

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАНИЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«БАШКИРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
Медико-профилактический факультет с отделением биологии
Кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии

На правах рукописи

Абушахмина Аделя Гумеровна

**РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ
НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫХ *Mycobacterium spp.* В КЛИНИЧЕСКОМ
МАТЕРИАЛЕ**

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
профессор



А. Р. Мавзютов

Уфа – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

Список сокращений и условных обозначений.....	3
ВВЕДЕНИЕ.....	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1. Характеристика бактерий рода <i>Mycobacterium</i>	6
1.2. Туберкулезные микобактерии.....	9
1.3. Нетуберкулезные микобактерии.....	11
1.4. Микобактериозы.....	13
1.5. Диагностика микобактериозов.....	16
1.6. Распространённость микобактериозов.....	17
1.7. Микроскопический метод.....	21
1.8. Культуральный метод.....	22
1.9. Системы ВАСТЕС.....	23
1.10. Биологическая проба.....	24
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	26
2.1. Взятие биоматериала.....	26
2.2. Обработка нативного клинического материала.....	28
2.3. Выделение ДНК.....	28
2.4. Методика проведения ПЦР.....	32
2.5. Электрофорез ДНК.....	36
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	38
3.1. ПЦР диагностика бактерий вида <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	38
3.2. ПЦР диагностика Нетуберкулезных <i>Mycobacterium spp.</i>	52
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	56
ВЫВОДЫ.....	57
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	58

Список сокращений и условных обозначений

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ЖКТ – желудочно-кишечный тракт

МБ - микобактерия

МБТ - микобактерии туберкулеза

МБТК - микобактерии туберкулезного комплекса

НК - нуклеиновая кислота

НТМБ - нетуберкулезные микобактерии

ПЦР - полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ - ПЦР в реальном времени

РНК - рибонуклеиновая кислота

ТАЕ - трис-ацетатный буфер

ТК - туберкулезный комплекс

ЭДТА - этилендиаминтетрауксусная кислота

ГС-состав - гуанин-цитозиновый состав, ГЦ-состав

МАС - *M. avium complex*

MAIS - комплекс *Mycobacterium avium-intracellulare-scrofulaceum*

MGIT - *Mycobacteria growth indicator tube*

Тaq-ДНК-полимераза - термостабильная ДНК-полимераза

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. В настоящее время в мире резко возросло количество заболеваний, которые связывают с потенциально патогенными микроорганизмами рода *Mycobacterium*, но отличающимися по своим характеристикам от *Mycobacterium tuberculosis*. Такие бактерии принято называть атипичными или нетуберкулезными микобактериями, а вызываемые ими заболевания микобактериозами.

Нетуберкулезные микобактерии повсеместно распространены в окружающей среде (в почве, воде и воздухе) и рассматриваются как сапрофиты или условно-патогенные, относящиеся к группе грамположительных, кислотоустойчивых, неспорообразующих бактерий, представителей рода *Mycobacterium*. В группу НТМБ входят более 200 видов, из которых около 50 являются возбудителями микобактериозов, клинически и рентгенологически схожих с туберкулезом.

Клиническими проявлениями нетуберкулезных микобактериозов являются патологические изменения в легких, лимфатических узлах, желудочно-кишечном тракте, коже, мягких тканях, костях, суставах. В силу схожести клинической картины с микобактериозами туберкулезного комплекса, нетуберкулезные микобактериозы часто принимаются за различные формы туберкулезного поражения дыхательной и других систем организма, что осложняет их диагностику.

Еще одной причиной затруднения в определении возбудителя, является большое разнообразие видов, которые могут приводить к сходным заболеваниям, но при этом требуют различные методы лечения, что делает микробиологическую диагностику важной. Благодаря структурным особенностям, микобактерии устойчивы ко многим антибиотикам, поэтому требуется длительное лечение комбинацией нескольких антимикробных молекул, выбор которых основан на видовой идентификации и результатах тестирования чувствительности к антибиотикам.

Учитывая важную этиологическую роль условно-патогенных нетуберкулезных микобактерий, неспецифические клинические проявления указывают на необходимость находений новых методов идентификации микобактерий и в разработки новых тест-систем.

Цель исследования. Разработка метода детекции в клиническом материале нетуберкулезных микобактерий для дифференциальной диагностики вызываемых ими заболеваний от туберкулеза.

Задачи исследования:

???. Анализ литературных данных, сравнительная оценка частоты встречаемости отдельных видов атипичных *Mycobacterium spp.* в клинических образцах и ретроспективная характеристика эпидемиологических особенностей, связанных с ними заболеваний.

???. Экспериментальная оценка информативности метода молекулярно-генетической детекции туберкулезных микобактерий в исследуемых образцах.

???. Отработка условий молекулярно-генетической детекции нетуберкулезных микобактерий в исследуемых образцах.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Характеристика бактерий рода *Mycobacterium*

Микобактерии - это прямые или слегка изогнутые палочковидные бактерии, иногда разветвленные. Их размеры составляют от 0,2 до 0,6 мкм в ширину и от 1,0 до 10 мкм в длину (рисунок 1).

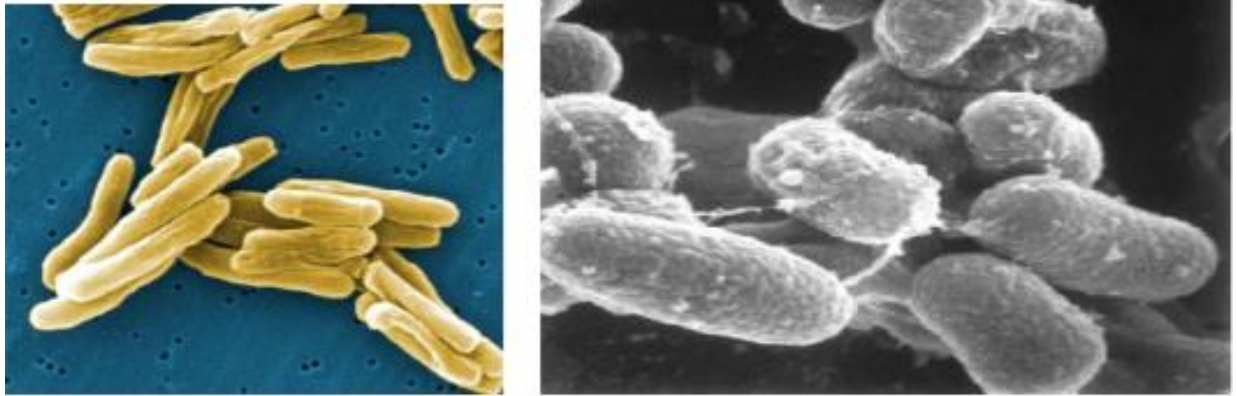


Рисунок 1 – Микобактерии туберкулеза: а – компьютерное изображение, б – снимок, сделанный с помощью сканирующего микроскопа
(Литусов Н.В., 2015)

Иногда они образуют нитевидные структуры, напоминающие мицелий грибов, что и послужило основанием для их названия: *mykes* - гриб и *bacterium* – бактерия (рисунок 2).

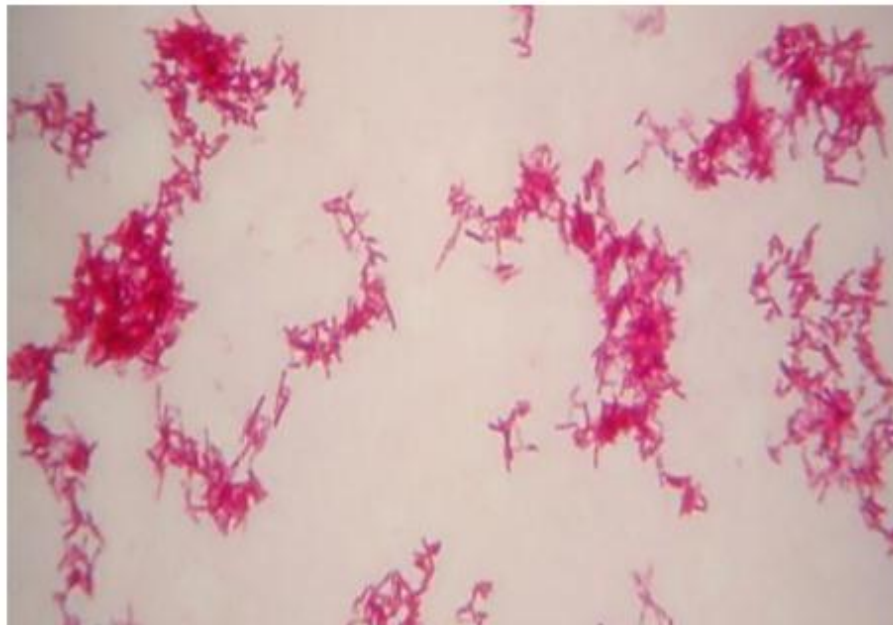


Рисунок 2 – Образование микобактериями нитевидных структур, напоминающих мицелий грибов (Литусов Н.В., 2015)

Неподвижные и не образующие спор, некоторые виды микобактерий могут вырабатывать каротиноидный органический пигмент, придающий им желто-оранжевый цвет [43, 47].

Основной морфологической характеристикой микобактерий является их чрезвычайно сложная клеточная оболочка. Оболочка микобактерий может составлять до 40% сухого веса бактерии [16]. Она состоит из внутреннего и наружного слоев, которые окружают плазматическую мембрану [22]. Растворимый наружный слой, так называемая капсула, в основном состоит из белков и липидов, в то время как нерастворимый внутренний слой состоит из трёх различных ковалентно связанных структур, т.е. миколовой кислоты, арабиногалактана, пептидогликана (рисунок 3). Этот комплекс относится к основному ядру клеточной стенки микобактерий [29], и он отвечает за целостность клеточной стенки и непроницаемость [16].

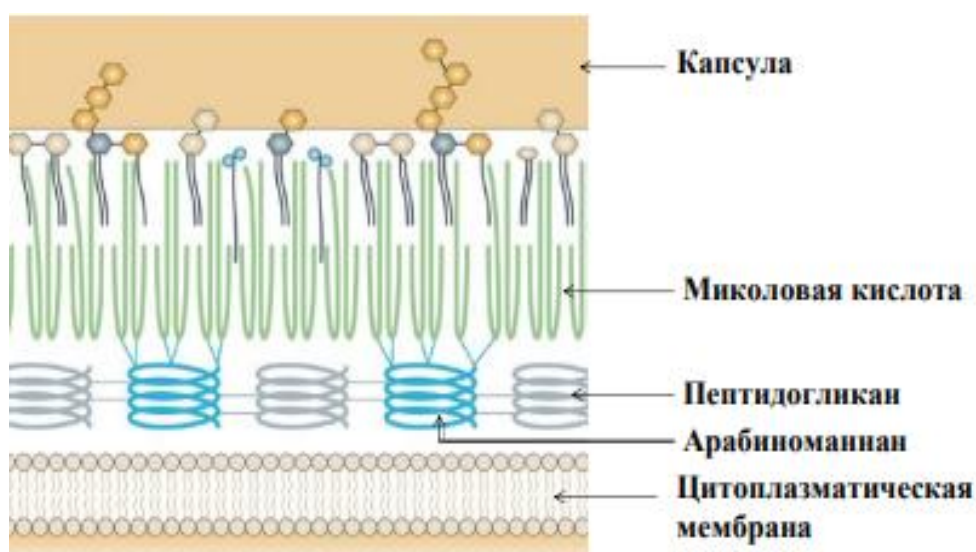


Рисунок 3 – Схематическое расположение капсулы и компонентов клеточной стенки микобактерий (Литусов Н.В., 2015)

Пептидогликан представляет собой первичный каркас клеточной стенки. Снаружи от пептидогликана располагается слой полисахаридов, представленный арабиногалактанами. Полисахаридный слой изнутри связан с пептидогликаном, а снаружи – с миколовыми кислотами. Миколовые кислоты представлены свободными сульфолипидами и корд-фактором. Слой внешних липидов называют микозидами (специфическими восками),

определяющими антигенные свойства микобактерий. Липоарабиноманнан закреплен на цитоплазматической мембране, пронизывает клеточную стенку и выходит на поверхность микробной клетки терминальными фрагментами (маннозными радикалами). Клеточная стенка пронизана порами, обеспечивающими транспорт веществ.

Высокое содержание липидов определяет спиртоустойчивость, щелочеустойчивость и кислотоустойчивость микобактерий, затрудняет окрашивание микобактерий обычными методами, обуславливает вирулентность и длительную сохраняемость микобактерий в окружающей среде. Кроме того, липиды экранируют бактериальную клетку, подавляют фагоцитоз, блокируют активность клеточных ферментов, а терминальные фрагменты липоарабиноманнана подавляют активацию Т-лимфоцитов и лейкоцитов.

Микобактерии являются грамположительными микроорганизмами, хотя при окраске по Граму они не прокрашиваются кристаллвиолетом. К группе грамположительных бактерий они относятся в связи с отсутствием внешней клеточной мембраны (рисунок 4) [22].

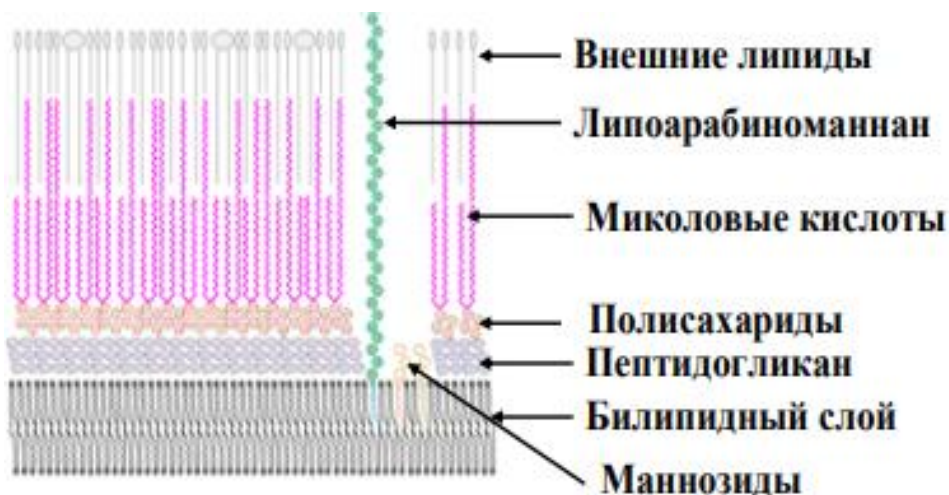


Рисунок 4 – Схематическое строение клеточной стенки микобактерий
(Литусов Н.В., 2015)

1.2. Туберкулезные микобактерии

Все микобактерии туберкулезного комплекса относят к одному виду или флотипу – *M. tuberculosis* (поскольку они имеют одни и те же характеристики генов 16 S-РНК), но их делят на ряд подвидов: собственно *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. caprae*, *M. pinnipedi*, *M. microti* и *M. canettii* [17, 32, 42].

1. *M. tuberculosis* поражает человека и ряд лабораторных животных, вызывая главным образом туберкулёз лёгких (но, хотя и реже, также другие формы заболевания).

2. *M. africanum* – также человеческий патоген, эндемичен для Африки южнее Сахары и вызывает типичный туберкулёз с относительно легким течением болезни.

3. *M. bovis* поражает преимущественно лимфатические железы кишечника и других органов у целого ряда домашних и диких животных, а также человека. У населения Европы около 10% всех туберкулезных заболеваний вызывается *M. bovis*; но при этом лишь в 5% случаев возникает туберкулёз легких. Человек заражается главным образом через молоко больных коров. Болезнь среди людей распространена повсеместно – где есть больной домашний скот, и где пьют сырое молоко. К тому же подвиду относится и вакцинный штамм БЦЖ с ослабленной вирулентностью, сообщающий нестерильный иммунитет. Благодаря широкому проведению вакцинации, этот штамм, начиная с 1925 г., расселился по всему миру. Изредка он является причиной лимфаденитов и других осложнений.

4. Подвиды *M. caprae* и *M. pinnipedi* были выделены соответственно от больных коз в Испании, и от тюленей.

5. *M. microti* вызывает заболевания полевок; штаммы впервые выделены в Англии. Существенного значения для медицины эти три подвида не имеют.

6. *M. canettii* является причиной заболеваний людей в Восточной Африке. Болезнь клинически соответствует легко протекающему

туберкулёзу, но встречается очень редко. Большое внимание, которое уделяют этому подвиду, объясняется его вероятной близостью к гипотетическому предку всех микобактерий, входящих в туберкулезный комплекс.

Почти все члены ТК относятся к микобактериям с замедленным ростом (сроки генерации близки к 24 ч); колонии на плотных средах появляются через 3–4 недели после посева, иногда позже. Колонии обычно морщинистые, сухие, плохо эмульгируются, беловато-серого цвета. Исключение составляет *M. canettii* с белыми, выпуклыми, мягкими колониями, вырастающими через 4–5 дней [39].

Как и другие микобактерии, члены ТК имеют в составе клеточной стенки большое количество липидов и жирных кислот, с чем связана их кислотоустойчивость. Будучи окрашены карболовым фуксином, они не обесцвечиваются даже после последующей обработки кислотой. Кислотоустойчивость является одной из причин ошибок в микробиологической диагностике туберкулёза, так как ряд других патогенных микобактерий (*M. avium* и близкие подвиды) в окрашенных мазках мокроты выглядят точно так же, как члены ТК. Это относится и к условно-патогенным микобактериям других видов (*M. kansasii*, *M. gordonae* и др.). Еще в 50-х годах прошлого века их иногда считали изменившимся возбудителем туберкулеза и называли атипичными штаммами [13]. В настоящее время их объединяют под аббревиатурой НТМБ [12, 48]. Еще одной характеристикой бактерий ТК, как и других микобактерий и актинобактерий в целом, является высокий GC-состав ДНК (62–70 мол. %).

Существует ряд лабораторных методов, позволяющих отличить *M. bovis* и близкие к нему подвиды – *M. microti*, *M. caprae*, *M. pinnipedi* и *M. africanum* – от собственно *M. tuberculosis*. Основные из этих методов – тесты на восстановление нитратов, а также образование и накопление в растущей культуре ниацина (оба теста дают положительный результат лишь в случае *M.*

tuberculosis). Изоляты *M. bovis*, кроме того, устойчивы к пипразинамиду (одно из распространенных противотуберкулезных лекарств).

1.3. Нетуберкулезные микобактерии

Нетуберкулезные микобактерии широко распространены в окружающей среде, как сапрофиты, но в некоторых случаях могут быть этиологическими факторами тяжелой (вплоть до смертельной) патологии. Их называют микобактериями окружающей среды (*enviromental micobacteria*), возбудителями микобактериозов, анонимными, оппортунистическими, атипичными микобактериями [1].

Микобактерии делятся на быстро- и медленно растущие. Медленно растущие микобактерии образуют хорошо заметные одиночные колонии более чем через 7 суток только при сохранении определенных условий, а именно: оптимальной температуры, богатой среды, использовании очень разбавленного посевного материала [2].

Важным отличием НТМБ от комплекса *M. tuberculosis* считалось то, что они практически не передаются от человека к человеку, однако этот факт в последнее время подвергается сомнению. Почва и вода являются естественным резервуаром обитания НТМБ, поэтому иногда их называют «микобактериями окружающей среды». Известно, что главным местом обитания *M. avium intracellulare* служат открытые водоемы. Из воды *M. avium* передается человеку воздушно-капельным путем, в результате естественного образования аэрозолей над поверхностью воды [20, 34].

В 1954 г. А. Timple и Е. Runyon предложили классификацию НТМБ, которую обычно называют классификацией Runyon и которая наиболее широко используется в настоящее время. Согласно этой классификации, НТМБ по скорости роста, морфологии колоний и способности к пигментообразованию делят на 4 основные группы.

I группа : фотохромогенные микобактерии – культуры приобретают желто-оранжевую окраску, если во время роста находились на свету. Представители: *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. ulcerans*.

- *M. kansasii* – имеет близкое генетическое родство с *M. Tuberculosis*, поэтому является причиной поражения легких, сходных с туберкулезом, реже поражаются печень, селезенка, суставы, лимфоузлы.

- *M. marinum* – описан как паразит рыб. У людей вызывает гранулематозные заболевания кожи рук и ног. Заражение происходит через воду.

- *M. ulcerans* – возбудитель кожных язв у жителей тропических стран. Вызываемые *M. ulcerans* и *M. marinum* поражения близки к лепре.

II группа : скотохромогенные микобактерии – культуры окрашены в ярко-оранжевые тона независимо от того, выращивались они на свету или в темноте. Представители: *M. scrofulaceum*, *M. aque*, *M. gordonae*, *M. flfl avescens*.

- *M. scrofulaceum* – имеет наибольшее значение в патологии человека. Эти микобактерии выделены при шейных и подчелюстных лимфаденитах у детей

III группа : нефотохромогенные микобактерии – культуры могут быть неокрашенными или иметь желтовато-оранжевые оттенки. Пигментация не зависит от экспозиции на свету. Представители: *M. avium*, *M. intracellulare*.

- *M. avium* (птичий) – наиболее распространенный вид среди атипичных микобактерий, вызывающих заболевания человека и животных. Является возбудителем легочных заболеваний людей.

- *M. avium* и *M. intracellulare* часто объединяют в комплекс *M. aviumintracellulare*, а также объединяют вместе с *M. scrofulaceum* в единый комплекс MAIS как три вида атипичных микобактерий, наиболее часто вызывающих заболевания человека. Представители комплекса MAIS вызывают три типа заболеваний: 1) шейные лимфаденопатии; 2)

прогрессирующие легочные поражения; 3) диссеминированные заболевания с вовлечением костей на фоне иммуносупрессивных состояний.

IV группа: быстрорастущие микобактерии – в течение 7 дней при 25 и 37 °С заканчивают рост, образуя зрелые колонии. Представитель – *M. fortuitum*.

- *M. fortuitum* – является причиной абсцессов, возникающих после инъекций лекарств и после хирургических вмешательств [7, 5].

Эта классификация используется микробиологами в практике, хотя в последнее время она постепенно утрачивает свое значение в связи с разработкой современных методов идентификации НТМБ (молекулярно-генетических, высокоэффективной жидкостной хроматографии). Кроме того, эта классификация не учитывает степень патогенности НТМБ и клинические проявления патологии, ими вызываемой. НТМБ демонстрируют широкий спектр патогенности: от НТМБ, которые редко бывают патогенными для человека, например, *M. gordonae*, до НТМБ, которые почти всегда вызывают заболевание, например, *M. ulcerans* или *M. kansasii* [10, 11].

Группировка микобактерий по степени патогенности для человека:

- Патогенные: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. leprae*;
- Потенциально патогенные: *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. xenopi*, *M. fortuitum*, *M. chelonai*;
- Сапрофиты: *M. gordonae*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. phlei*, *M. flfl avescens*, *M. gastri* [25].

1.4. Микобактериозы

Микобактериоз – инфекционное заболевание, вызываемое НТМБ с формированием в пораженных органах и тканях гранулематозного воспаления.

Принято считать, что микроорганизмы из аэрозолей, образующихся над водой и почвой, могут играть важную роль в возникновении респираторных заболеваний.

В то же время обосновано предположение о том, что поступление в организм человека возбудителя с пищей и водой является причиной диссеминированных форм МАС-инфекции с выраженной клиникой со стороны желудочно-кишечного тракта. Этот же источник инфекции играет основную роль и у детей с микобактериальными цервикальными лимфаденитами. Прямое инфицирование НТМБ из воды и других природных источников происходит также у пациентов с повреждениями кожи и мягких тканей [7, 24, 25, 27].

Несмотря на то что НТМБ широко распространены в окружающей среде, заболевания, причиной которых они являются, — относительно редкое явление. Это свидетельствует о том, что основных механизмов защиты хозяина достаточно для предотвращения инфицирования НТМБ. Пациенты, у которых развивается микобактериоз, вероятно, имеют специфические факторы восприимчивости, которые делают их уязвимыми для этих инфекций. Многие заболевания, связанные со структурным повреждением легких, такие как кистозный фиброз, бронхоэктатическая болезнь, хроническая обструктивная болезнь легких, предшествующие туберкулез и пневмокониоз, были признаны предрасполагающими факторами к заболеваниям легких, вызванных НТМБ [7, 19, 25, 28, 52].

Иммуносупрессивный статус, связанный, например, с ВИЧ-инфекцией, трансплантацией или использованием иммунодепрессантов, и другие, в первую очередь генетически обусловленные механизмы, способствуют развитию патологии, вызываемой НТМБ [28, 31, 36, 50].

В отличие от туберкулеза, передача НТМБ от человека к человеку считается маловероятной, хотя данные об этом типе передачи были зарегистрированы для пациентов с кистозным фиброзом, инфицированных *M. abscessus* [25].

Диссеминированные поражения, вызванные НТМБ, развиваются, как правило, у пациентов с нарушениями иммунитета, в первую очередь ВИЧ-инфицированных. Заболевания легких, лимфадениты, поражения кожи, подкожной клетчатки, костей и суставов свидетельствуют о том, что НТМБ могут являться этиологическим фактором самой разнообразной патологии человека [7, 23, 25, 35, 37, 46, 49].

В патологии, вызываемой разными видами НТМБ, МАС — это основные виды, вызывающие микобактериозы, особенно у ВИЧ-инфицированных лиц. МАС могут быть возбудителями поражения любых органов и тканей. В первую очередь это касается легочных микобактериозов и диссеминированных (генерализованных) поражений [7, 12, 38, 41].

Однако в настоящее время и другие виды НТМБ играют существенную роль (в большей или меньшей степени) в развитии микобактериозов у человека.

Так, среди медленнорастущих НТМБ *M. kansasii*, реже *M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. scrofulaceum*, *M. haemophilum* и ряд других являются этиологическими факторами заболеваний легких и других органов как у ВИЧ-инфицированных, так и у неинфицированных пациентов. *M. marinum*, *M. ulcerans* также часто вызывают поражения кожи [25, 26, 30, 38, 41].

Быстрорастущие микобактерии комплекса *M. abscessus* / *M. chelonae* (особенно *M. abscessus*), реже *M. fortuitum* / *M. peregrinum* вызывают самую различную патологию легких, костей и суставов, диссеминированные поражения и др. [18, 51, 33].

Описаны также микобактериозы, вызванные и другими видами НТМБ, что в первую очередь зависит от качества работы соответствующей лаборатории и настороженности врачей в отношении данной патологии [7, 25].

Кроме человека НТМБ вызывают различную патологию у животных. Вероятно, они могут подвергаться «трансмиссии» между внешней средой, особями «дикой природы», домашним скотом и людьми [24, 27].

1.5. Диагностика микобактериозов

В отличие от *M. tuberculosis*, выделение НТМБ из патологического материала не всегда свидетельствует об их безусловной этиологической значимости. Возможна случайная контаминация диагностического материала из окружающей среды или колонизация. Вместе с тем, поскольку результаты лечения также различаются в зависимости от вида НТМБ, точное определение их вида очень важно [12, 21, 25, 47].

Диагностика заболевания легких НТМБ требует от специалистов интеграции клинических, рентгенографических и микробиологических данных. Наиболее широко в мире используют диагностические критерии Американского торакального общества и Американского общества инфекционных заболеваний. Главным критерием в постановке диагноза микобактериоза служит многократное выделение одного и того же вида НТМБ из диагностического материала при отсутствии МБТ и наличии клинико-рентгенологических симптомов заболевания. Также диагноз может быть поставлен при однократном выделении НТМБ из материала, полученного в стерильных условиях (операционный материал, абсцесс, спинномозговая жидкость). Симптомы микобактериоза неспецифичны и часто возникают в условиях ранее существовавшего заболевания легких [25].

Выделение МАС, *M. abscessus*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. xenopi* и *M. szulgai* из респираторных образцов указывает на относительно высокую вероятность истинного заболевания легких, тогда как менее вирулентные виды, такие как *M. gordonae*, *M. terrae* и комплекс *M. fortuitum*, обычно являются контаминантами, а не возбудителями истинного заболевания легких, вызванного НТМБ [12, 46, 47].

Во всех случаях выделения НТМБ вместе с МБТ приоритет при лечении отдается последним. Дифференциальная диагностика микобактериоза и туберкулеза, в первую очередь с множественной и широкой лекарственной устойчивостью возбудителя, является особенно сложной [25, 45, 53].

Следует подчеркнуть, что при всей необходимости комплексной диагностики заболевания, вызванного НТМБ, ключевую роль играет идентификация вида микобактерий (микробиологическая, молекулярно-генетическая), разумеется, в сочетании с клинико-рентгенологическим исследованием [7, 25, 43, 47].

1.6. Распространённость микобактериозов

Статистические данные о заболеваемости микобактериозами в разных странах весьма разнообразны. В России статистика по заболеваемости микобактериозами до настоящего времени не представлена. Существуют лишь единичные работы по клинической характеристике микобактериозов.

В Онтарио, Канада, ежегодная частота выделения НТМ из респираторных образцов (исключая истинное заболевание) в последнее время колеблется от 14,1 до 22,2 на 100 000 населения [4]. Согласно одному исследованию, в 2010 году заболеваемость этой болезнью составляла 9,8 на 100 000 человек. За исключением *Mycobacterium gordonae*, *Mycobacterium avium complex* (МАС) был наиболее распространенным видом, выделенным из дыхательных путей и связанным с клинической инфекцией легких, за которым следовали *Mycobacterium xenopi* и быстрорастущие микобактерии [38].

В Орегоне, США, оценочная распространенность легочной болезни НТМБ составляла 8,6 на 100 000 человек [15]. Популяционное исследование, проведенное в том же штате, показало рост заболеваемости НТМБ с 4,8 на 100 000 в 2007 году до 5,6 на 100 000. в 2012 году [6]. В других частях страны с использованием лабораторного надзора, дополненного электронным

анализом медицинских карт в четырех системах здравоохранения, распространенность заболеваний легких, связанных с НТМБ, оценивается в 1,4-6,6 на 100 000 населения [9]. В 2007 году при использовании кодирования данных МКБ-9 (Международная классификация болезней, 9-й пересмотр) среди взрослых в возрасте ≥ 65 лет в США наблюдалась распространенность примерно 47 случаев на 100000, хотя имелась довольно выраженная разница в региональной распространенности легочной патологии НТМБ в разных регионах страны [14].

Информация, доступная в Центральной и Южной Америке, ограничена, что может привести к значительной предвзятости отбора, что ставит под сомнение совокупность данных.

По данным статистики, распространенность НТМБ заболеваний легких составляет примерно 1 на 100 000 или меньше. МАС обычно был наиболее распространенным видом, выделенным после *Mycobacterium kansasii* и RGM [15].

В Европе данные о распространенности и распространенности выделения НТМБ из образцов дыхательных путей были противоречивыми из-за различных методов исследования и различий в исходных изученных популяциях. Например, в Соединенном Королевстве, Греции и Нидерландах уровень изоляции НТМБ составляет около 2,9 на 100 000, 7,0 на 100 000 и 6,3 на 100 000, соответственно, а распространенность заболеваний легких, вызванных НТМБ, оценивается в 1,7 на 100 000 человек. 100 000, 0,7 на 100 000 и 1,4 на 100 000 соответственно. Для этого континента недавние данные также выявили заметную географическую изменчивость видов, изолированных от пациентов. ПДК чаще выделялись в Северной Европе (44% всех НТМБ), чем в Южной Европе (31% всех НТМБ), при этом *M. avium* в качестве преобладающего подвида *M. xenopi* чаще выделяли в южной части Европы (21% всех НТМБ), изолированные НТМБ по сравнению с Северной Европой (только 6%) [30].

В Африке в последнее время наблюдается энтузиазм по обнаружению НТМБ у пациентов с подозрением на туберкулез легких. Хотя в этих исследованиях не классифицировали заболевания легких НТМБ, их результаты показывают, что подгруппа пациентов с подозрением на туберкулез (3,7–15%) на самом деле может иметь НТМ- легочную болезнь [38].

В Азии не проводилось популяционное исследование эпидемиологии изолятов НТМБ легких и заболеваний легких НТМБ, которое дает глубокое понимание масштабов проблемы. Данные доступны из исследований, проведенных в нескольких странах и географических регионах Восточной Азии, особенно в Японии, Южной Корее, Индии, Китае, Таиланде и Тайване [41]. Исследование, проведенное в Японии, показало, что в 2005 году национальная распространенность НТМ-болезни легких составляла от 33 до 65 случаев на 100 000 населения. Основная роль ПДК в легочных изолятах НТМБ была также отмечена в большинстве других стран Восточной Азии [4]; другие часто выделяемые виды включают RGM и *M. kansasii*. *M. scrofulaceum* и *M. szulgai* также иногда наблюдались в респираторных образцах. В 2008 году исследование, проведенное на Тайване, показало, что распространенность заболевания составляет 7,94 на 100 000 госпитализированных пациентов, причем заболевание преобладает у пожилых людей [15].

В некоторых странах Азии, где кислотостойкий метод является основным методом диагностики туберкулеза, также существует опасение, что многие пациенты с диагнозом туберкулез, особенно с подозрением на лекарственно-устойчивый туберкулез, действительно могут иметь НТМ легочной патологии. который проверил устойчивость к изониазиду и рифампицину и 4% случаев туберкулеза в ретрите исследования из Китая, аналогично африканским данным [15]. Исследование, проведенное в Китае, показало, что в 3,4% образцов мокроты с положительной микроскопией мазка мокроты увеличивается MNT, особенно MAC [38].

В Австралии и Новой Зеландии было проведено несколько надежных популяционных исследований для изучения эпидемиологии изоляции и болезни НТМБ в легких. Самые последние данные показывают рост заболеваемости / распространенности (часто трудно отличить одно от другого), который достиг 3 случаев на 100 000 человек. МАС является наиболее часто выделяемым типом легочной НТМБ, связанным с легочной болезнью [9].

Таким образом, имеющиеся данные, в частности популяционные исследования, проведенные в Северной Америке, Европе и Австралии, указывают на продолжающийся рост распространенности легких изолятов НТМБ и заболеваний НТМБ на этих континентах. Исследования в некоторых странах и географических регионах Восточной Азии, таких как Япония, Южная Корея и Тайвань, подтвердили этот феномен [41].

НТМБ - это повсеместно распространенные организмы, обнаруженные в экологических источниках, включая питьевую и природную воду, а также почву и пыль. Люди могут вдыхать или поглощать НТМ в воде, аэрозолях или пыли. НТМБ довольно устойчивы к обычным дезинфицирующим средствам воды, таким как хлор [25].

Диагностика микобактериоза затруднена из-за отсутствия характерной клинической картины. Клинические симптомы микобактериоза дыхательной системы в целом неотличимы от туберкулеза. Также отсутствуют характерные рентгенологические и гистоморфологические признаки заболевания. Диагноз НТМБ при легочной патологии часто откладывается, поскольку симптомы неспецифичны и часто возникают при легочной патологии [17]. Кроме того, пациенты с радиологически минимальным заболеванием (например, одиночными или множественными узелками) могут быть полностью бессимптомными, а бронхоэктазы или узелки, которые приводят к диагнозу НТМБ, могут быть обнаружены только случайно путем скрининговых обследований [41].

1.7. Микроскопический метод

Метод микроскопического исследования мокроты является обязательным при выявлении больных туберкулезом легких и входит во все схемы обследования пациентов с целью выявления туберкулезной инфекции. Несмотря на то, что данный метод не позволяет определить вид выявленных микобактерий, его специфичность достигает 98% в странах с высокой распространенностью туберкулеза [2, 5].

Для обнаружения МБ в мазке методом микроскопии в 1 мл мокроты должно содержаться 5000–10000 МБ и более. Только часть больных выделяет достаточно большое количество МБ для диагностирования этим методом .

Однако этот метод позволяет выявить наиболее эпидемически опасную группу бациллярных больных, представляющих собой угрозу для общества.

Для определения морфологии клеток и их тинкториальных свойств, из части исследуемой колонии готовят мазок и окрашивают по методу Циэля-Нильсена.

Подготовка к анализу:

1. Предметное стекло перед исследованием должно быть тщательно вымыто и обезжирено смесью для обезжиривания предметных стекол.
2. Перед использованием фуксин Циля разводят в 10 раз дистиллированной водой (из расчета – к 1 мл фуксина добавляют 9 мл дистиллированной воды).
3. Приготавливают рабочий раствор метиленового синего, для этого растворяют 0,3 г хлорида метиленового синего в 100 мл дистиллированной воды.
4. Разжижают мокроту с использованием 2% N-ацетил-l-цистеина и 5-6% NaOH, а после центрифугируют.

Приготовление мазков:

1. На обезжиренное предметное стекло деревянной палочкой-аппликатором наносят 2-3 гнойных комочка, равномерно распределяя по центру.

2. Просушивают мазок на воздухе при комнатной температуре.

Фиксация достигается посредством несильного нагревания (примерно до 70°C) предметного стекла, которое для этого трижды проводят над пламенем спиртовки мазком вверх в течение 5 секунд.

После фиксации мазок окрашивают фуксином Циля в течении 4 мин. Обесцвечивают 25% раствором серной кислоты в течение 1-2 мин. Затем промывают водой и докрашивают 3-5 мин метиленовым синим.

Дальше приступают к микроскопированию с иммерсией в световом микроскопе (увеличение x100, окуляр x10). При качественной окраске карболовым фуксином в микобактериях туберкулеза можно обнаружить различное количество гранул более плотной окраски. Микроорганизмы, располагающиеся поодиночке, парами или в виде групп, хорошо выделяются на голубом фоне других компонентов препарата. Нередко в нативных препаратах бактериальные клетки могут располагаться в виде римской цифры V, встречаются изогнутые и извитые варианты [8].

1.8. Культуральный метод

Наиболее распространенным методом выявления микобактерий туберкулеза в нашей стране является культуральный метод. Это "золотой стандарт" бактериологической диагностики туберкулеза, так как чувствительность метода существенно выше микроскопического и дает возможность получить чистую культуру микобактерий для её последующей идентификации и исследования лекарственной устойчивости. Этот метод дает положительные результаты при наличии в исследуемом материале от 20 до 100 жизнеспособных микробных клеток в 1 мл. Однако он трудоемок и длителен в связи с тем, что микобактерии туберкулеза растут очень медленно и их обнаружение может быть зарегистрировано только через 3 недели культивирования [7, 19].

Для выделения микобактерий используется среда Левенштейна–Йенсена с добавлением яичной эмульсии.

Ход приготовления питательной среды:

- Размешать 37,24 г порошка в 600 мл дистиллированной воды.
- Прокипятить в течение 1 минуты до полного растворения агара.
- Стерилизовать автоклавированием при 1210С в течение 15 мин.
- Приготовить стерильно 1000 мл эмульсии яиц.
- После добавить к 1000 мл яичной эмульсии 600 мл основы среды.
- Тщательно перемешать и разлить в стерильные пробирки.
- Поместить пробирки в наклонном положении для формирования скошенной среды и прогреть (для коагуляции) при 850С в течение 45 мин.

Для разграничения *M. tuberculosis* и НТМБ все изоляты АФБ оценивают по темпам роста, морфологии колоний и пигментации, а также с помощью ПЦР [11].

1.9. Системы ВАСТЕС

Культуральная диагностика туберкулеза переживает в настоящее время принципиальные изменения, связанные с внедрением в практику полностью автоматизированных систем культивирования МБТ. Главное отличие этих методов - применение жидких питательных сред для культивирования с последующей радиометрической (ВАСТЕС 460), колориметрической (Mb-Vact, VactALERT) и люминесцентной детекцией роста (ВАСТЕС MGIT 960). Рост МБТ на жидкой питательной среде в этих системах удается обнаружить уже через 1 - 2 недели в зависимости от их исходного количества в диагностическом материале [30]. Частота выявления микобактерий так же несколько выше, чем на плотных питательных средах. Автоматизированные системы ВАСТЕС с использованием соответствующих флаконов, содержащих различные противотуберкулезные препараты, позволяют сократить время исследования лекарственной устойчивости микобактерий до 10 - 14 суток.

Из перечисленных автоматизированных систем наиболее эффективна в настоящее время система ВАСТЕС MGIT 960BD. Флаконы MGIT с жидкой

питательной средой 7Н9 содержат в придонной части под силиконом флуоресцентный индикатор, "погашенный" высокими концентрациями кислорода. При наличии роста микобактерий в процессе поглощения кислорода индикатор начинает светиться, регистрация флуоресценции в системе ВАСТЕС MGIT производится автоматически. Использование флаконов MGIT возможно и "вручную", тогда регистрацию свечения производят с помощью трансиллюминатора на флаконах MGIT составляет 11 суток.

Основным недостатком ВАСТЕС MGIT, как и других систем ВАСТЕС, является высокая стоимость оборудования (до 100000 долларов США) и флаконов с питательной средой - посев одной пробы диагностического материала стоит до 400 рублей [24].

1.10. Биологическая проба

Биопроба является еще одним методом выявления микобактерий. Для этого чувствительных к туберкулезу животных (чаще всего морских свинок) заражают патологическим материалом, взятым от больного, и в течение 3 месяцев наблюдают за их весом, поведением, местными изменениями. Если в течение этого срока животное не погибнет, его забивают. Морских свинок, забитых или погибших, обязательно вскрывают и оценивают туберкулезные изменения, произошедшие в их органах животных при развитии специфического процесса. Даже при отсутствии специфических изменений для подтверждения диагноза из лимфатических узлов, легких, печени, селезенки готовят мазки, которые окрашивают по Цилю-Нильсену. Кроме того, кусочки указанных органов гомогенизируют и высевают на питательные среды. В сомнительных случаях выполняют гистологическое исследование тканей. Чувствительность биологического метода выявления микобактерий высока (несколько клеток МБТ на пробу). Однако в последнее время появились сообщения о том, что результат биологического

исследования не всегда коррелирует с данными клинико-рентгенологического обследования [24].

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Взятие биоматериала

Сбор мокроты для исследования на микобактерии туберкулеза – весьма ответственный этап диагностической процедуры, от четкости проведения которого во многом зависит результат исследования.

Момент откашливания больным мокроты создается очень высокий риск воздушно-капельного распространения инфекции, поэтому этот процесс должен производиться в специально выделенном для этих целей отдельном помещении (пункте сбора мокроты), оснащенном бактерицидными лампами, средствами дезинфекции и вытяжной вентиляцией. Если такая возможность отсутствует, то собирать материал позволено в используемой только для сбора мокроты пустой комнате с открытыми окнами.

Сбор мокроты должен производиться в присутствии и при непосредственном участии медицинского работника, который, в первую очередь, помимо халата и шапочки должен быть в маске-респираторе, резиновых перчатках и резиновом фартуке. Он должен находиться за спиной больного, выбирая свое положение таким образом, чтобы направление движения воздуха было от него – к больному.

Для сбора мокроты используются специальные контейнеры, которые:

- должны быть изготовлены из ударостойкого материала;
- иметь плотно завинчивающиеся или герметически закрывающиеся крышки, не допускающие просачивания жидкости;
- объем контейнеров не должен превышать 20–50 мл, что вполне достаточно для проведения исследования;
- иметь широкое отверстие для сбора мокроты (не менее 35 мм в диаметре), чтобы пациент мог легко отделять мокроту внутрь контейнера, не подвергая загрязнению его наружную поверхность;
- контейнеры должны быть изготовлены из прозрачного материала, чтобы можно было оценить количество и качество собранной пробы, не открывая крышки;

- материал, из которого изготовлены контейнеры, должен легко подвергаться маркировке и надежно сохранять ее на всем протяжении периода хранения, транспортировки и проведения исследования

Наилучшим вариантом является использование для сбора мокроты одноразовых пластиковых прозрачных контейнеров объемом 20–50 мл.

При отсутствии возможности использовать одноразовые контейнеры применяются стеклянные флаконы, которые используются многократно после дезинфекции, мытья и стерилизации.

В случаях повторного использования во избежание лабораторного загрязнения диагностического материала лаборатория должна постоянно следить за качеством обработки флаконов для сбора мокроты.

Алгоритм действия лиц, ответственных за сбор мокроты:

1. Сбор мокроты проводим в день исследования утром натощак.
2. Маркируем контейнеры.
3. Оформляем направления в бактериологическую лабораторию.
4. Объясняем правила сбора мокроты пациенту.
5. Закрываем контейнер плотной крышкой.
6. Обрабатываем наружную поверхность контейнера салфеткой, смоченной в дезинфицирующем растворе.
7. Осматриваем собранную мокроту, упаковываем контейнер в металлический бикс.
8. Доставляем мокроту в бактериологическую лабораторию.
9. Моем руки.

Собранный материал необходимо как можно быстрее доставить в лабораторию на исследование. Срок хранения материала в нативном виде при комнатной температуре не должен превышать 24 часа. В период транспортирования биологический материал больного нужно защитить от воздействия прямых солнечных лучей и тепла.

2.2. Обработка нативного клинического материала

К образцам в 50 мл пробирках или контейнерах добавили реагент «Амплитуб-Преп» в пропорции 1:1, но не менее 1 мл. Содержимое пробирки перемешали до полной гомогенизации на орбитальном шейкере. Инкубировали при комнатной температуре в течение как минимум 1 часа. Одноразовой пастеровской пипеткой отобрали 1 мл разжиженного образца в 1,5 мл чистую пробирку. Центрифугировали 5 мин. при 10 000 об/мин. При выделении ДНК ручным методом после центрифугирования удалили надосадочную жидкость путем аспирации одноразовой пастеровской пипеткой, остаточный объем супернатанта составляет не более 0,2 мл.

2.3. Выделение ДНК

Для проведения молекулярного анализа нуклеиновых кислот, нужно, прежде всего, получить их в чистом виде. Если источником НК служит клинический образец, то необходимо подобрать оптимальные методы выделения, позволяющие получить максимальное количество высокочистого продукта.

Проведение выделения ДНК ручным методом:

В каждую партию выделения наряду с исследуемым материалом включают отрицательный контроль выделения (ОКО-В) (1 на 5 исследуемых образцов), который потом обязательно анализируется в ПЦР-РВ вместе с другими образцами. Это позволяет контролировать возможную контаминацию на этапе выделения ДНК.

Примечание: если при выполнении какой-либо операции во время выделения ДНК произошла «авария» (вытекла жидкость из какой-либо пробирки, капли раствора или образца попали на рабочую поверхность и т.д.), необходимо сменить перчатки и провести деконтаминационные работы!

I. Лизис

1. Приготовили пробирки с ОКО-В (1 ОКО-В на 4-5 образцов), промаркировали. Для этого в каждую пробирку ОКО-В добавили 200 мкл

ОКО-В из набора. Расставили пробирки с ОКО-В в соответствии с маркировкой между образцами (через 4-5 образцов).

Пример 1, 2, 3, 4, 5, ОКО-В1, 6, 7, 8, 9, 10, ОКО-В2

2. В пробирки с исследуемым материалом и ОКО-В добавили 500 мкл лизирующего раствора ЛР+ВПК Туб. Содержимое пробирок тщательно перемешали на микроцентрифуге-встряхивателе, кратковременно центрифугировали для сброса капель и поместили в термостат.

Сменили перчатки!

3. Приготовили пробирки для следующего этапа - сорбции ДНК. Промаркировали необходимое количество пробирок с сорбирующим раствором СР-ФС Туб.

4. Образцы с лизирующим раствором инкубировали в термостате при 75°C в течение 7-10 мин. , периодически перемешивая.

Примечание: во избежание вытекания жидкости при нагревании или образования «пузырей» для проведения лизиса использовали только качественные 1,5-2,0 мл пробирки, с плотно закрывающимися крышками (желательно с «замками»). Перед каждой установкой пробирок в термостат кратковременно центрифугировали для сброса капель!

5. Вынули пробирки из термостата и центрифугировали в течение 1 мин. на микроцентрифуге-встряхивателе для сброса капель.

II. Сорбция и осаждение ДНК

6. Содержимое пробирок с образцами (только жидкую фракцию) перенесли в подготовленные и промаркированные пробирки с сорбирующим раствором СР-ФС Туб одноразовой пастеровской пипеткой.

Сменили перчатки!

7. Добавили в каждую пробирку 500 мкл осаждающего раствора ОР Туб.

8. Тщательно перемешали содержимое пробирок до равномерного распределения сорбента, выдержали 5 мин. при комнатной температуре, периодически перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе.

9. Установили пробирки в высокоскоростную центрифугу «хвостиками» наружу (для образования осадка с одной стороны), при этом пробирки должны быть обязательно уравновешены. Центрифугировали в течение 5 мин. при 16000g.

10. Установили, пробирки в магнитный штатив на 1 мин. Аккуратно, удалили надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, не затрагивая сорбент.

11. Вынули пробирки из магнитов и переставили в обычные лунки.

III. Промывка ДНК

12. Добавили в пробирки 500 мкл промывочного раствора ПР Туб, перемешали содержимое пробирок на микроцентрифуге-встряхивателе до равномерного распределения сорбента.

Примечание: Возможно слипание сорбента! При проведении промывок стараться «разбить» сорбент, но избегать механических повреждений пробирок. Это может привести к «аварии»!

13. Центрифугировали пробирки в течение 1-2мина микроцентрифуге-встряхивателе.

14. Установили пробирки в магнитный штатив на 1 мин. Аккуратно удалили надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, не затрагивая сорбент.

15. Вынули пробирки из магнитов и переставили в обычные лунки.

16. Добавили в пробирки 500 мкл промывочного раствора ПР Туб, перемешали содержимое пробирок на микроцентрифуга-встряхиватель до равномерного распределения сорбента.

17. Центрифугировали пробирки в течение 1-2 мин. на микроцентрифуге-встряхивателе.

18. Установили пробирки в магнитный штатив на 1 мин. Аккуратно удалили надосадочную жидкость с помощью вакуумного отсасывателя, не затрагивая сорбент.

19. Установили пробирки с открытыми крышками в термостат.

Сменили перчатки!

20. Приготовили чистые 1.5 мл пробирки для следующего этапа (десорбции ДНК). Промаркировали.

21. Выдержали пробирки с образцами с открытыми крышками в термостате в течение 7-10 мин. при температуре 75 °С для удаления остатков промывочного раствора ПР Туб.

22. Через 7 мин. начали проверку пробирок с образцами на степень высушивания. Для этого каждую пробирку сначала закрыли, затем вынули из термостата и проверили сорбент. Если сорбент отходит от стенок пробирки, значит он высушен. Если сорбент не отходит от стенок пробирки, проверяем на наличие паров спирта. Если чувствуется запах спирта, то пробирку снова устанавливаем в термостат для продолжения сушки до 10-12 мин.

IV. Десорбция ДНК

23. Добавили в пробирки с высушенным сорбентом 200 мкл элюирующего раствора ЭР Туб, перемешивали содержимое пробирок на микроцентрифуге-вортексе до равномерного распределения сорбента.

24. Центрифугировали пробирки кратковременно для сброса капель и установили в термостат.

25. Выдержали пробирки в термостате в течение 10 мин. при температуре 75°С, периодически перемешивая на микроцентрифуге-встряхивателе.

26. Центрифугировали пробирки в течение 2 мин. на микроцентрифуге-встряхивателе.

27. Установили в магнитный штатив на 1 мин.

28. Аккуратно, не затрагивая магнитный сорбент, перенесли 120 мкл раствора ДНК в чистые пробирки в соответствии с маркировкой.

Примечание: Если некоторое количество магнитного сорбента было перенесено вместе с раствором ДНК, перед постановкой ПЦР необходимо пробирки с образцами установить на 1-2 мин. в магнитный штатив во

избежание попадания магнитных частиц в пробирки с ПЦР-смесью и ингибирования реакции ПЦР.

2.4. Методика проведения ПЦР

Полимеразная цепная реакция – это метод, имитирующий естественную репликацию ДНК и позволяющий обнаружить единственную специфическую молекулу ДНК в присутствии миллионов других молекул.

Суть метода заключается в многократном копировании (амплификации) в пробирке определенных участков ДНК в процессе повторяющихся температурных циклов. На каждом цикле амплификации синтезированные ранее фрагменты вновь копируются ДНК-полимеразой. Благодаря этому происходит многократное увеличение количества специфических фрагментов ДНК, что значительно упрощает дальнейший анализ. В основе ПЦР лежит обычная биохимическая реакция синтеза, катализируемая ферментом ДНК-полимеразой.

Ключевым компонентом реакции, помимо Taq-ДНК-полимеразы, являются короткие (20–30 нуклеотидов) искусственно синтезированные олигонуклеотиды – праймеры, комплементарные искомым участкам на левой и правой границах матричной ДНК. Праймеры выполняют ряд важных функций при проведении ПЦР:

1. праймеры являются точкой инициации синтеза новой цепи ДНК,
2. достраивание новой цепи ДНК протекает только между ними,
3. гибридная двуцепочечная система ДНК-праймер является местом присоединения ДНК-полимеразы к матрице.

ПЦР проводят в специальном программируемом термостате – амплификаторе, осуществляющем смену температурных циклов по заданной программе. Основным компонентом ДНК-амплификатора является элемент Пэльтье, способный осуществлять быстрые температурные переходы. Каждый цикл ПЦР состоит из трех этапов (денатурация, отжиг, элонгация).

Этапы ПЦР:

1. Этап денатурации. Обычно, для денатурации (разрушения водородных связей и расхождения цепей ДНК) при 94°C достаточно 20-30 сек (отдельные авторы рекомендуют использовать 1-5 мин при ПЦР длинных фрагментов >5000 п.н.), но условия зависят от используемых пробирок и амплификатора. Если температура денатурации слишком низкая, не полностью денатурированная ДНК «схлопывается», что препятствует отжигу праймеров.

2. Этап отжига праймеров. При наличии в пробе искомого участка ДНК происходит присоединение (отжиг) праймеров (по одному на каждую цепь). Температура присоединения праймеров составляет в зависимости от их нуклеотидного состава 58–70°C. В большинстве случаев температура отжига праймеров подбирается эмпирически. Выбор температуры отжига праймеров, возможно, один из самых ключевых факторов для обеспечения высокоспецифичной ПЦР.

Если температура окажется завышенной, отжиг не будет происходить, если будет занижена - резко увеличится неспецифический отжиг. Если праймер имеет 3'-концевую область, имеющей гомологию к какому-то другому участку на матрице, праймер, вне зависимости от того, специфически он отжигается или нет, будет читаться с этой 3'-концевой области. При низкой температуре возможен и такой вариант, когда праймер гибридизуется без участия 3'-конца и в таком случае чтение с праймера проходить не будет. Праймер-димеры образуются, если праймеры имеют одно или более комплементарных оснований на 3'-конце, так, что становится возможным комплементация между двумя 3'-концами двух праймеров.

3. Этап элонгации (синтеза). При подъеме температуры до 72°C активируется Taq-ДНК-полимераза и начинается этап синтеза, заключающийся в присоединении дезоксинуклеотид-трифосфатов и достраивании фрагмента ДНК. Чтение с праймеров нормально проходит при 72°C - температурном оптимуме для Taq-полимеразы. Обычно, 20 сек вполне

достаточно для эффективного синтеза 500 п.н. и 40 сек - для фрагмента 1.2 т.п.н. Однако, время реакции может меняться в зависимости от используемого фермента и величины получаемого фрагмента (например, Taq-полимераза присоединяет 60-200 оснований в секунду при 72 °С).

Перед началом циклического процесса проводят предварительную денатурацию. Очень важно, чтобы ДНК, которая выступает в качестве матрицы, была полностью денатурирована. Обычно нагрева до 94°С или 95°С в течении 4 минут достаточно для полного разделения цепей ДНК.

Число циклов. В условиях оптимальной реакции для выявления целевой последовательности ДНК, достаточно не более 40 циклов амплификации, чтобы без труда визуализировать в геле с этидиум бромидом полученный в ходе ПЦР продукт. В большинстве же случаев достаточно всего 25-30 циклов. Следует помнить, что с увеличением числа циклов идет накопление неспецифического продукта. В большинстве случаев, минимальным числом копий, дающих стабильно воспроизводимый результат в ходе ПЦР служит 100 - 1000 копий ДНК- матрицы.

Конечная элонгация. Обычно, после последнего цикла, реакцию смесь инкубируют дополнительно в течении 5-15 мин при 72 °С для достройки частично достроенных продуктов.

Образовавшиеся в первом цикле амплификации новые цепи ДНК служат матрицами для второго цикла амплификации, в котором происходит образование искомого специфического фрагмента ДНК (ампликона). С каждым последующим циклом количество копий участка ДНК удваивается.

В результате 30–40 циклов в растворе накапливается около 100 миллионов молекул ампликона. Этого количества достаточно для визуальной детекции этого фрагмента методом электрофореза в агарозном геле, содержащем бромистый этидий. Реальное значение эффективности отдельных циклов амплификации составляет по некоторым данным 78-97%.

ПЦР смесь. Для проведения реакции амплификации необходимо приготовить реакцию смесь и внести в нее анализируемый образец ДНК.

При этом важно учитывать некоторые особенности отжига праймеров, так как в анализируемом биологическом образце присутствуют разнообразные молекулы ДНК, к которым используемые в реакции праймеры имеют частичную, а в некоторых случаях значительную, гомологию. Кроме того, праймеры могут отжигаться друг с другом, образуя праймер-димеры. И то, и другое приводит к значительному расходу праймеров на синтез побочных (неспецифических) продуктов реакции и, как следствие, значительно уменьшает чувствительность системы. Это затрудняет или делает невозможным учет результатов реакции при проведении электрофореза.

Методика проведения ПЦР:

1. Подготовили все необходимые реагенты для проведения ПЦР.
2. В стерильной пробирке смешали компоненты в следующих соотношениях (таблица 1):

Таблица 1 - Соотношение компонентов ПЦР-реакции

Компонент	Конечная концентрация	Количество компонента на 50 мкл смеси
10x ПЦР-буфер	1x	5 мкл
10мМ смесь дНТФ	0.2 мМ каждого	1 мкл
Праймер 1 (50 мкМ)	1 мкМ	1 мкл
Праймер 2 (50 мкМ)	1 мкМ	1 мкл
Тaq-ДНК-полимераза	1.25 ед	0.5 мкл

ДНК-матрица	0.1 – 1 мкг	Варьирует от концентрации образца
Деионизированная вода	-	до 50 мкл

3. Установили амплификационный цикл в приборе:

- Предварительная денатурация, 94°C – 4 мин;
 - Денатурация, 94 °C – 20-60 сек;
 - Отжиг праймеров, 37-68 °C – 20-60 сек;
 - Элонгация, 72°C – 20-60 сек;
- } кол-во циклов 20-40
- Конечная элонгация при 72 °C – 5-15 мин.

2.5. Электрофорез ДНК

Электрофорез в полиакриламидном и агарозном геле – метод разделения фрагментов ДНК, различающихся по длине или особенностям конформационной структуры.

Суть метода – разделение заряженных молекул на основе их подвижности в электрофоретическом поле. Отрицательно заряженные фрагменты ДНК движутся к положительно заряженному электроду (аноду). Чем меньше размер фрагмента, тем быстрее он движется (при окраске геля – полоска ближе к аноду). Скорость движения фрагмента ДНК зависит также от особенностей пространственной конфигурации молекулы. Гель представляет собой трехмерную сетку, образованную длинными полимерными молекулами.

Приготовление агарозного геля для электрофореза: взвесили 1 г агарозы, добавили 100 мл 1x TAE, нагрели в микроволновой печи до полного расплавления агарозы. Охладили смесь до 50°C. Добавили к раствору агарозы

20 мкл бромистого этидия и осторожно перемешали, избегая появления в геле пузырьков воздуха.

Приготовление конц. буфер TAE (трис, ацетат, ЭДТА) для агарозного гель-электрофореза: на 1 л 50x TAE: трис – 242 г; ледяная уксусная кислота – 57 мл; 0,5 М ЭДТА, рН8,0 – 100 мл; H₂O до 1 л. Хранили при комнатной температуре на столе в чистой посуде. Для получения рабочей концентрации 50x буфер разводили в дистиллированной воде в соотношении 1:50.

Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3.1. ПЦР диагностика бактерий вида *Mycobacterium tuberculosis*

Результат №1.

При первой постановке ПЦР мы подбирали оптимальный объем реакционной смеси для получения положительного результата на микобактерии.

Поэтому в 1 и 2 образцы мы раскапывали по 20 мкл (ПЦР смесь) и 10 мкл ДНК, в 3 образец: 20 мкл (ПЦР смесь) + 5 мкл ДНК, в 4, 5 и 6 образцы: 25 мкл (ПЦР смесь) + 10 мкл ДНК.

ПЦР смесь: 5 мкл полимеразы + 2,5 мкл праймер 1 и 2,5 мкл праймер 2.

ПЦР протокол:

Цикл 1 (x1)

- 1 шаг (95°C - 5 мин)

Цикл 2 (x40)

- 1 шаг (94°C - 15 сек)

- 2 шаг (55°C - 15 сек)

- 3 шаг (72°C - 30 сек)

В лунки агарозного геля при электрофорезе вносилось по 5 мкл.

Условия проведения электрофореза: 30 мин, 80Вт, 130В, гель 1,5% агарозный.

На электрофореграмме в образцах под номером 1-6 наблюдалось присутствие размазанных туманных полос ДНК (шмер), что могло быть связано с неоптимальными условиями ПЦР (рисунок 5).

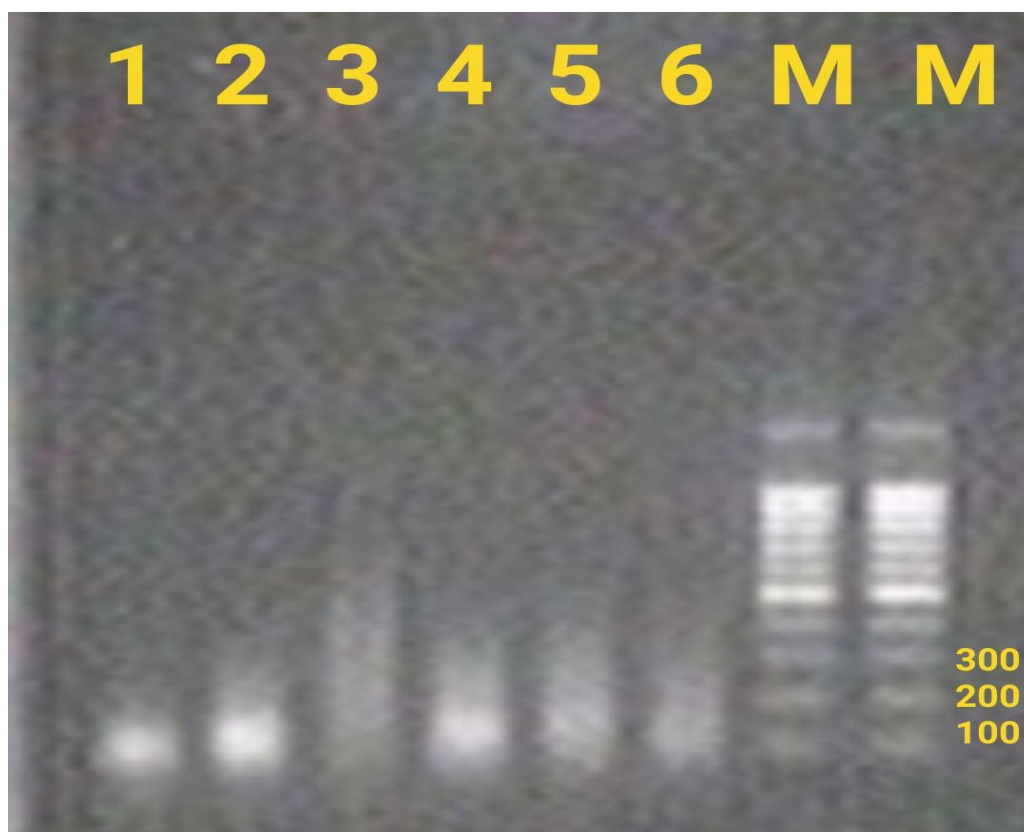


Рисунок 5 - Электрофореграмма результатов амплификации

Результат №2.

В ходе второй постановки ПЦР мы увеличили количество образцов и изменили условия проведения электрофореза.

ПЦР-смесь рассчитана на 13 образцов:

- H₂O – 5 мкл
- ScrMix – 5 мкл
- Праймер 1 – 2,5 мкл
- Праймер 2 – 2,5 мкл
- ДНК - 5 мкл

ПЦР протокол:

Цикл 1(x1)

- 1 шаг (95°C - 5 мин)

Цикл 2 (x40)

- 1 шаг (94°C - 15 сек)

- 2 шаг (55°C - 15 сек)
- 3 шаг (72°C - 30 сек)

В лунки агарозного геля при электрофорезе вносилось по 5 мкл.

Условия проведения электрофореза: 50 мин, 80Вт, 130В, гель 1,2% агарозный.

В результате проведения электрофореза мы получили неудовлетворительный результат, который характеризуется наличием шмер и крайне низким выходом продукта. Возможно это связано с недостаточно оптимальными условиями ПЦР, либо с загрязнением выделенной нами повторно ДНК, т.е. образец мокроты недостаточно длительное время выдерживался в растворе Амплитуб для предобработки и клеточная стенка микобактерий не расщепилась должным образом (рисунок 6).



Рисунок 6 - Электрофореграмма результатов амплификации

Результат №3.

При постановке ПЦР мы уменьшили количество образцов до 2-х, для экономии реагентов; изменили условия проведения ПЦР, а именно: поменяли температуру отжига праймеров с 55°C на 56°C, и продолжительность времени этапа элонгации с 30с на 40с; увеличили количество ПЦР смеси и концентрацию ДНК.

ПЦР-смесь с расчётом на 3 образца, но раскапывали на 2:

- H₂O – 5 мкл
- ScrMix – 5 мкл
- Праймер 1 – 2,5 мкл
- Праймер 2 – 2,5 мкл
- ДНК – 10 мкл

Протокол ПЦР:

Цикл 1 (x1)

- 1 шаг (95°C - 5 мин)

Цикл 2 (x40)

- 1 шаг (94°C - 15 сек)
- 2 шаг (56°C - 15 сек)
- 3 шаг (72°C - 40 сек)

В лунки агарозного геля при электрофорезе вносилось по 5 мкл.

Условия проведения электрофореза: 50 мин, 80Вт, 130В, гель 1,2% агарозный

В результате на электрофореграмме в образцах под номером 1 и 2 мы получили более специфичные фрагменты, но требуется дальнейшее выполнение работы для получения более высокой специфичности (рисунок 7).

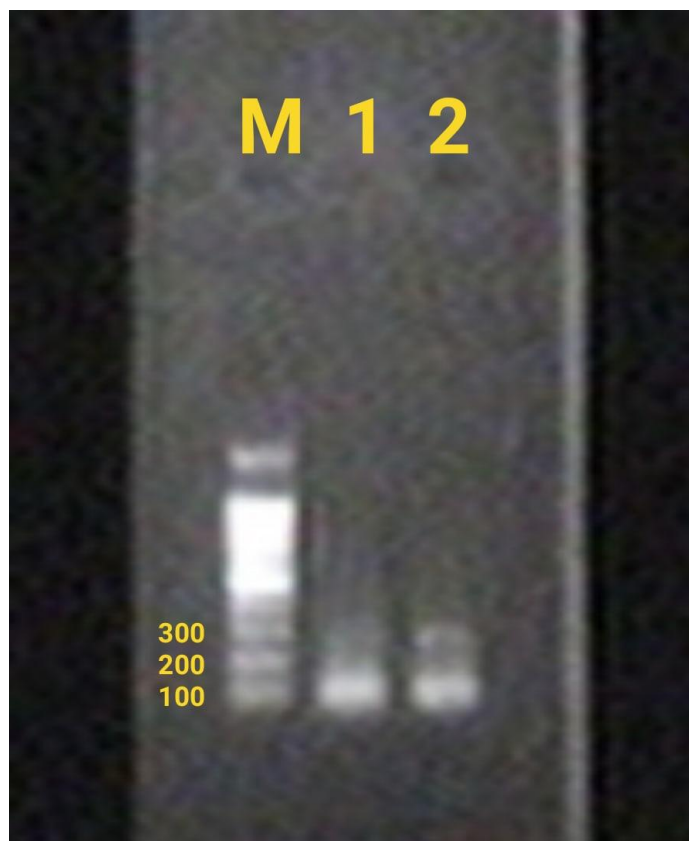


Рисунок 7 - Электрофореграмма результатов амплификации

Результат №4.

Условия постановки ПЦР мы оставили такие же что и в прошлом эксперименте.

ПЦР-смесь рассчитана на 5 образцов, но раскапывали на 4:

- H₂O – 5 мкл
- ScrMix – 5 мкл
- Праймер 1 – 2,5 мкл
- Праймер 2 – 2,5 мкл
- ДНК – 8 мкл.

Протокол ПЦР:

Цикл 1 (x1)

- 1 шаг (95°C - 5 мин)

Цикл 2 (x40)

- 1 шаг (94°C - 15 сек)

- 2 шаг (56°C - 15 сек)
- 3 шаг (72°C - 40 сек)

В лунки агарозного геля при электрофорезе вносилось по 5 мкл.

Условия проведения электрофореза: 50 мин, 80Вт, 130В, гель 1,2% агарозный.

На электрофореграмме в образцах под номером 7, 10, 30 мы получили такие же специфичные фрагменты, как при предыдущей постановке ПЦР. В образце под номером 32 наблюдалось отсутствие продукта амплификации, хотя в предыдущих постановках ПЦР продукт амплификации в образце под номером 32 наблюдался. Возможно это связано с недостаточным количеством добавленной ДНК матрицы в ПЦР смесь. Результат нельзя считать удовлетворительным (рисунок 8).



Рисунок 8 - Электрофореграмма результатов амплификации

Результат №5

При постановке ПЦР мы увеличили количество ПЦР смеси, и температуру этапа элонгации - с 72°C на 73°C, и уменьшили количество циклов (36 циклов).

ПЦР-смесь рассчитана на 5 образцов:

- H₂O – 8 мкл
- ScrMix – 8 мкл
- Праймер 1 – 2,5 мкл
- Праймер 2 – 2,5 мкл
- ДНК – 10 мкл

Протокол ПЦР:

Цикл 1 (x1)

- 1 шаг (94°C - 5 мин)

Цикл 2 (x36)

- 1 шаг (94°C - 15 сек)
- 2 шаг (56°C - 15 сек)
- 3 шаг (73°C - 40 сек)

В лунки агарозного геля при электрофорезе вносилось по 5 мкл.

Проводили ПЦР с горячим стартом (Hot start) для избежания неспецифики.

Условия проведения электрофореза: 50 мин, 80ВТ, 135В, гель 1,2% агарозный

В образце под номером 9 наблюдается яркая размытая полоса (шмер), в образце под номером 10 отсутствует продукт амплификации, в образцах под номер 30 и 31 присутствуют неспецифические полосы, в образце под номер 35 наблюдается едва заметная полоса на уровне 100 п.н. соответствующая специфичному отжигу праймеров (рисунок 9).

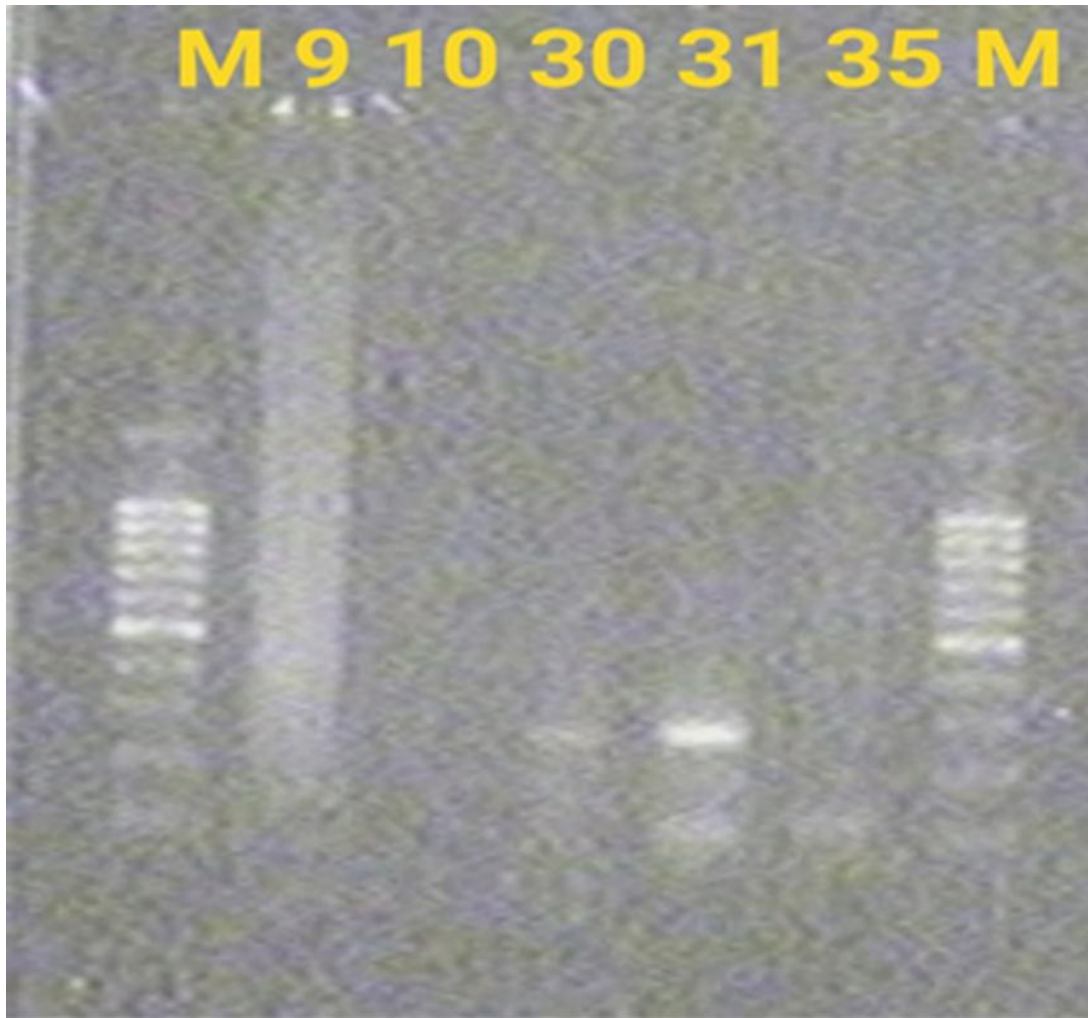


Рисунок 9 - Электрофореграмма результатов амплификации

Результат №6.

Мы сделали разные объемы ПЦР смеси, для повышения эффективности проведения ПЦР.

1. ПЦР смесь рассчитана на 5 образцов:

- H₂O – 40 мкл
- ScrMix – 40 мкл
- Праймер 1 – 12,5 мкл
- Праймер 2 – 12,5 мкл

Добавляли 10 мкл ДНК в 1 пробирку

2. ПЦР смесь рассчитана на 5 образцов:

- H₂O – 25 мкл

- ScrMix – 25 мкл
- Праймер 1 – 12,5 мкл
- Праймер 2 – 12,5 мкл

Добавляли 10 мкл ДНК в 1 пробирку

Протокол ПЦР:

Цикл 1 (x1)

- 1 шаг (94°C - 5 мин)

Цикл 2 (x37)

- 1 шаг (94°C - 15 сек)
- 2 шаг (57°C - 15 сек)
- 3 шаг (72°C - 40 сек)

В лунки агарозного геля при электрофорезе вносилось по 5 мкл.

Проводили ПЦР с горячим стартом (Hot start) для избежания неспецифики.

На электрофореграмме наилучший результат получен в образце под № 9(2), выход продукта которого соответствует 100 п.н., что характеризует наличие бактерии вида *Mycobacterium tuberculosis*. В образцах под № 10(1), 35(2), 31(2), 30(2), 10(2) присутствовали неспецифические полосы, а в остальных образцах полоса продукта отсутствует. Возможно это связано с неспецифической амплификацией (рисунок 10).

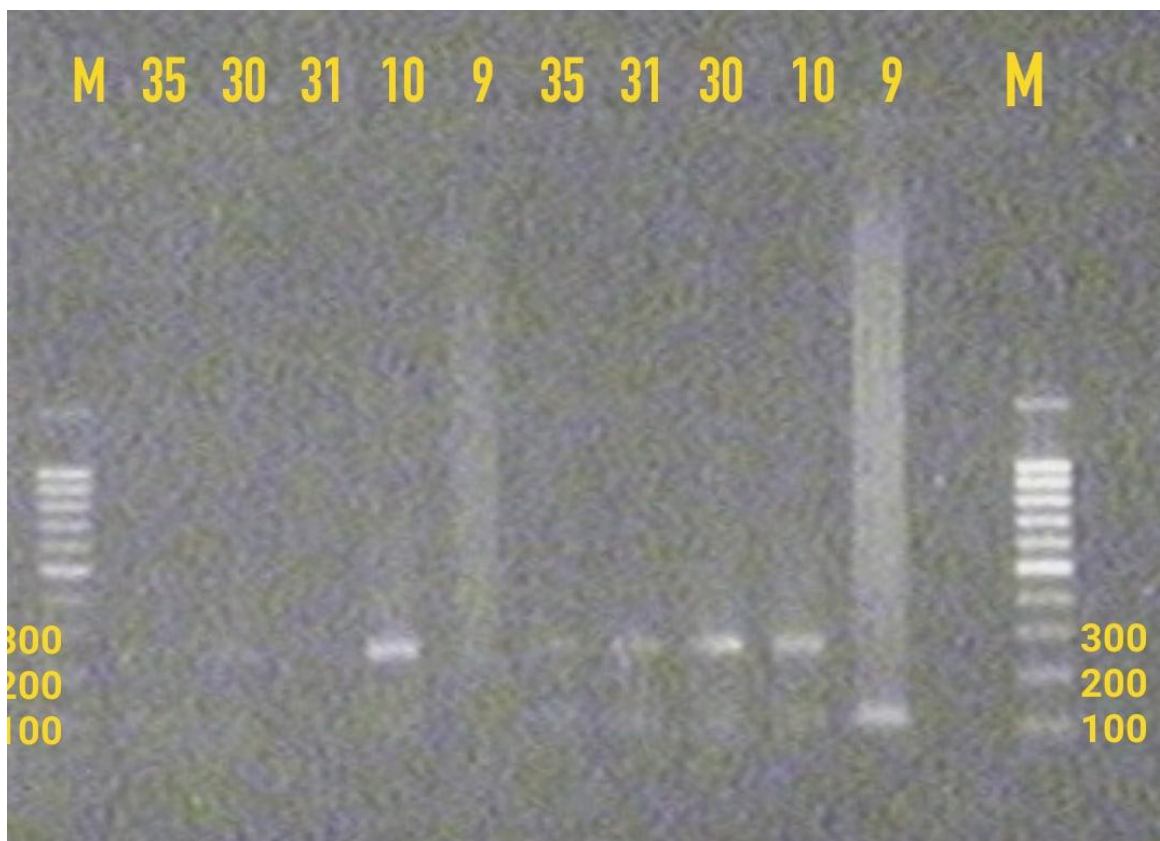


Рисунок 10 - Электрофореграмма результатов амплификации

Результат №7

ПЦР смесь рассчитана на 4 образца:

- ДНК – 7 мкл на 1 пробирку
- H₂O – 32 мкл
- ScrMix – 20 мкл
- Праймер 1 – 10 мкл
- Праймер 2 – 10 мкл

Протокол ПЦР:

Цикл 1 (x1)

- 1 шаг (95°C - 5 мин)

Цикл 2 (x40)

- 1 шаг (94°C - 15 сек)
- 2 шаг (57°C - 15 сек)
- 3 шаг (72°C - 40 сек)

В лунки агарозного геля при электрофорезе вносилось по 6,5 мкл образца.

На электрофореграмме наилучший результат получен в образце под №9, в образцах 10 и 31 наблюдаются неспецифические полосы, в 35 образце полное отсутствие продукта амплификации (рисунок 11).

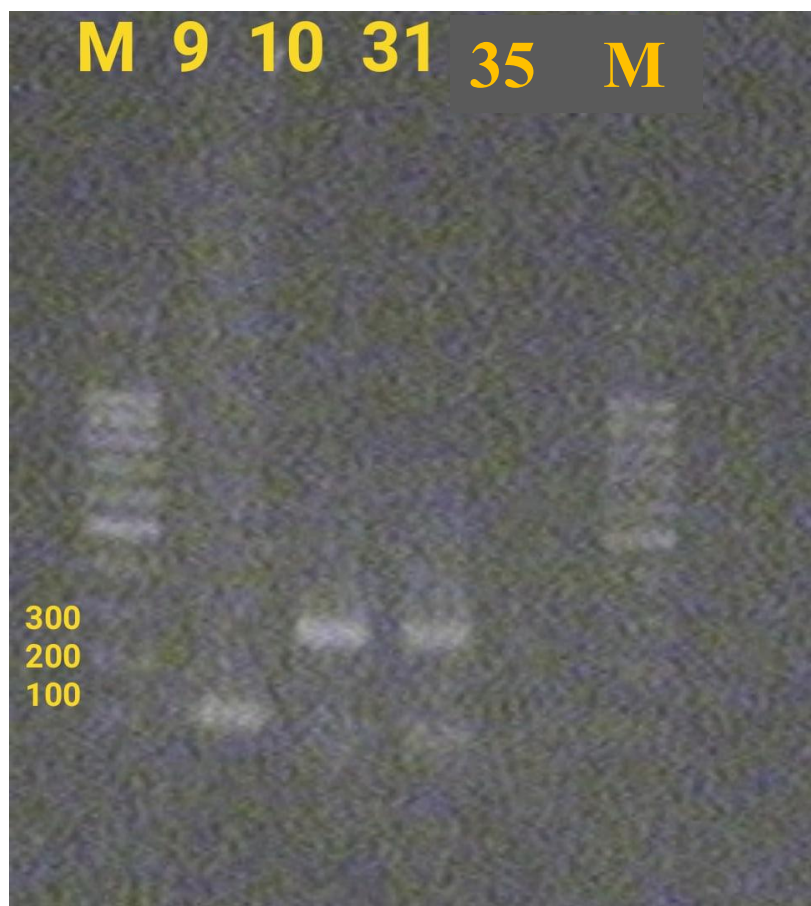


Рисунок 11 - Электрофореграмма результатов амплификации

Результат №8

Пробовали делать ПЦР из собственного буфера.

ПЦР смесь рассчитана на 1 образец:

- H₂O – 13,3
- ПЦР буфер – 2 мкл
- MgCl – 1 мкл
- Fw Праймер – 1 мкл

- R_w Праймер – 1 мкл
- dNTP 10x – 0,5 мкл
- Таq-полимераза – 0,2 мкл

ПЦР смесь рассчитана на 5 образца:

- H₂O – 66,5 мкл
- ПЦР буфер – 10 мкл
- MgCl – 5 мкл
- F_w Праймер – 5 мкл
- R_w Праймер – 5 мкл
- dNTP 10x – 2,5 мкл
- Таq-полимераза – 1 мкл

ДНК добавляли по 2 мкл, смесь добавляли по 19 мкл.

ДНК смешивали с краской, 6 мкл ДНК + 1 мкл краски.

Протокол ПЦР:

Цикл 1 (x1)

- 1 шаг (95°C - 5 мин)

Цикл 2 (x40)

- 1 шаг (94°C - 15 сек)
- 2 шаг (57°C - 15 сек)
- 3 шаг (72°C - 40 сек)

Полоса с продуктом амплификации 9 образца на электрофореграмме присутствует на уровне 100 п.н.. В образцах под номером 10,30,31 и 35 на электрофореграмме видны едва заметные полосы продукта амплификации на уровне менее 100 п.н. (рисунок 12).

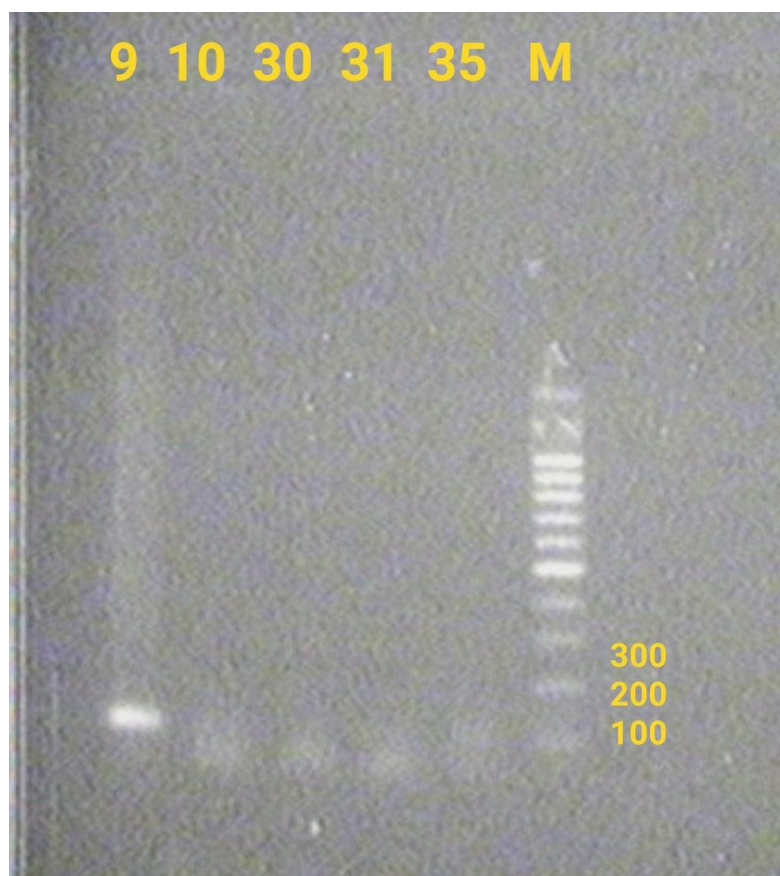


Рисунок 12 - Электрофореграмма результатов амплификации

Результат №9

При следующей постановке ПЦР мы снова увеличили количество добавляемой в смесь ДНК с 7 мкл до 10 мкл в попытке дополнительно повысить уровень выхода пцр продукта. Для увеличения специфичности амплификации была проведена модифицированная форма ПЦР (ПЦР с горячим стартом).

ПЦР-смесь:

- H₂O – 85 мкл
- ScgMix – 85 мкл
- Праймер 1 – 42,5 мкл
- Праймер 2 – 42,5 мкл
- ДНК – 10 мкл

Протокол ПЦР:

Цикл 1 (x1)

- 1 шаг (95°C - 5 мин)

Цикл 2 (x40)

- 1 шаг (94°C - 15 сек)

- 2 шаг (56°C - 15 сек)

- 3 шаг (72°C - 40 сек)

Условия проведения электрофореза: 50 мин, 80Вт, 135В, гель 1,2% агарозный.

После проведения амплификации были получены удовлетворительные результаты, позволяющие утверждать о том, что в образцах под номером 3,4,5,6,7,8 и 10 присутствовали бактерии вида *Mycobacterium tuberculosis* выход продукта пцр соответствует молекулярной массе в 100 п.н. Не смотря на то, что в образцах под номером 3,4,5,6,7,8 и 10 на ряду со специфическим отжигом в 100 п.н., который характерен последовательности ДНК бактерии вида *M. tuberculosis*, наблюдается и некоторый не характерный отжиг в области 200 и 300 п.н. Причиной данного явления, может быть, как димеризация праймеров, так и их неспецифичность. Так же причиной может являться не оптимальная концентрация компонента PCR буфера $MgCl_2$, либо не оптимальный pH Tris Cl.

В образцах под номером 1, 2 и 9 нет однозначного ответа свидетельствующего о наличии или отсутствии бактерии вида *Mycobacterium tuberculosis* в связи с присутствием неспецифического отжига продукта. Следует отметить, что наилучший выход продукта амплификации полностью соответствующий молекулярной массе амплифицируемого праймерами фрагмента, был получен в образце под номером 3. Известно, что 3 образец являлся единственным из образцов, который содержал микобактерии туберкулезного комплекса культивированные в полностью автоматизированной системе ВАСТЕС (рисунок 13).



Рисунок 13 - Визуализация результатов электрофореза путем просвечивания УФ-лучами

3.2. ПЦР диагностика Нетуберкулезных *Mycobacterium spp.*

Результат №1.

При постановке ПЦР с микобактериями нетуберкулезного комплекса мы подбирали оптимальный объем реакционной смеси для получения положительного результата на микобактерии.

Из расчета по упрощенной формуле расчета оптимальной температуры отжига праймеров мы определили что температура составила 55°C, и использовали ее при первой постановке ПЦР на микобактерии нетуберкулезного комплекса.

ПЦР смесь:

- H2O- 55мкл
- ScrMix – 55 мкл
- Праймер 1 – 27,5 мкл
- Праймер 2 – 27,5 мкл
- ДНК – 5 мкл

Протокол ПЦР:

Цикл 1 (x1)

- 1 шаг (95°C - 5 мин)

Цикл 2 (x40)

- 1 шаг (94°C - 15 сек)

- 2 шаг (55°C - 15 сек)

- 3 шаг (72°C - 40 сек)

В лунки агарозного геля при электрофорезе вносилось по 5 мкл.

Условия проведения электрофореза: 50 мин, 80ВТ, 130В, гель 1,2% агарозный.

В результате на электрофореграмме мы не обнаружили присутствия продукта амплификации ПЦР (рисунок 14).



Рисунок 14 - Электрофореграмма результатов амплификации

Результат №2.

При второй постановке ПЦР мы увеличили количество матрицы ДНК с 5 мкл до 10 мкл, и увеличили температуру отжига праймеров с 55°C до 56°C, что согласно литературным источникам должно было увеличить выход ПЦР продукта.

ПЦР-смесь рассчитана на 17 образцов:

- H₂O – 85 мкл
- ScrMix – 85 мкл
- Праймер 1 – 42,5 мкл
- Праймер 2 – 42,5 мкл

Протокол ПЦР:

Цикл 1 (x1)

- 1 шаг (95°C - 5 мин)

Цикл 2 (x40)

- 1 шаг (94°C - 15 сек)
- 2 шаг (56°C - 15 сек)
- 3 шаг (72°C - 40 сек)

В лунки агарозного геля при электрофорезе вносилось по 5 мкл.

Условия проведения электрофореза: 50 мин, 80Вт, 135В, гель 1,2% агарозный.

В результате на электрофореграмме в образцах под № 8, 34 и 35 образовались шмеры, в образцах под № 7, 9, 10, 29, 30, 31, 32 выхода продукта ПЦР не обнаружено.

Согласно литературным источникам присутствие шмеров может быть связано с неспецифической амплификацией либо с избытком ДНК матрицы.

Дальнейшим возможным способом решения может быть либо подбор более специфичных праймеров и условий реакции ПЦР, либо уменьшение количества добавляемой в смесь ДНК матрицы (рисунок 15).

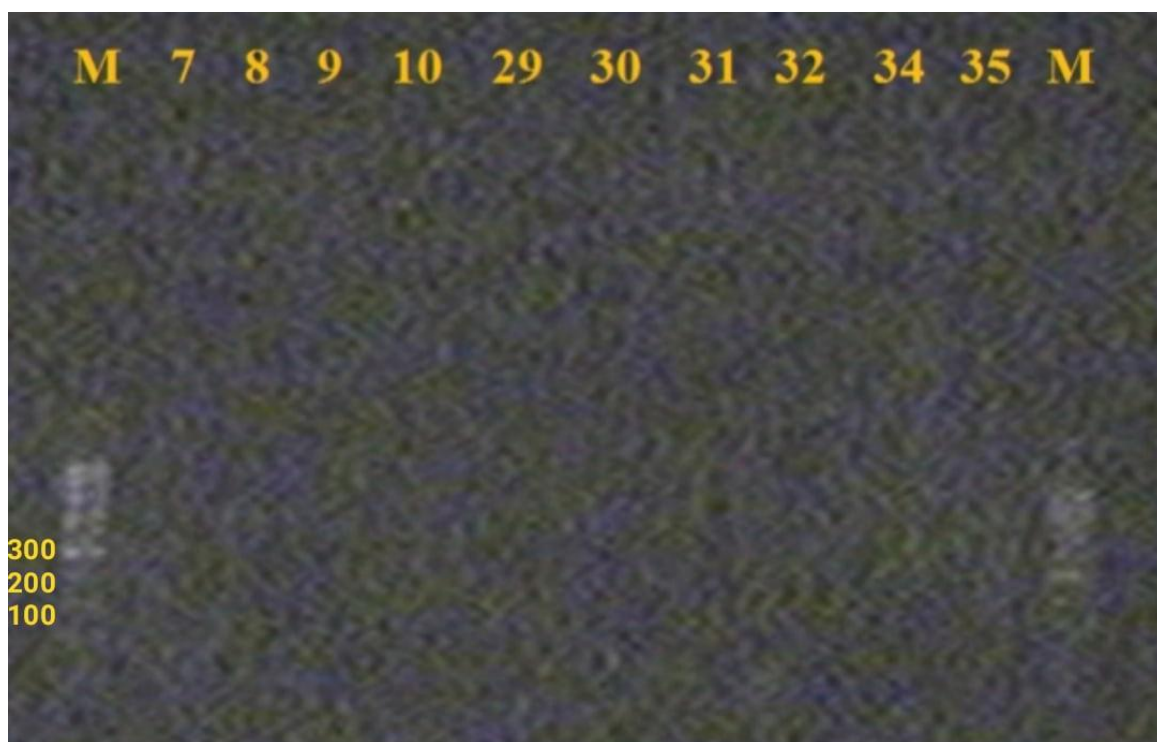


Рисунок 15 - Электрофореграмма результатов амплификации

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Неоспорим тот факт, что микобактерии представляют большой риск для здоровья человека. На сегодняшний день существует множество штаммов микобактерий, вызывающих микобактериозы различной степени тяжести. Появление мутаций в геноме микобактерий, приводит к расширению их видов, что увеличивает частоту и распространенность микобактериозов. Глобальное ухудшение экологии на планете в будущем может привести к увеличению количества аутоиммунных заболеваний, что в свою очередь сопутствует распространению различных микобактериозов

Достижения в области методов визуализации и микробиологии, в частности молекулярного метода, значительно расширили наше понимание этого заболевания, но остается много неопределенностей, особенно в эпидемиологии и клинической статистике.

Правильная идентификация видов микобактерий становится все более важной по мере появления данных об относительной предрасположенности к различным нетуберкулезным заболеваниям легких.

ВЫВОДЫ

???. Полученный анализ российских и зарубежных научных публикаций по теме нашего исследования выявил, что наиболее распространенные виды атипичных *Mycobacterium* spp. представляют собой *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii* и *M. abscessus*.

???. Экспериментальная оценка метода молекулярно-генетической детекции туберкулезных микобактерий в исследуемых образцах показала высокую информативность.

???. Предложенный метод молекулярно-генетической детекции нетуберкулезных микобактерий с проведенными нами условиями показал неоднозначные результаты. Дальнейшая доработка условий проведения ПЦР будет выполняться в ходе обучения в магистратуре.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адамбекова, А. Д. Нетуберкулезные микобактерии и их классификация / А. Д. Адамбекова // Известия вузов, 2010. - № 7. - с. 81-87.
2. Анисимова А. И., Павлова М. В., Арчакова Л. И., Сапожникова Н. В., Чернохаева И. В., Гаврилов П. В., Соколович Е. Г. // Микобактериозы легких: сложности диагностики и лечения, 2020 г.
3. Васильев А. В. // Микобактериоз // - СПб.: 2005. - с. 218.
4. Гунтупова Л. Д., Борисов С. Е., Соловьева И. П., Макарова М. В., Хачатурьянц Е. Н. // Микобактериозы во фтизиопульмонологической практике: обзор литературы и собственный опыт // - М.: 2011. 51(3): - с. 39–50.
5. Бактериологическая диагностика нетуберкулезных микобактерий в Республике Беларусь / О. М. Залуцкая // Лечебное дело, 2014. 2: - с. 29-34.
6. Зюзя, Ю. Р. Морфологические особенности микобактериозов, вызванных нетуберкулезными микобактериями. Клиническая и экспериментальная морфология / Ю. Р. Зюзя, М. Г. Кузина, Ю. Г. Пархоменко // 2017. (4): - с. 4–14.
7. Литвинов, В. И. Нетуберкулезные микобактерии / В. И. Литвинов, М. В. Макарова, М. А. Краснова. - М.: МНПЦБТ, 2008. - с. 256.
8. Литвинов, В. И. Нетуберкулезные микобактерии, микобактериозы / В. И. Литвинов, Е. М. Богородская, С. Е. Борисов. - М.: МНПЦБТ, 2014.
9. Михайловский, А. М. Частота выявления и особенности морфологии нетуберкулезного микобактериоза у больных на поздней стадии ВИЧ-инфекции (по данным Оренбургской области). Туберкулез и болезни легких / А. М. Михайловский, С. А. Чуркин, Н. А. Пашкова, Л. Н. Лепеха // 2016.- 94 (12). - с. 57–61.
10. Оттен, Т. Ф. // Характеристика нетуберкулезных микобактерий - потенциальных возбудителей заболеваний человека. Проблемы туберкулеза. 1994. Т.3: - с. 56-59.

11. Оттен Т. Ф.// Микобактериоз легких: клиникобактериологические критерии диагностики. Большой Целевой Журнал о туберкулезе. 1999. 5.
12. Оттен Т. Ф., Васильев А. В.// Микобактериоз// СПб.: Медицинская пресса, 2005.
13. Прозоров А. А. // Современные проблемы туберкулеза. 1956. Т. 39. - № 3. - с .9.
14. Савченко М. А.// Клинические и эпидемиологические аспекты микобактериоза у пациентов с ВИЧ-инфекцией. ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии, 2019. 11 (2): - с. 27–33.
15. Старкова Д. А., Журавлев В. Ю., Вязовая А. А., Соловьева Н. С., Куликова О. Н., Нарвская О. В.// Видовое разнообразие нетуберкулезных микобактерий у больных микобактериозом на территориях Северо-Западного федерального округа России. Туберкулез и болезни легких, 2019. 97 (6): - с. 16–22.
16. Anderson, R. J. The chemistry of the lipids of the tubercle bacillus / R. J. Anderson// - Biol Med, 1943. - 15: 311–345.
17. Arnold C. P.// Clin. Microbiol. Infect., 2007. V. 13. № 2. 120.
18. Brown-Elliott B. A., Philley J. V.// Rapidly growing mycobacteria. Microbiol Spectr, 2017. 5(1).
19. Collins C. Mycobacteria in water. J. Appl. Bacteriol./ Collins C., Grange J., Yates M.// 1984. 57: 196-198.
20. Chan E. D., Iseman M. D.// Underlying host risk factors for nontuberculous mycobacterial lung disease. Semin Respir Crit Care Med. 2013. 34(1): 110–23.
21. Cowman S., van Ingen J., Griffith D. E., Loebinger M. R.// Nontuberculous mycobacterial pulmonary disease. Eur Respir J. 2019. 54(1): 190-250.
22. Daffé, M. Structure de l'enveloppe de Mycobacterium tuberculosis / M. Daffé// - Méd Mal Infect, 1996. - 26: 891–897.

23. Daley C. L.// Mycobacterial infections. *Semin Respir Crit Care Med*. 2013. 34(1): 1–2.
24. Falkinham J. O.// Environmental sources of nontuberculous mycobacteria. - *Clin Chest Med*, 2015. - 36(1): 35-41.
25. Griffith D.E.// An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*, 2007. - 175: 367-416.
26. Griffith D. E., Aksamit T., Brown-Elliott B. A., Catanzaro A., Daley C., Gordin F.// An official ATS/IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial diseases. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007. - 175(4): 367–416.
27. Guarner J.// Review of a neglected skin mycobacterial disease. *J Clin Microbiol*. 2018. - 56(4): 7–17.
28. Hett, E. C. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective / E.C. Hett, E.J. Rubin. - *Microbiol Mol Biol Rev*, 2008. - 72: 126–156.
29. Hoefsloot W., van Ingen J., Andrejak C., Angeby K., Bauriaud R., Bemer P., et al.// The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary samples: an NTMNET collaborative study. *Eur Respir J*. 2013. - 42(6): 4–13.
30. Halstrom S., Price P., Thomson R.// Environmental mycobacteria as a cause of human infection. *Int J Mycobacteriol*. 2015. - 4(2): 81–91.
31. Haverkamp M. H., van de Vosse E., van Dissel J. T.// Nontuberculous mycobacterial infections in children with inborn errors of the immune system. *J Infect*. 2014. - 68(1): 134–50.
32. Honda J. R., Knight V., Chan E. D.// Pathogenesis and risk factors for nontuberculous mycobacterial lung disease. *Clin Chest Med*. 2015. - 36(1): 1–11.
33. Hoefsloot W., The geographic diversity of nontuberculous mycobacteria isolated from pulmonary sample. *Eur. Respir. J*. 2013.- 42 (6): 1604–1613.
34. Intern J.// . *Med*. 2001. V. 249. van Soolingen D. № 1. P. 1.

35. Jeong S. H., Kim S. Y., Huh H. J., Ki C. S., Lee N. Y., Kang C. I., et al.// Mycobacteriological characteristics and treatment outcomes in extrapulmonary Mycobacterium abscessus complex infections. *Int J Infect Dis.* 2017. - 60: 49–56.
36. Katoch V.// Infections due to nontuberculous mycobacteria (NTM). *J. Med.Res. Indian,* 2004. - 120 (4): 290-304.
37. Larsson L. O., Polverino E., Hoefsloot W., Codecasa L. R., Diel R., Jenkins S. G., et al.// Pulmonary disease by non-tuberculous mycobacteria — clinical management, unmet needs and future perspectives. *Expert Rev Respir Med.* 2017; 11(12): 977–89.
38. Lipner E. M., Garcia B. J., Strong M.// Network analysis of human genes influencing susceptibility to mycobacterial infections. *PLoS One.* 2016; 11(1): 85.
39. McShane P. J., Glassroth J.// Pulmonary disease due to nontuberculous mycobacteria: current state and new insights. *Chest.* 2015; 148(6): 1517–27.
40. Morimoto K., Iwai K., Uchimura K., Okumura M., Yoshiyama T., Yoshimori K., et al.// A steady increase in nontuberculous mycobacteriosis mortality and estimated prevalence in Japan. *Ann Am Thorac Soc.* 2014; 11(1):1–8.
41. Morimoto K., Iwai K., Uchimura K. et al.// Kudoh Analysis of nontuberculous mycobacteriosis deaths in official statistics, 1970-2010, and a receipt clinical cohort study for the estimation of prevalence rate in Japan. *Ann. Am. Thorac. Soc.* Jan. 2014; 11 (1); 1–8.
42. Pfyffer G. E., Auckenthaler R., van Embden J. D., van Soolingen D.// *Emerg. Infect Dis.* 1998. V. 4. № 4. P. 631.
43. Prescott L. M., Wiley J., Sherwood L., Woolverton C.// *Microbiologie / -* 2013. - page 574
44. Prevots D. R., Marras T. K.// Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria: a review *Clin. Chest. Med.* 2015; 36 (1): 13–34.
45. Pym A., Small P.// *Evolution of microbial pathogens / Ed. H. Seifert and V. Di Rita. ASM Press Washington, 2006. P. 301.*

46. Richter E., Andres S., Hillemann D.// Current microbiological methods in the investigation of mycobacteria. *Pneumologie*. 2015; 69(5): 276–81.
47. Runyon, E. H. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease / E. H. Runyon. - *Med Clin N Amer*,1959. - 43:273–290.
48. Shahraki A. H., Heidarieh P., Bostanabad S. Z., Khosravi A. D., Hashemzadeh M., Khandan S., et al.// “Multidrug-resistant tuberculosis” may be nontuberculous mycobacteria. *Eur J Intern Med*. 2015; 26(4): 279–84.
49. Stout J. E., Koh W. J., Yew W. W.// Update on pulmonary disease due to nontuberculous mycobacteria. *Int J Infect Dis*. 2016; 45: 123–34.
50. van Ingen J.// Microbiological diagnosis of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease. *Clin Chest Med*. 2015; 36(1): 43–54.
51. Wayne L. G. P. // *Crit. Rev. Microbiol*. 1985. V. 12. № 3. 185.
52. Weiss C. H., Glassroth J.// Pulmonary disease caused by nontuberculous mycobacteria. *Expert Rev Respir Med*. 2012; 6(6): 597–612.
53. Wu U. I., Holland S. M.// Host susceptibility to non-tuberculous mycobacterial infections. *Lancet Infect Dis*. 2015; 15(8): 968–80.
54. Yano Y., Kitada S., Mori M., Kagami S., Taguri T., Uenami T., et al.// Pulmonary disease caused by rapidly growing mycobacteria: a retrospective study of 44 cases in Japan. *Respiration*. 2013; 85(4): 305–11.
55. Yeh J. J., Wang Y. C., Sung F. C., Chou C. Y., Kao C. H.// Nontuberculosis mycobacterium disease is a risk factor for chronic obstructive pulmonary disease: a nationwide cohort study. *Lung*. 2014;192(3):403–11.
56. Yoon H. J., Choi H. Y., Ki M.// Nontuberculosis mycobacterial infections at a specialized tuberculosis treatment centre in the Republic of Korea. *BMC Infect Dis*. 2017; 17(1):



СПРАВКА

Башкирский государственный медицинский университет

о результатах проверки текстового документа на наличие заимствований

ПРОВЕРКА ВЫПОЛНЕНА В СИСТЕМЕ ANTIPLAGIAT.VUZ

Автор работы: Абушахина Аделя Гумеровна
Самоцитирование
рассчитано для: Абушахина Аделя Гумеровна
Название работы: РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫХ *Mycobacterium* spp. В КЛИНИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ
Тип работы: Выпускная квалификационная работа
Подразделение: ФГБОУ ВО Башкирский государственный медицинский университет МЗ РФ

РЕЗУЛЬТАТЫ

■ ОТЧЕТ О ПРОВЕРКЕ КОРРЕКТИРОВАЛСЯ: НИЖЕ ПРЕДСТАВЛЕНЫ РЕЗУЛЬТАТЫ ПРОВЕРКИ ДО КОРРЕКТИРОВКИ

ЗАИМСТВОВАНИЯ	4.79%	ЗАИМСТВОВАНИЯ	5.39%
ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	61.71%	ОРИГИНАЛЬНОСТЬ	90.2%
ЦИТИРОВАНИЯ	33.5%	ЦИТИРОВАНИЯ	4.41%
САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%	САМОЦИТИРОВАНИЯ	0%

ДАТА ПОСЛЕДНЕЙ ПРОВЕРКИ: 24.06.2021

ДАТА И ВРЕМЯ КОРРЕКТИРОВКИ: 24.06.2021 07:38

Модули поиска: ИПС Адилет; Модуль поиска "БГМУ"; Библиография; Сводная коллекция ЭБС; Интернет Плюс; Сводная коллекция РГБ; Цитирование; Переводные заимствования (RuEn); Переводные заимствования по eLIBRARY.RU (EnRu); Переводные заимствования по Интернету (EnRu); Переводные заимствования издательства Wiley (RuEn); eLIBRARY.RU; СПС ГАРАНТ; Медицина; Диссертации НББ; Перефразирования по eLIBRARY.RU; Перефразирования по Интернету; Патенты СССР, РФ, СНГ; Шаблонные фразы; Кольцо вузов; Издательство Wiley; Переводные заимствования

Работу проверил: Кобзева Наталья Рудольфовна

ФИО проверяющего

Дата подписи:

24.06.2021 г.

Подпись проверяющего



Чтобы убедиться в подлинности справки, используйте QR-код, который содержит ссылку на отчет.

ФГБОУ ВО БГМУ
Минздрава России

Ответ на вопрос: является ли обнаруженное заимствование корректным, система оставляет на усмотрение проверяющего. Предоставленная информация не подлежит использованию в коммерческих целях.

ОТЗЫВ

на выпускную квалификационную работу студента группы Б-401 А группы
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)

Абушахминой Адели Гумеровны

(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: «Разработка тест-системы для детекции нетуберкулезных *Mycobacterium spp.* в клиническом материале»

1 Объем текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала, соответствие наименования и содержания разделов работы заданию, выданному кафедрой.

Полностью соответствует

2 Актуальность тематики проблемы, решаемой в выпускной квалификационной работе, и качество ее решения Тема выпускной квалификационной работы очень актуальна

3 Основные достоинства и недостатки выпускной квалификационной работы. выпускная квалификационная работа выполнена в соответствии с требованиями, проведен большой анализ литературных источников по заявленной тематике.

4 Технично-экономические, социально-экономические, экологические обоснования, обоснования вопросов безопасности жизнедеятельности, разработанные в выпускной квалификационной работе имеет социально-экономическое значение в микробиологической науке.

5 Уровень использования вычислительной техники и программных средств Освоены методы планирования и анализа

6 Апробация и реализация результатов, полученных в выпускной квалификационной работе: патенты, внедрения, публикации, сообщения на конференциях и др. -

7 Практическая и теоретическая подготовленность выпускника к выполнению профессиональных задач. отличный уровень подготовки

8 Качество оформления текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов. Работа оформлена в соответствии с требованиями

9 Обоснованность выводов и предложений Автором тема глубоко изучена и проработана, заслуживают внимания результаты и обсуждение

10 Замечания по усмотрению рецензента Замечаний нет

(дополнительные замечания представлены на _____ листах приложения)

11 Возможность использования результатов, полученных в выпускной квалификационной работе, для публикации, реализации в учебном процессе, рекомендуемых к внедрению или др. Результаты могут быть использованы в дальнейшем в учебном процессе и для публикаций

12 Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно", "неудовлетворительно") и рекомендация о присвоении (не присвоении) студенту-выпускнику квалификации (степени). Выпускная квалификационная работа заслуживает оценки «отлично» и студенту выпускнику рекомендуется присвоить квалификацию бакалавр

Научный руководитель:
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России
кафедра фундаментальной и прикладной
микробиологии, д.м.н.



Подпись А.Р. Мавзютов
удостоверяю.
Начальник управления кадров
ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России
«21» 06 2021 г.

А.Р. Мавзютов

Ведущий специалист
Управления кадров
ГАОУ ДПО ЦИО

РЕЦЕНЗИЯ

на выпускную квалификационную работу студента группы Б-401 А группы
(Форма выпускной квалификационной работы) (Шифр группы)

Абушахминой Адели Гумеровны
(Фамилия, имя, отчество полностью)

на тему: «Разработка тест-системы для детекции нетуберкулезных *Mycobacterium spp.* в клинической материале»

1 Объем текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала, соответствие наименования и содержания разделов работы заданию, выданному кафедрой.

Полностью соответствует

2 Актуальность тематики проблемы, решаемой в выпускной квалификационной работе, и качество ее решения Тема выпускной квалификационной работы очень актуальна

3 Основные достоинства и недостатки выпускной квалификационной работы. выпускная квалификационная работа выполнена в соответствии с требованиями, проведен большой анализ литературных источников по заявленной тематике.

4 Технично-экономические, социально-экономические, экологические обоснования, обоснования вопросов безопасности жизнедеятельности, разработанные в выпускной квалификационной работе имеет социально-экономическое значение в микробиологической науке.

5 Уровень использования вычислительной техники и программных средств Освоены методы планирования и анализа

6 Апробация и реализация результатов, полученных в выпускной квалификационной работе: патенты, внедрения, публикации, сообщения на конференциях и др. -

7 Практическая и теоретическая подготовленность выпускника к выполнению профессиональных задач. отличный уровень подготовки

8 Качество оформления текстовой части (пояснительной записки) и иллюстрационно-графического материала в соответствии с требованиями действующих стандартов и регламентов. Работа оформлена в соответствии с требованиями

9 Обоснованность выводов и предложений Автором тема глубоко изучена и проработана, заслуживают внимания результаты и обсуждение

10 Замечания по усмотрению рецензента Замечаний нет

(дополнительные замечания представлены на _____ листах приложения)

11 Возможность использования результатов, полученных в выпускной квалификационной работе, для публикации, реализации в учебном процессе, рекомендуемых к внедрению или др. Результаты могут быть использованы в дальнейшем в учебном процессе и для публикаций

12 Оценка выпускной квалификационной работы ("отлично", "хорошо", "удовлетворительно", "неудовлетворительно") и рекомендация о присвоении (не присвоении) студенту-выпускнику квалификации (степени). Выпускная квалификационная работа заслуживает оценки «отлично» и студенту выпускнику рекомендуется присвоить квалификацию бакалавр

Рецензент
ФБУН ГНЦ ПМБ, зам. директора по
научно-производственной работе,
профессор, д.б.н.
(Место работы, занимаемая должность)



(Handwritten signature)

А.П. Шепелин

