

ВЫЯВЛЕНИЕ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ И МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО КОМПЛЕКСА МЕТОДОМ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

V. V. УСТИНОВА¹, Т. Г. СМЕРНОВА¹, Д. А. ВАРЛАМОВ², И. Ю. АНДРИЕВСКАЯ¹, Е. Е. ЛАРИОНОВА¹, Л. Н. ЧЕРНОУСОВА¹

¹ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», Москва

²ФГБНУ «Всероссийский НИИ сельскохозяйственной биотехнологии», Москва

Цель исследования: определить дизайн праймеров и зондов, специфичных к ДНК нетуберкулезных микобактерий (НТМБ), и оценить их диагностическую значимость при одновременном выявлении НТМБ и *M. tuberculosis* complex (МБТК) методом ПЦР в режиме реального времени.

Материалы и методы. Дизайн праймеров и зондов осуществляли с использованием ПО Primer 3, Primer BLAST, Ugene Uni Pro. Предварительную оценку специфичности и чувствительности выявления ДНК НТМБ проводили на культурах, принадлежащих к 18 видам НТМБ, 16 штаммам МБТК и 14 видам микроорганизмов, не относящихся к роду *Mycobacterium*. Аналитическую чувствительность оценивали на 284 культурах НТМБ, диагностическую чувствительность – на 124 образцах мокроты. Выделение ДНК проводили набором «М-Сорб-Туб-Автомат» (ЗАО «Синтол»). Культуры подвергали субкультивированию на жидкой среде Middlebrook 7H9 в системе Bactec MGIT 960. Идентификацию культур проводили с использованием стандартных микробиологических методов. Анализ ДНК, выделенной из культур, выполняли с помощью набора реагентов GenoTypeCM/AS (Hain Lifescience, Германия).

Результаты. Показаны 100%-ные специфичность и чувствительность ПЦР при работе с культурами микобактерий и 100%-ная специфичность и 69,70%-ная чувствительность при анализе диагностического материала.

Ключевые слова: нетуберкулезные микобактерии, микобактерии туберкулезного комплекса, ПЦР в режиме реального времени

DETECTION AND DIFFERENTIATION OF NON-TUBERCULOUS MYCOBACTERIA AND *M. TUBERCULOSIS* COMPLEX BY REAL TIME PCR

V. V. USTINOVA¹, T. G. SMIRNOVA¹, D. A. VARLAMOV², I. YU. ANDRIEVSKAYA¹, E. E. LARIONOVA¹, L. N. CHERNOUSOVA¹

¹Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia

²All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology, Moscow, Russia

Goal of the study: to define the design of primers and probes specific to DNA of non-tuberculous mycobacteria and evaluate their diagnostic value in case of simultaneous detection of non-tuberculous mycobacteria and *M. tuberculosis* complex by real time PCR.

Materials and methods. Primer 3, Primer BLAST, Ugene Uni Pro were used to design primers and probes. Preliminary assessment of specificity and sensitivity of detection of non-tuberculous mycobacteria DNA was performed on cultures belonging to 18 types of non-tuberculous mycobacteria, 16 strains of *M. tuberculosis* complex and 14 types of microorganisms being none *Mycobacterium*. Analytic sensitivity was tested on 284 cultures of non-tuberculous mycobacteria and diagnostic sensitivity was tested on 124 sputum samples. The kit of M-Sorb-Tub-Avtomat (ZAO Sintol) was used for DNA isolation. Cultures were subcultured on the liquid medium of Middlebrook 7H9 in Bactec MGIT 960. Cultures were identified with the use of standard microbiological techniques. Analysis of DNA isolated from cultures was performed by the reagent kit of GenoTypeCM/AS (Hain Lifescience, Germany).

Results. 100% specificity and sensitivity of PCR was demonstrated in mycobacterial cultures and 100% specificity and 69.70% sensitivity was demonstrated in diagnostic material analysis.

Key words: non-tuberculous mycobacteria, *M. tuberculosis* complex, real time PCR

Несмотря на то что изучение нетуберкулезных микобактерий (НТМБ) началось вскоре после открытия Робертом Кохом возбудителя туберкулеза, их клиническое значение долгое время недооценивалось. В настоящее время отмечают значительный рост заболеваемости микобактериозом [1, 11]. Чаще всего больные микобактериозом попадают в противотуберкулезные учреждения с подозрением на туберкулез.

Наиболее быстрыми методами, обладающими максимально возможной специфичностью и чувствительностью, позволяющими выявлять и дифференцировать НТМБ от *M. tuberculosis* complex (МБТК), на сегодняшний день являются молеку-

лярно-генетические. Однако в России не производят молекулярно-генетические тест-системы для быстрой и недорогой детекции НТМБ. Зарубежные аналоги представлены на отечественном рынке тест-системами немецкой компании Hain Lifescience, основанными на технологии Line Probe Assay [3, 4]. Наборы реагентов для выявления НТМБ на основе ПЦР в режиме реального времени создавали и ранее, однако большинство из них требовали дополнительного проведения плавления продуктов ПЦР и предполагали работу с культуральным материалом [2, 7, 9].

На данный момент существует один коммерческий набор реагентов, основанный на ПЦР в режи-

ме реального времени, для одновременного выявления МБТК и НТМБ – Seegene Anyplex МТВ/NTM Real-Time Detection Assay [5]. Данный набор не доступен для использования в ряде стран (например, на территории РФ, США), что определяет актуальность разработки отечественного способа выявления НТМБ и их дифференциации от МБТК на основе ПЦР в режиме реального времени.

Цель исследования: определить дизайн праймеров и зондов, специфичных к ДНК НТМБ, и оценить их диагностическую значимость при одновременном выявлении НТМБ и МБТК методом ПЦР в режиме реального времени.

Материалы и методы

Микобактериальные штаммы

Для предварительной оценки специфичности и чувствительности ПЦР на выявление ДНК НТМБ использовали культуры НТМБ (18 видов: *M. avium*, *M. abscessus* spp. *abscessus*, *M. abscessus* spp. *chelonae*, *M. fortuitum* spp. *peregrinum*, *M. fortuitum* spp. *fortuitum*, *M. gastri*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. mucogenicum*, *M. nonchromogenicum*, *M. scrofulaceum*, *M. smegmatis*, *M. simiae*, *M. szulgai*, *M. xenopi*), МБТК (16 штаммов: 5 штаммов *M. bovis* Bovinus, 1 штамм *M. bovis* Vallee, 5 штаммов *M. bovis* BCG, 5 штаммов *M. tuberculosis*) и микроорганизмов, не относящихся к роду *Mycobacterium* (14 видов: *Achromobacter xylosoxidans*, *Bukholderia cenocepacia*, *Candida albicans*, *Corynebacterium* sp., *Gordonia polyisoprenivorans*, *Nocardia farcinica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Moraxella catarrhalis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodococcus bronchialis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae*), хранящиеся в коллекции отдела микробиологии ФГБНУ «ЦНИИТ». Культуры из коллекции были выделены от больных с подозрением на туберкулез, с осложнением после вакцинации BCG или подозрением на микобактериоз. Видовую принадлежность культур микобактерий определяли двумя методами: с использованием коммерческих наборов GenoTypeCM и GenoTypeAS (Hain Lifescience, Германия) и секвенированием варибельных участков генов *16S rRNA* и *hsp65*. Видовую принадлежность микроорганизмов, не относящихся к роду *Mycobacterium*, определяли с помощью системы идентификации микроорганизмов BBL™ Crystal™ Identification Systems (Becton Dickinson, США).

Культуры НТМБ, полученные из диагностического материала

Для оценки аналитической чувствительности ПЦР были использованы культуры (284 образца), полученные из респираторного материала от больных с подозрением на туберкулез легких, присланные в ФГБНУ «ЦНИИТ» из 17 региональных противотуберкулезных учреждений для видо-

вой идентификации. Культуры были выращены на плотных питательных средах и обладали кислотоустойчивостью по результатам проведения микроскопии по Цилю – Нельсену, но не принадлежали к туберкулезному комплексу по результатам роста на селективных средах, содержащих ТСН и салицилат натрия. Все культуры подвергали субкультивированию на жидкой среде Middlebrook 7Н9 в системе Bactec MGIT 960 (Becton Dickinson, США), выделению ДНК и анализу на принадлежность к видам НТМБ с использованием набора реагентов Hain Lifescience GenoTypeCM/AS.

Диагностический материал

Для проверки диагностической чувствительности ПЦР был использован материал от больных с подтвержденным диагнозом микобактериоза (124 образца мокроты от 33 пациентов), направленных на обследование в ФГБНУ «ЦНИИТ». Образцы мокроты были разделены на две части каждый. Из одной части была выделена ДНК и проанализирована с помощью ПЦР, вторая часть была использована для посева и микроскопии. Микроскопию с окраской флуоресцентными красителями проводили из осадка мокроты, обработанного набором Mucoprep (Becton Dickinson, США). Посев диагностического материала выполняли на жидкую питательную среду Middlebrook 7Н9 в системе автоматической детекции роста микобактерий Bactec MGIT 960 (Becton Dickinson, США) согласно инструкции производителя. Полученные культуры подвергали первичной идентификации микробиологическими методами (посев, окраска мазков по Цилю – Нельсену), а также проводили иммунохроматографический тест на выявление антигена МРТ64 в культуральной среде для дифференциации с МБТК (SD МРТ64ТВ Ag Kit, Standard Diagnostics, Корея). Культуры, определенные как НТМБ по результатам проведенных исследований, подвергались видовой идентификации с использованием коммерческих наборов GenoTypeCM/AS (Hain Lifescience, Германия).

Выделение ДНК

Выделение ДНК из культур и клинических образцов проводили на роботизированной станции для автоматического раскапывания жидкостей Tecan Freedom Evo 150/8 (Tecan, Швейцария) с использованием набора «М-Сорб-Туб-Автомат» (ЗАО «Синтол»).

Дизайн праймеров

Основой для проведения ПЦР, с согласия производителя, послужил набор реагентов «Амплитуб-РВ-Скрин» (ЗАО «Синтол», Россия, регистрационное удостоверение № ФСР 2010/07635 от 6 мая 2010 г.) для быстрого выявления микобактерий туберкулезного комплекса методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени. Регистрация ДНК МБТК в пробе с помощью этого набора осуществляется по двум каналам флуорес-

ценции – FAM и ROX, по каналу HEX регистрируют амплификацию ДНК внутреннего положительного контроля. Для регистрации амплификации ДНК НТМБ был выбран канал Су5.

Путем сравнительного биоинформационного анализа референсных геномов НТМБ, генома *M. tuberculosis* H37Rv и родственных кислотоустойчивых бактерий (*Corynebacterium pseudodiphtheriticum*, *Rhodococcus bronchialis*, *Nocardia farcinica*), представленных в базе данных NCBI, были выбраны участки микобактериального генома, дифференцирующие НТМБ от МБТК и родственных кислотоустойчивых бактерий, локализованные в генах *metH* и *tuf*. С помощью алгоритма Muscle в ПО Ugene UniPro [6] было проведено выравнивание полных нуклеотидных последовательностей генов *metH* (для *M. abscessus* spp. *abscessus*, *M. abscessus* spp. *chelonae*, *M. avium* subs. *avium*, *M. avium* sbs. *paratuberculosis*, *M. intracellulare*, *M. smegmatis*, *M. phlei*, *M. marinum*, *M. neoaurum*, *M. parascrofulaceum*, *M. simiae*) и *tuf* (для *M. gastri*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. xenopi*), размещенных в базе данных GenBank, NCBI. На основе полученных выравниваний были подобраны праймеры для прямого секвенирования фрагментов генов *metH* и *tuf* в отобранных образцах НТМБ из коллекции ФГБНУ «ЦНИИТ». Секвенирование по Сэнгеру проводили с набором ABI PRISM BigDye Terminator v. 1.3 («Applied Biosystems», США) согласно инструкции производителя с разделением полученных фрагментов на генетическом анализаторе ABI Prism 3130xl (Applied Biosystems, США). Последовательности отсекуемых участков генов *metH* и *tuf* 18 штаммов НТМБ были добавлены в выравнивания полных нуклеотидных последовательностей этих генов, выполненные на предыдущем этапе. На основе полученных выравниваний

были подобраны праймеры и Taq-Man-зонды, позволяющие проводить специфическую амплификацию консервативных участков генов *metH* и *tuf*. Подбор праймеров и зондов проводили в ПО Primer3 [8]. Оценку специфичности отобранных олигонуклеотидов проводили с использованием алгоритма PrimerBLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Для обеспечения возможности одновременного выявления НТМБ и МБТК в одной пробирке подобранные праймеры и зонды были адаптированы к реакционной смеси взятого за основу набора реагентов «Амплитуб-РВ-Скрин».

ПЦР в режиме реального времени

ПЦР в режиме реального времени проводили в 25 мкл раствора, содержащего 0,1 мкл мультиплексирующей смеси праймеров и зондов, 6 мкл концентрированного ПЦР мастер-микса (ЗАО «Синтол») и 20 мкл микобактериальной ДНК в приборе CFX-96 (Biorad, США). Использовали следующую программу амплификации: 95°C – 15 мин, далее 45 циклов 95°C – 15 с, 63°C – 45 с с измерением сигнала флуоресценции специфических зондов.

Результаты исследования

Выявлены локусы, позволяющие дифференцировать НТМБ от МБТК и неспецифической флоры, лежащие в генах *tuf* и *metH*. Подобранные к ним праймеры и зонды, специфичные к ДНК НТМБ, в сочетании с реакционной смесью набора реагентов «Амплитуб-РВ-Скрин» позволяют проводить одновременное выявление ДНК МБТК и ДНК НТМБ в одной пробирке. Последовательности праймеров и зондов представлены в табл. 1.

Итоговые выравнивания областей посадки подобранных праймеров и зондов, лежащих в генах *tuf* и *metH*, исследованных видов НТМБ представлены на рис. 1, 2.

Таблица 1. Последовательности праймеров и зондов, специфичных к гену *metH*: *M. avium*, *M. abscessus* spp. *abscessus*, *M. abscessus* spp. *chelonae*, *M. fortuitum* spp. *fortuitum*, *M. fortuitum* spp. *peregrinum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. interjectum*, *M. mucogenicum*, *M. nonchromogenicum*, *M. scrofulaceum*, *M. simiae*, *M. smegmatis*, *M. szulgai* и гену *tuf*: *M. gastri*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. xenopi*

Table 1. Sequences of primers and probes, specific to gene of *metH* *M. avium*, *M. abscessus* spp. *abscessus*, *M. abscessus* spp. *chelonae*, *M. fortuitum* spp. *fortuitum*, *M. fortuitum* spp. *peregrinum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. interjectum*, *M. mucogenicum*, *M. nonchromogenicum*, *M. scrofulaceum*, *M. simiae*, *M. smegmatis*, *M. szulgai* and gene of *tuf* *M. gastri*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. xenopi*

Название	Последовательность 5'-3'	T отжига	Концентрация в 25 мкл ПЦР-смеси, пмоль	Область посадки
Праймеры и зонды, специфичные к участку гена <i>metH</i> (указана область посадки на геноме <i>M. smegmatis</i> str. MC2 155, NCBI Reference Sequence: NC_008596.1)				
MeSy_up1	GAGCGACCAACATCACCG	61,6	4	4263878 – 4263896
MeSy_up2	GAGCGACCAACATCACGG	61,6	2	4263878 – 4263896
MeSy_low	CCTCGTCCATGTTGATGTCGA	61,2	6	4263764 – 4263784
MeSy_Pb_C	Су5-CTGATCAAGCGGAGGACTACGACACC-BHQ2	72,7	2,5	4263879 – 4263905
MeSy_Pb_T	Су5-CTGATCAAGCGGAGGATTACGACACC-BHQ2	71,5	2,5	4263831 – 4263857
Праймеры и зонды, специфичные к участку гена <i>tuf</i> (указана область посадки на геноме <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv, NCBI Reference Sequence: NC_000962.3)				
Tuf_up	ACCGACAAGCCGTTCCCTG	58,4	5	785442-785459
Tuf_low1	CGATCTCGACCTCCTCGTTG	62,5	5	785559-785540
Tuf_low2	TGGTGCTGGTCGGCTTGAT	59,5	6	785585-785562
Tuf_Pb_1up	Су5-ATCGAAGACGTGTTCCACATCACCG-BHQ2	67,4	2,5	785466-785490
Tuf_Pb_2up	Су5-TCTTACAGATCACCGGCCGC-BHQ2	64,4	2,5	785476-785495

Оценку эффективности работы праймеров, специфичных к ДНК НТМБ, в присутствии остальных компонентов смеси набора реагентов «Амплитуб-РВ-Скрин» проводили на сериях из 6 последовательных разведений ДНК *M. avium*, *M. kansasii*, *M. malmoense* и *M. xenopi*, выделенных из музейных культур ФГБНУ «ЦНИИТ» (табл. 1).

содержавших 10^5 ; 10^4 ; 10^3 ; 10^2 ; 20 и 10 геном-эквивалентов (г-э). Для анализа были выбраны эти виды НТМБ, так как они несут 4 основных генотипа по результатам выравнивания нуклеотидных последовательностей участков генов *metH* и *tuf* в местах посадки праймеров (рис. 1, 2). Коэффициент детерминации (R^2) для всех исследованных реак-

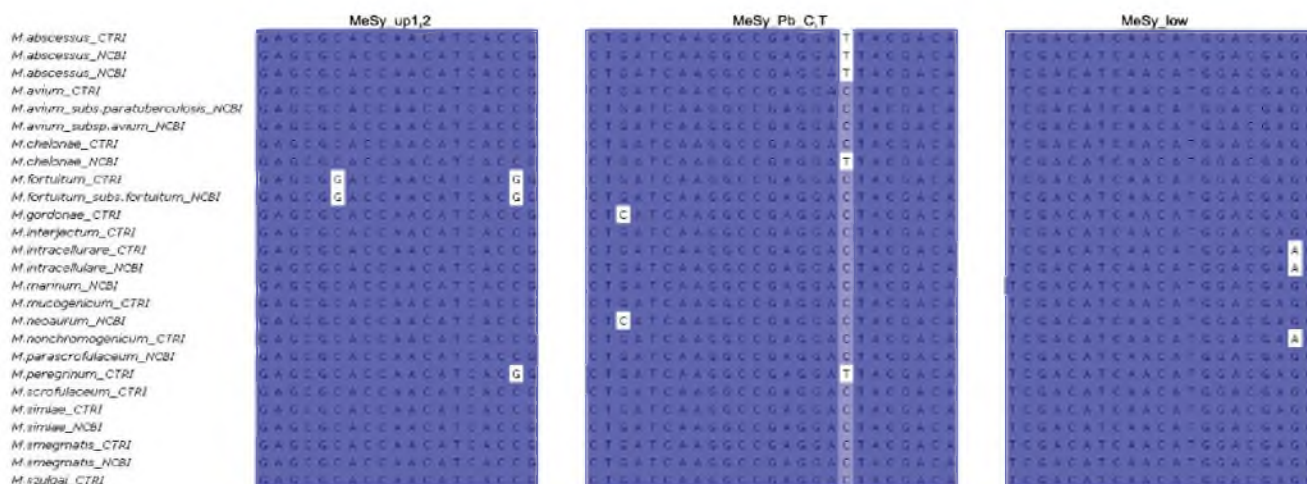


Рис. 1. Выравнивание областей посадки праймеров и зондов, специфичных к участку гена *metH*

Fig. 1. Annealing of binding sites of primers and probes specific to the part of *metH* gene.

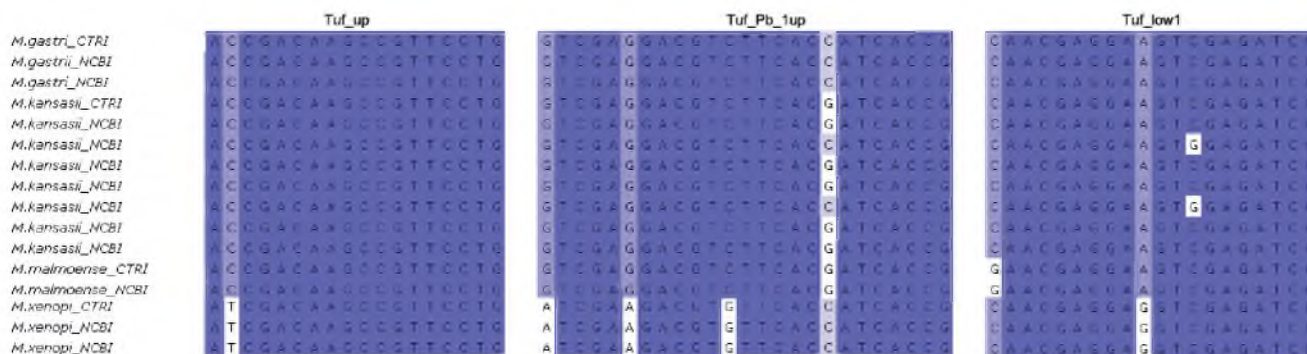


Рис. 2а. Выравнивание областей посадки праймеров и зондов, специфичных к участкам гена *tuf* *M. kansasii*, *M. gastri*, *M. xenopi*

Fig. 2a. Annealing of binding sites of primers and probes specific to the part of *metH* gene of *M. kansasii*, *M. gastri*, *M. xenopi*

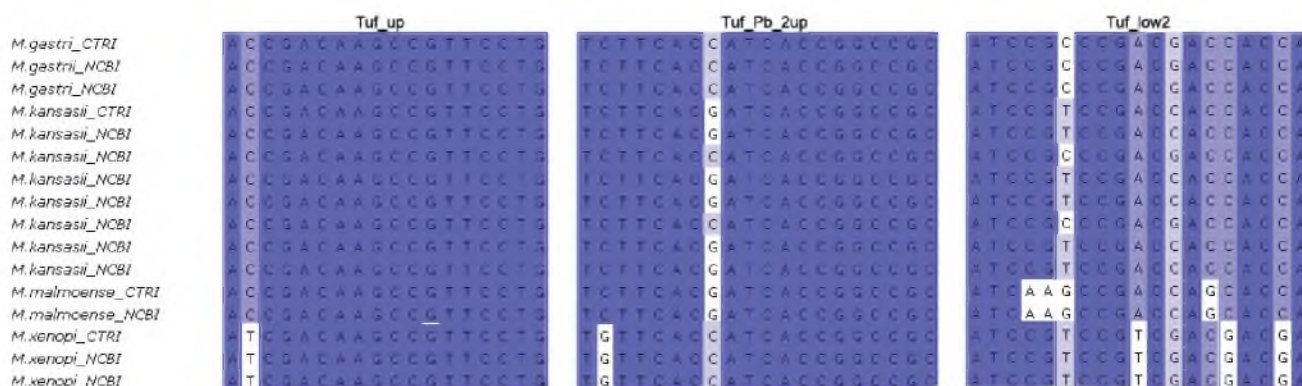


Рис. 2б. Выравнивание областей посадки праймеров и зондов, специфичных к участкам гена *tuf* *M. malmoense*, *M. kansasii*, *M. gastri*

Fig. 2b. Annealing of binding sites of primers and probes specific to the part of *metH* gene of *M. malmoense*, *M. kansasii*, *M. gastri*

ций составил 0,997-0,998, при рекомендованном для эффективной работы ПЦР-систем значении $R^2 > 0,980$ [10], эффективности реакций составили 98,8-103,5%, а разница значений пороговых циклов по каналу Cy5 при разведении образцов ДНК в 10 раз от -3,241 до -3,351.

Для оценки взаимного влияния амплификации специфических участков геномов НТМБ и МБТК проводили амплификацию образцов ДНК НТМБ и МБТК в одной пробирке с реакционной смесью модифицированной нами ПЦР-системы. ДНК каждого из четырех видов НТМБ (*M. avium*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. xenopi*) добавляли в пробирку с реакционной смесью одновременно с ДНК *M. tuberculosis* H37Rv в следующих количествах и соотношениях (в геном-эквивалентах): $10^6:10^6$; $10^3:10^6$; $10^2:10^6$; $10^6:10$ соответственно. Те же количества ДНК каждого из четырех видов НТМБ и *M. tuberculosis* H37Rv добавляли в реакционную смесь модифицированной нами ПЦР-системы по отдельности. Амплификацию проводили в двух повторах. Разница средних пороговых циклов амплификации ΔCt (каналы FAM, ROX, Cy5) для смешанных образцов и образцов ДНК МБТ и 4 видов НТМБ представлена в табл. 2. Разницу пороговых циклов определяли по формуле $\Delta Ct = Ct(\text{НТМБ} + \text{МБТ}) - Ct(\text{МБТ})$, где НТМБ + МБТ – смешанная проба, МБТ – проба, в которую ДНК НТМБ или МБТ добавляли отдельно друг от друга. Добавление в реакционную смесь праймеров и зондов, специфичных для НТМБ, не повлияло на работу праймеров, специфичных для МБТ. В образцах со всеми исследованными вариантами смеси ДНК МБТ и НТМБ пороговые циклы по каналам

FAM и ROX не отличались от пороговых циклов по этим же каналам для образцов, содержащих только ДНК МБТ (табл. 2).

Для всех смешанных образцов, содержащих ДНК НТМБ и МБТ, были получены положительные результаты по каналу Cy5 (НТМБ). Однако эффективность работы праймеров, специфичных для НТМБ, для смешанных образцов была ниже, чем для образцов, содержащих только ДНК НТМБ. Пороговые циклы амплификации по каналу Cy5 смешанных проб, содержащих максимальное количество ДНК МБТ, и проб, содержащих только ДНК НТМБ, отличались для разных генотипов НТМБ. Для всех видов НТМБ кроме *M. malmoense* ΔCt была наибольшей для образцов, содержащих малое количество ДНК НТМБ (10^2 - 10^3 г-э) и большое количество ДНК МБТ (10^6 г-э) (табл. 2). Для *M. malmoense* добавление ДНК МБТ в образцы не повлияло на амплификацию по каналу Cy5 (табл. 3), что объясняется, по-видимому, большей специфичностью реакции амплификации ДНК *M. malmoense* по сравнению с НТМБ, обладающими другими генотипами, обуславливаемой обратным праймером, уникальным для этого вида (табл. 1).

Таким образом, показана возможность выявления как минимум 10^2 г-э ДНК НТМБ в условиях высокого содержания в той же амплификационной пробе ДНК МБТ (рис. 3).

Результаты исследования ПЦР на 18 культурах НТМБ, 5 культурах *M. tuberculosis*, 5 культурах *M. bovis* BCG и 6 культурах *M. bovis* Bovinus из музея ФГБНУ «ЦНИИТ» показали возможность выявления с ее помощью 18 видов НТМБ, а также видов, принадлежащих МБТК. Результаты, полученные на 14 культурах неспецифической микрофлоры,

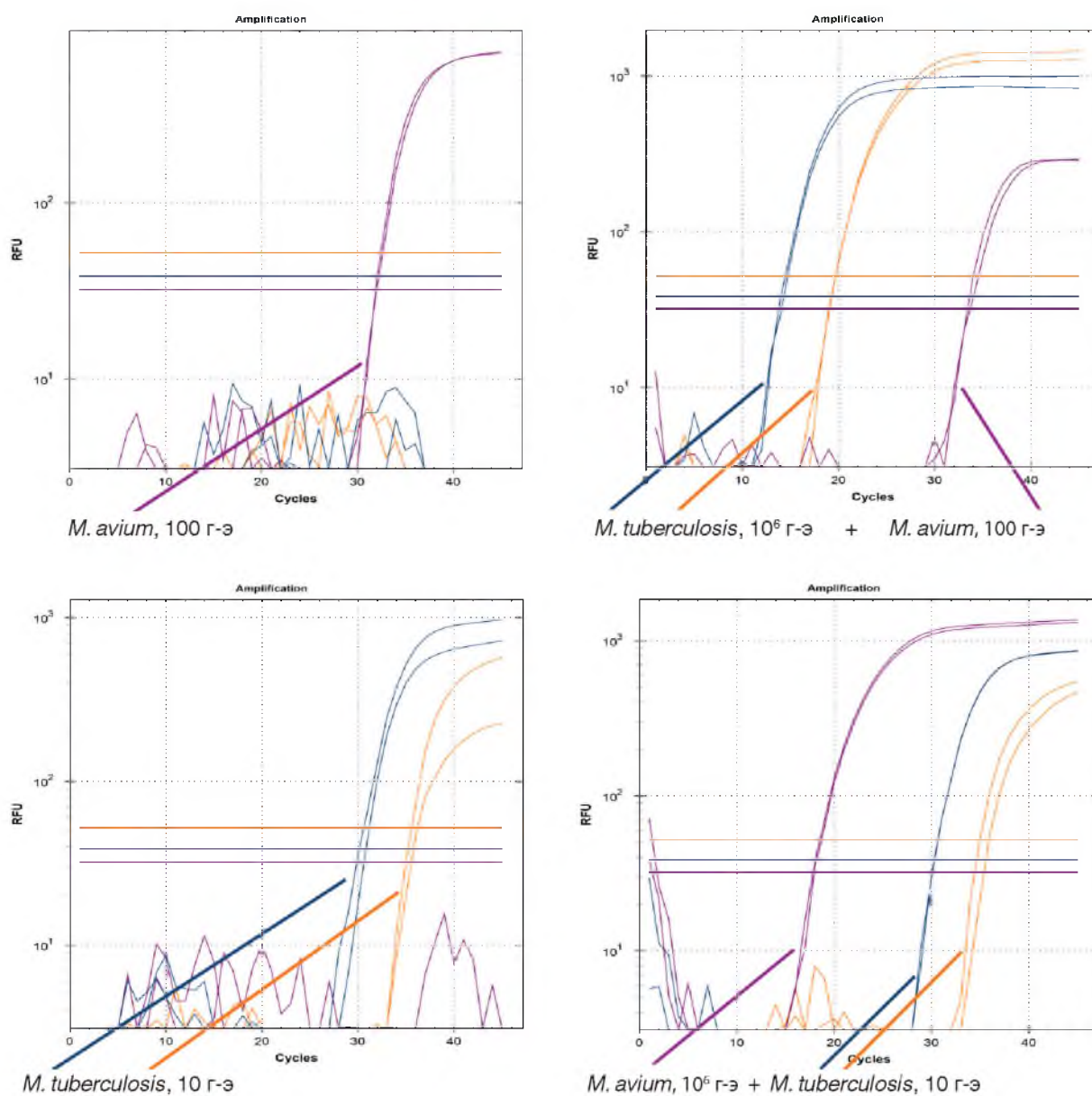
Таблица 2. Взаимное влияние реакций амплификации фрагментов генома НТМБ и МБТ

Table 2. Cross-action of amplification reaction of genome fragments of non-tuberculous mycobacteria and *M. tuberculosis* complex

Количество геном-эквивалентов в одной реакции			Результаты ПЦР		
			ΔCt , Cy5 (НТМБ)	ΔCt , FAM (МБТ)	ΔCt , ROX (МБТ)
НТМБ		МБТ	Среднее	Среднее	Среднее
<i>M. avium</i>	10^6	10	0,09	0,33	-0,4
	10^5	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
	10^5	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
	10^5	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
	10^5	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

Таблица 3. Результаты выявления ДНК МБТК/НТМБ в диагностическом материале, полученном от больных микобактериозомTable 3. Results of detection of DNA of non-tuberculous mycobacteria/*M. tuberculosis* complex in the specimens collected from mycobacteriosis patients

Всего больных	Число больных Вастес+ (НТМБ), абс. %	Число больных с ПЦР+ (ДНК НТМБ), абс. %	Число больных люм+, абс. %
33	33; 100	23; 69,70	22; 66,67
Всего образцов	Число образцов Вастес+ (НТМБ), абс. %	Число образцов ПЦР+ (ДНК НТМБ), абс. %	Число образцов люм+, абс. %
125	125; 100	57; 45,60	54; 43,20

**Рис. 3. Взаимное влияние амплификации специфических участков геномов НТМБ и МБТ на примере *M. avium* и *M. tuberculosis*****Fig. 3. Cross-action of amplification of specific parts of genome of non-tuberculous mycobacteria and *M. tuberculosis* complex using the example of *M. avium* and *M. tuberculosis***

показали 100%-ную специфичность к ДНК НТМБ и МБТК.

Аналитическую чувствительность оценивали на 284 культурах НТМБ, полученных из респираторного

материала от больных из 17 регионов РФ с подозрением на туберкулез легких. По результатам видовой идентификации наборами реагентов Genotype CM/AS (Hain Lifescience, Германия)

культуры принадлежали к 11 видам НТМБ. ПЦР для одновременного выявления ДНК МБТК/НТМБ показала 100%-ную чувствительность и выявила ДНК НТМБ в культурах, содержащих *M. avium* (107 культур), *M. intracellulare* (38 культур), *M. goodii* (54 культуры), *M. kansasii* (23 культуры), *M. xenopi* (14 культур), *M. mageritensis* (1 культура), *M. scrofulaceum* (1 культура), *M. peregrinum* (2 культуры), *M. fortuitum* (25 культур), *M. abscessus* (10 культур), *M. chelonae* (8 культур). Один образец, содержащий смесь *M. tuberculosis* и *M. avium*, был положительным и по каналу FAM (МБТК), и по каналу Су5 (НТМБ).

Результаты исследования ПЦР на выявление ДНК МБТК/НТМБ на 124 образцах мокроты, полученной от 33 больных с диагнозом микобактериоза, в сравнении с результатами люминесцентной микроскопии, проведенной для тех же образцов, представлены в табл. 3. Все 124 образца мокроты от 33 больных микобактериозом дали рост НТМБ на жидкой питательной среде в системе Bactec MGIT 960. Однако при выявлении НТМБ непосредственно в мокроте методом ПЦР в режиме реального времени была показана меньшая диагностическая чувствительность, чем ожидалось. ДНК НТМБ была выявлена в 57 образцах из 124 (45,96%), у 23 больных из 33 (69,70%) с верифицированным диагнозом микобактериоза (табл. 3). Результаты люминесцентной микроскопии этого же материала выявили 54 положительных образца из 124 (43,55%) у 22 больных из 33 (66,67%). Таким образом, чувствительность ПЦР при исследовании диагностического материала была сопоставима с чувствительностью люминесцентной микроскопии, хотя эффективность ПЦР на ДНК НТМБ приближалась к 100%, что может быть обусловлено неспецифической активностью праймеров, специфичных к ДНК НТМБ на ДНК других микроорганизмов, содержащихся в диагностических образцах от больных.

Заключение

В результате исследования показана возможность одновременного выявления МБТК и НТМБ в одной пробирке как из культур, так и из диагностического материала, методом ПЦР в режиме реального времени. Подобранные праймеры и зонды позволяют выявлять ДНК 18 видов НТМБ (*M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. gastri*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. smegmatis*, *M. avium*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. goodii*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. mageritensis*, *M. nonchromogenicum*, *M. simiae*, *M. szulgai*, *M. xenopi*). Результаты показали 100%-ную специфичность и чувствительность ПЦР при работе с культурами микобактерий, а также 100%-ную специфичность и 69,70%-ную чувствительность при анализе диагностического материала, содержащего НТМБ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Оттен Т.Ф., Васильев А.В. Микобактериоз. – СПб.: Медицинская пресса, 2005. – 224 с.
2. Hong Y. J., Chung Y. H., Kim T. S. et al. 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 // J. Clin. Microbiol. – 2011. – Vol. 49. – P. 3963-3966.
3. Lara-Oya A., Mendoza-Lopez P., Rodriguez-Granger J. et al. Evaluation of the Speed-oligo Direct *Mycobacterium tuberculosis* assay for molecular detection of Mycobacteria in clinical respiratory specimens // J. Clin. Microbiol. – 2013. – Vol. 51. – P. 77-82.
4. Luna F.F.-A., Ruiz P., Gutierrez J., Casal M. Evaluation of the GenoType Mycobacteria direct assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and four atypical mycobacterial species in clinical samples // J. Clin. Microbiol. – 2006. – Vol. 44. – P. 3025-3027.
5. Michael D. Perry, P. Lewis White, Michael Ruddy. Potential for use of the seegene anyplex MTB/NTM real-time detection assay in a Regional Reference Laboratory // J. Clin. Microbiol. – 2014. – Vol. 52, № 5. – P. 1708-1710.
6. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., the UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // Bioinformatics. – 2012. – Vol. 28. – P. 1166-1167.
7. Richardson E. T., Samson D., Banaei N. Rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* and Nontuberculous Mycobacteria by Multiplex, Real-Time PCR // J. Clin. Microbiol. – 2009. – Vol. 47. – P. 1497-1502.
8. Rozen S., Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers // Methods Mol. Biol. – 2000. – Vol. 132. – P. 365-386.
9. Shrestha N. K., Tuohy M. J., Hall G. S. et al. Detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and Nontuberculous mycobacterial isolates by Real-Time PCR // J. Clin. Microbiol. – 2003. – Vol. 41. – P. 5121-5126.
10. Taylor S., Wakem M., Dijkman G. et al. A practical approach to RT-qPCR-Publishingdata that conform to the MIQE guidelines // Methods. – 2010. – Vol. 50. – P. S1-S5. doi: 10.1016/j.ymeth.2010.01.005 PMID: 20215014
11. Thomson R M. Changing epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacteria infections // Emerg. Infect. Dis. – 2010. – Vol. 16, № 10. – P. 1576-1583.

REFERENCES

1. Otten T.F., Vasiliev A.V. *Mikobakterioz*. [Mycobacteriosis.] St. Petersburg, Meditsinskaya Pressa Publ., 2005, 224 p.
2. Hong Y.J., Chung Y.H., Kim T.S. et al. 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. *J. Clin. Microbiol.*, 2011, vol. 49, pp. 3963-3966.
3. Lara-Oya A., Mendoza-Lopez P., Rodriguez-Granger J. et al. Evaluation of the Speed-oligo Direct *Mycobacterium tuberculosis* assay for molecular detection of Mycobacteria in clinical respiratory specimens. *J. Clin. Microbiol.*, 2013, vol. 51, pp. 77-82.
4. Luna F.F.-A., Ruiz P., Gutierrez J., Casal M. Evaluation of the GenoType Mycobacteria direct assay for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and four atypical mycobacterial species in clinical samples. *J. Clin. Microbiol.*, 2006, vol. 44, pp. 3025-3027.
5. Michael D. Perry, P. Lewis White, Michael Ruddy. Potential for use of the seegene anyplex MTB/NTM real-time detection assay in a Regional Reference Laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, 2014, vol. 52, no. 5, pp. 1708-1710.
6. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M., the UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 2012, vol. 28, pp. 1166-1167.
7. Richardson E.T., Samson D., Banaei N. Rapid identification of *Mycobacterium tuberculosis* and Nontuberculous Mycobacteria by Multiplex, Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2009, vol. 47, pp. 1497-1502.
8. Rozen S., Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol. Biol.*, 2000, vol. 132, pp. 365-386.
9. Shrestha N.K., Tuohy M.J., Hall G.S. et al. Detection and differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and Nontuberculous mycobacterial isolates by Real-Time PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, vol. 41, pp. 5121-5126.
10. Taylor S., Wakem M., Dijkman G. et al. A practical approach to RT-qPCR-Publishingdata that conform to the MIQE guidelines. *Methods*, 2010, vol. 50, pp. S1-S5. doi: 10.1016/j.ymeth.2010.01.005 PMID: 20215014
11. Thomson R.M. Changing epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacteria infections. *Emerg. Infect. Dis.*, 2010, vol. 16, no. 10, pp. 1576-1583.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

ФГБНУ «Центральный НИИ туберкулеза»,
107564, Москва, Яузская аллея, д. 2.
Тел.: 8 (499) 785-90-91.

Устинова Вера Витальевна

младший научный сотрудник, отдел микробиологии.
E-mail: ustinoville@gmail.com

Смирнова Татьяна Геннадьевна

старший научный сотрудник, отдел микробиологии.
s_tatka@mail.ru

Андриевская Ирина Юрьевна

младший научный сотрудник, отдел микробиологии.
E-mail: andrievskaya.iri@mail.ru

Ларионова Елена Евгеньевна

старший научный сотрудник, отдел микробиологии.
E-mail: larionova_ena@mail.ru

Черноусова Лариса Николаевна

ведущий научный сотрудник, заведующая отделом
микробиологии.
E-mail: lchernousova@mail.ru

Варламов Дмитрий Александрович

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский
институт сельскохозяйственной биотехнологии»,
Научный сотрудник.
127550, Москва, ул. Тимирязевская, д. 42.
Тел.: 8 (495) 984-69-93.
E-mail: dvarl@mail.ru

FOR CORRESPONDENCE:

Central Tuberculosis Research Institute,
2, Yauzskaya Alleya, Moscow, 107564
Phone: +7 (499) 785-90-91.

Vera V. Ustinova

Junior Researcher of Microbiological Department.
E-mail: ustinoville@gmail.com

Tatyana G. Smirnova

Senior Researcher of Microbiological Department.
s_tatka@mail.ru

Irina Yu. Andrievskaya

Junior Researcher of Microbiological Department.
E-mail: andrievskaya.iri@mail.ru

Elena E. Larionova

Senior Researcher of Microbiological Department.
E-mail: larionova_ena@mail.ru

Larisa N. Chernousova

Leading Researcher, Head of Microbiological Department.
E-mail: lchernousova@mail.ru

Dmitry A. Varlamov

All-Russia Research Institute of Agricultural Biotechnology.
Researcher.
42, Timiryazevskaya St., Moscow, 127550.
Phone: +7 (495) 984-69-93.
E-mail: dvarl@mail.ru

Submitted on 17.06.2016

Поступила 17.06.2016