-	-	-	0,53	-	-	-	0,39

Примечание:

- CFX - термоциклер для амплификации нуклеиновых кислот с модулем CFX96 (BioRad Laboratories, Inc, США);
- ДТ - амплификатор ДТ-96 (ООО «НПО ДНК-ТЕХНОЛОГИЯ», Россия);
- АНК - амплификатор АНК 32 М (ФГБУН ИАП РАН, Россия);
- CV(%) - коэффициент вариации значений пороговых циклов амплификации