

Методики лабораторных исследований

МЕТОДЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ МИКОБАКТЕРИЙ

© 2021 г. Ларионова Е.Е., Андреевская С.Н., Смирнова Т.Г.,
Севастьянова Э.В., Черноусова Л.Н.

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза», г. Москва, Россия

Поступила 03.01.2021

Приведен обзор методик, применяемых для идентификации микроорганизмов, принадлежащих к микобактериям туберкулезного комплекса и нетуберкулезных микобактерий. Описаны технологические особенности применяемых методов идентификации. Предложен порядок действий исполнителя для решения задачи по идентификации микобактерий.

Ключевые слова: микобактерии, питательные среды, культивирование, идентификация, молекулярно-биологические методы.

Работа выполнена в рамках темы НИР № 0515-2019-0015 «Формирование лекарственной устойчивости микобактерий и соматических клеток к противотуберкулезным препаратам».

DOI: 10.7868/S2587667821010106

Laboratory Techniques

METHODS FOR THE IDENTIFICATION OF MYCOBACTERIUM SPECIES

Larionova E.E., Andreevskaya S.N., Smirnova T.G.,
Sevastyanova E.V., Chernousova L.N.

Central TB Research Institute, Moscow, Russia

Submitted as of 03.01.2021

The article represents a review of methods used for the identification of Mycobacterium tuberculosis complex or non-tuberculous mycobacteria. We describe technical features of these methods. We also propose an algorithm of procedures for the identification of Mycobacterium species.

Keywords: mycobacteria, nutrient media, cultivation, identification, molecular biological methods.

The article was prepared under research topic No. 0515-2019-0015: "The development of drug resistance of mycobacteria and somatic cells to TB drugs".

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время общепризнано, что туберкулез (ТБ) – одно из самых распространенных инфекционных заболеваний в мире. В дополнение к ТБ, вызываемому микобактериями туберкулеза (МБТ), недавние эпидемиологические

исследования показали значительное увеличение роли нетуберкулезных микобактерий (НТМБ) в развитии заболеваний легких у человека. Более 170 видов НТМБ присутствуют в различных природных и антропогенных экологических нишах, более 50 из них являются клинически значимыми, т.е. могут быть этиологическими

факторами тяжелой (вплоть до смертельной) патологии у людей [8, 9, 15, 19].

Необходимо учитывать, что в связи с изменением подходов к лечению больных и переходом на персонифицированное лечение микобактериальных инфекций роль диагностических лабораторных исследований для оказания медицинской помощи значительно возросла [3, 4]. В конечном итоге именно работа лаборатории по качественной идентификации выявленных микроорганизмов с применением самых современных методик повлияет на установление окончательного диагноза, подтвержденного микробиологическими методами, определит стратегию лаборатории в проведении дальнейших исследований, ляжет в основу индивидуального подхода к лечению больных.

Для практической микобактериологической лаборатории можно рекомендовать следующие методы идентификации микобактерий:

- традиционные фенотипические, микроскопические и очень ограничено – биохимические методы;
- молекулярные методы (иммунохроматографические тесты и методы, основанные на полимеразной цепной реакции в различных ее вариантах).

Поскольку культуральный метод является основным при лабораторной диагностике ТБ, усилия лаборатории всегда должны быть направлены на максимально полную характеристику выявленного возбудителя (идентификация и определение лекарственной чувствительности).

В случае получения культуры микроорганизма первичная идентификация представителей *M. tuberculosis* complex от НТМБ осуществляется по следующим культуральным характеристикам: скорость роста колоний на плотных питательных средах, цвет колоний, пигментообразование колоний, морфология колоний. Первичная идентификация позволяет сделать только предварительное заключение о принадлежности культуры к роду *Mycobacterium*. Данный вид первичной идентификации возможен только при получении роста на плотных питательных средах. Подтверждение принадлежности выделенной культуры к *M. tuberculosis* или НТМБ на основании специальных лабораторных тестов является обязательным.

Проверка культур на контаминацию неспецифическими микроорганизмами

Во всех случаях получения роста перед постановкой теста лекарственной чувствительности (ТЛЧ) во избежание неверного результата необходимо контролировать чистоту выросшей

культуры с помощью микроскопии мазка с окраской по Цилю–Нильсену (технология подробно описана в работе Севастьяновой Э.В. и соавт. [1, 2]) и посева на кровяной агар. Примеры контаминации образцов при микроскопии и посева на кровяной агар представлены на рис. 1, 2.

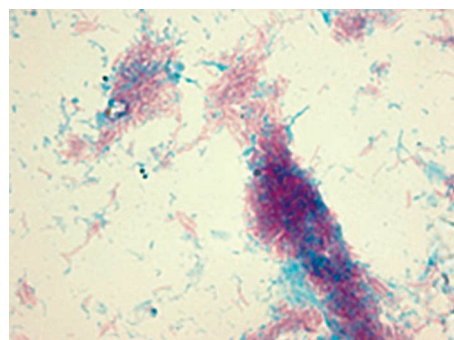


Рисунок 1. Окраска по Цилю–Нильсену.
Figure 1. Ziehl–Neelsen staining.

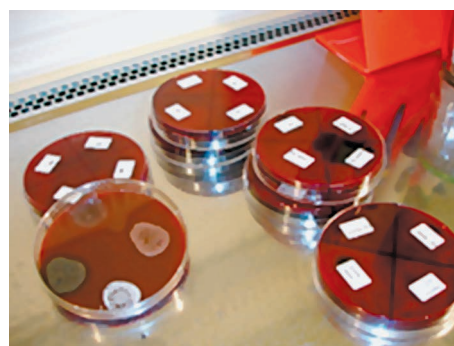


Рисунок 2. Посев на кровяной агар.
Figure 2. Inoculation onto blood agar.

Выявление контаминации неспецифическими микроорганизмами является обязательной процедурой перед любыми исследованиями микобактериальных культур, полученных как на жидких, так и на плотных питательных средах.

Приготовление кровяного агара

Состав основы кровяного агара: экстракт из сердечной мышцы (твердый) – 2 г, панкреатический экстракт казеина – 13 г, дрожжевой экстракт – 5 г, хлорид натрия – 5 г, агар – 15 г. После добавления стерильной крови кровяной агар используется для выявления посторонней микрофлоры (стрептококков, стафилококков и других микроорганизмов, не относящихся к микобактериям) в положительных пробирках MGIT и пробирках с ростом на среде Левенштейна–Йенсена.

Все манипуляции приготовления выполняют с соблюдением правил асептики в ламинарном шкафу для приготовления питательных сред.

На 1 литр дистиллированной воды добавить 40 г основы кровяного агара, тщательно перемешать, основу нагреть при постоянном помешивании до полного растворения порошка, автоклавировать при 121 °С в течение 15 минут.

После автоклавирования основы содержимое колбы охладить до 40–50 °С, стерильно добавить 5% дефибринированной бараньей крови (на 100 мл агара – 5 мл крови), тщательно перемешать.

Открыть стерильные одноразовые чашки Петри. Разлить кровяной агар, используя стерильную серологическую пипетку и механический дозатор.

- В зависимости от размера чашки разливать:
 - 5 мл кровяного агара в чашку диаметром 60 мм
 - 10 мл кровяного агара в чашку диаметром 90 мм.
- Закрывать крышку чашки Петри, дожидаться охлаждения агара и испарения конденсата с крышки, изолировать чашку парафильмом для предотвращения высыхания агара, поместить готовые чашки либо в пакет, либо в банку под крышку.
- Приготовленные чашки Петри с кровяным агаром хранить в холодильнике.

Контроль качества приготовления кровяного агара

Каждый раз при приготовлении новой партии чашек с кровяным агаром необходимо: регистрировать номера серии/партии, даты получения образцов крови, даты истечения срока годности каждого ингредиента. Необходимо зарегистрировать дату начала использования реагентов этой серии, а также дату окончания его использования.

Для контроля стерильности приготовленного агара одна чашка Петри с кровяным агаром инкубируется при температуре 36 °С в течение 24–48 часов, результаты фиксируются в журнале.

Ростовые качества готового к работе кровяного агара тестируются контрольным посевом типовых эталонных микроорганизмов.

Инокулируйте штамм *Staphylococcus aureus* в одну чашку и одну чашку оставьте незасеянной. Через два дня проверьте наличие роста: в чашке с засеянным штаммом *S. aureus* должны наблюдаться колонии кремового цвета, а в незасеянных чашках рост колоний должен отсутствовать. Если в результатах контроля качества наблюдаются несоответствия, не используйте эту партию кровяного агара.

Любые несоответствия в результатах контроля качества и последующие меры должны быть зарегистрированы в Форме регистрации контроля качества.

Процедура посева и оценка результатов

Посев исследуемого материала на чашки Петри с кровяным агаром производят, рассеивая 2–4 капли суспензии клеток с жидкой или плотной питательной среды. Капли материала необходимо слегка растереть микробиологической петлей по поверхности агара. После этого чашку с кровяным агаром нужно поместить в термостат в обычной атмосфере при 37 °С. Учет результатов проводят визуально через 24–48 ч. инкубации. В случае выявления роста на поверхности агара делают вывод о наличии контаминации и невозможности постановки ТЛЧ микобактерий. В этом случае либо повторно заказывают диагностический материал от больного для повторения процедуры посева на микобактерии, либо принимают усилия для дополнительной деконтаминации выделенной культуры.

Внимание! В некоторых случаях быстрорастущие микобактерии могут дать рост на кровяном агаре. Обязательно проведите микроскопию с окраской по Цилю–Нильсену.

Биохимические методы

В случае недоступности современных методов дифференцировки МБТ от НТМБ возможно производить посев на плотные яичные среды, содержащие селективные препараты (гидразид тиофен-2 карбоксилловая кислота, салицилат натрия, 5%-ный NaCl, паранитробензойная кислота и т.д.). Помочь в идентификации могут тесты на биохимические реакции: ниациновый тест, нитратредуктазный тест, тест на наличие термостабильной каталазы и т.д. В определителе бактерий Берджи для идентификации НТМБ описано множество тестов для их идентификации до вида. Сложность состоит в том, что штаммы, относящиеся к одному и тому же виду НТМБ, могут давать разную реакцию на биохимические тесты (+/-). В связи с этим подобные виды тестов являются наименее предпочтительными.

Иммунохроматографический метод

Особенно удобен для точной идентификации МБТ быстрый иммунохроматографический метод, который отличается простотой выполнения и позволяет получить ответ за 15–20 минут.

Тест основан на обнаружении фракции микобактериального белка МРТ64, которая выделяется из клеток МБТ в процессе культивирования на жидких и плотных питательных средах. Достоинством метода является то, что для выполнения анализа не требуется специальных инструментов или оборудования. Для идентификации методом иммунохроматографии рекомендуется использовать либо идентификационный тест MGIT TBc ID (производства BD, США), либо тест SD BIOLINE TB Ag MPT64 Rapid (производства Standard Diagnostics, Корея). Тесты этих производителей рекомендованы Глобальной лабораторной инициативой [12].

Описываемый тест выявляет присутствие в культуральной среде только представителей туберкулезного комплекса (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*) и не определяет наличие НТМБ. Многочисленные сравнительные исследования, проведенные в клинических условиях, показали его высокую чувствительность (> 95%) и специфичность (> 95%) [6, 10, 11].

Кассета тестового устройства фиксирует тест-полоску, на который нанесены моноклональные антитела мыши к антигену МРТ64 (тестовая полоса «Т») и антитела козы к иммуноглобулинам G мыши (контрольная полоса «С»). До внесения образца обе линии в окне результатов не видны. Контрольная линия «С» используется для контроля правильности проведения анализа. Она должна проявляться всегда, если процедура выполнена правильно и если реагенты контрольной линии находятся в рабочем состоянии и пригодны для анализа.

Когда образец добавляется в тестовое устройство, антиген МРТ64 реагирует с конъюгатом моноклональных антител мыши к МРТ64 и коллоидного золота, присутствующим на тест-полоске, и образует комплекс антиген-антитело. Этот комплекс мигрирует через тест-полоску в зону реакции, где он захватывается вторым специфическим антителом МРТ64, иммобилизованным на мембране. Если антиген МРТ64 присутствует в образце, цветовая реакция визуализируется в виде фиолетово-красной линии.

Все исследования проводятся с соблюдением мер биологической безопасности с использованием средств индивидуальной защиты. Биологические отходы инактивируются методом стандартного автоклавирования.

Процедура проведения иммунохроматографического теста

Процедура анализа состоит из нескольких этапов: подготовка культуры, подготовка тестового устройства, внесение образца в тестовое устройство и анализ результатов.

На первом этапе необходимо подготовить культуру микроорганизма к исследованию.

Образец, культивированный в жидкой питательной среде

Перемешать содержимое позитивной пробирки с жидкой питательной средой с использованием вортекса, 100 мкл жидкой культуральной среды внести в окно для образца (s) без какой-либо предварительной подготовки.

Образец, культивированный на плотной питательной среде

Несколько колоний микроорганизма (3–4) с плотной питательной среды перенести одной петлей в 200 мкл буфера для экстракции (буфер включен в набор производителя, состав KH_2PO_4 , NaCl, Tween 80). Вся подготовка образца проводится в пробирках типа эппендорф. После помещения колоний в пробирку с буфером образец суспендировать при помощи вортекса и 100 мкл приготовленного таким образом образца использовать для исследования.

Если в пробирке со скошенной плотной питательной средой образовался конденсат, то можно без предварительной подготовки добавить 100 мкл конденсата в окно для образцов (s), или суспендировать колонии в этом конденсате вместо экстрагирующего буфера.

Важно! Все пробирки, используемые на этапе анализа, и все тестовые устройства должны быть маркированы лабораторным номером тестируемого образца.

Подготовка и проведение теста Анализ результатов

Извлечь кассету тестового устройства из упаковки, поместить ее на ровную сухую поверхность стола. Маркировать лабораторным номером тестируемого образца.

Внести 100 мкл подготовленной культуральной среды или суспендированных в буфере клеток в окно для образца (s).

Как только тест начнет работать, вы увидите передвижение пурпурного окрашивания в тестовом окне, расположенном посередине кассеты.

Через 15 минут проведите оценку результата теста.

В левой части окна результатов должна появиться окрашенная полоса, свидетельствующая о правильности проведения теста. Эта полоса является контрольной (ее расположение обозначено на кассете буквой «С»).

В правой части окна результатов может появиться окрашенная полоса, представляющая собой тестовую полосу (обозначена на кассете буквой «Т»).

Отрицательный результат. Присутствие только одной контрольной полосы «С» указывает на отрицательный результат.

Положительный результат. Присутствие двух окрашенных полос «Т» и «С» в окне результатов указывает на положительный результат, независимо от того, какая полоса появилась первой.

Важно! В зависимости от концентрации антигена МРТ64 интенсивность окрашивания тестовой полосы может варьировать. Положительный результат не будет меняться после того, как он появился через 15 минут.

Неправильный результат. Отсутствие в окне контрольной полосы «С» указывает на неправильный результат. Причиной может быть неправильное выполнение процедуры анализа или непригодность тестового устройства для анализа. Рекомендуется протестировать образец культуры от пациента повторно.

Ограничения метода. При получении сомнительных результатов рекомендуется провести дополнительное исследование с использованием альтернативных методик.

Молекулярно-генетические методы

Особое значение в идентификации микобактерий приобрели молекулярные методы, основанные на полимеразной цепной реакции (ПЦР). Метод ПЦР зарекомендовал себя как высокоспецифичный и чувствительный. Метод позволяет выявлять присутствие микобактерий амплификацией видоспецифичных последовательностей генома. Предпочтительными являются ПЦР тест-системы с детекцией результата в режиме реального времени. Получение положительного результата методом ПЦР позволяет установить наличие МБТ в любом диагностическом материале, в том числе и в культурах микроорганизмов.

Получение положительного результата методом ПЦР не требует дополнительной дифференциации МБТ от НТМБ, т.к. положительный результат однозначно указывает на принадлежность к МБТ. ДНК, выделенная из культур микобактерий и использованная для проведения ПЦР, может быть использована для любых идентификационных тестов, основанных на ПЦР. Современное развитие технологии позволило ряду разработчиков создать тест-системы,

основанные на ПЦР в режиме реального времени, позволяющие выявлять ДНК МБТ и НТМБ одновременно в одной пробирке [5, 7, 12, 13, 14, 16, 17, 18].

В условиях широкого распространения НТМБ большое значение имеют молекулярно-генетические тест-системы для видовой идентификации микобактерий. В случае диагностики ТБ видовая идентификация является актуальной для культуральных методов посева на жидкие среды в автоматической системе BACTEC MGIT 960/320 и при получении специфического роста на плотных питательных средах. Поскольку НТМБ резистентны к большинству противотуберкулезных препаратов, видовая идентификация микобактерий позволяет дифференцировать микобактериоз и ТБ с МЛУ/ШЛУ на этапе лабораторной диагностики, сводя к минимуму ошибки при постановке диагноза.

В случаях отсутствия роста посторонней микрофлоры на кровяном агаре, положительного результата микроскопии мазка культуры с окраской по Цилю–Нильсену и получения отрицательного результата на МБТ методом иммунохроматографии в культуре предполагается наличие НТМБ и проводится их видовая идентификация. Если лаборатория не имеет возможности проводить видовую идентификацию НТМБ, культуру микроорганизма следует отправить в вышестоящую организацию.

К методикам, обеспечивающим точную видовую идентификацию НТМБ, относится **ДНК-стриповая технология** (Hain Lifescience, Германия), включающая два вида тестов:

– GenoType *Mycobacterium* CM позволяет идентифицировать следующие виды микобактерий: *M. avium* ssp., *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. interjectum*, *M. kansasii*, *M. malmoense*, *M. peregrinum*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. xenopi* и *M. tuberculosis* complex.

– GenoType *Mycobacterium* AS, который позволяет идентифицировать *M. simiae*, *M. mucogenicum*, *M. goodii*, *M. celatum*, *M. smegmatis*, *M. genavense*, *M. lentiflavum*, *M. heckeshornense*, *M. szulgai*, *M. intermedium*, *M. phlei*, *M. haemophilum*, *M. kansasii*, *M. ulcerans*, *M. gastris*, *M. asiaticum* и *M. shimoides*.

Тесты GenoType® *Mycobacterium* CM/AS основаны на ДНК-стриповой технологии. Этим методом можно исследовать культуры с плотной и жидкой питательной средой, а также работать непосредственно с диагностическим материалом (в случае получения отрицательного результата ПЦР на выявление МБТ) при наличии большого количества кислотоустойчивых микроорганиз-

мов при микроскопии мазка. Время для получения результата составляет 1–2 дня.

Необходимо учитывать, что все работы с применением молекулярно-генетических методов проводят в специальной части лаборатории, организованной и оснащенной согласно МУ 1.3. 2569-09 Москва, 2009 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности». Образцы мокроты и культуры всегда надо рассматривать как потенциально опасные агенты. Работа с этими образцами должна проводиться с соблюдением мер биологической защиты.

Процедура выполнения теста по видовой идентификации микобактерий на ДНК-стрипах

Последовательность действий при выполнении теста состоит из трех этапов: выделение ДНК из культурного материала (твердая/жидкая среды) или клинических образцов; мультиплексная амплификация с биотилинированными праймерами; обратная гибридизация.

Гибридизация включает следующие этапы: химическая денатурация продуктов амплификации; гибридизация одноцепочечного, маркированного биотином ампликона с иммобилизованными на мембране зондами; отмывка, добавление конъюгата стрептовидин-фосфатазы (AP); проявление реакции.

Шаблон, который используется для детекции результатов, позволяет проводить интерпретацию полученных данных (Рис. 4–5).

Хранение и меры предосторожности

Смесь (PNM) праймеров хранится при 2–8 °С до получения образца ДНК. Если требуется более длительное хранение (более 4 недель), праймеры следует хранить при –20 °С. Во избежание повторного замораживания PNM сделайте аликваты.

Другие реагенты хранят при 2–8 °С. Не используйте реактивы после окончания срока годности.

Оборудование и материалы, реактивы и растворы

Оборудование: бокс биологической безопасности II класса, высокоскоростная центрифуга, пипетки механические с переменным объемом, прибор для гибридизации – термошейкер для гибридизации TwinCubator либо автоматизированный процессор GT-Blot 48. **Расходные материалы:** наконечники для механических пипеток (200 и 1000 мкл, с фильтром), пипетки

Пастера одноразовые, ванночки для гибридизации, пробирки типа эппендорф. **Реактивы:** денатурирующий раствор – DEN, растворы для конъюгации – CON и SUB, гибридизационный буфер – HYB, буфер для отмывки – STR, отмывочный раствор – RIN.

Инструкции по использованию Выделение ДНК

Для проведения данного теста можно использовать бактерии из жидкой или с плотной питательной среды, а также микроскопически положительные образцы мокроты или другого диагностического материала.

Образцы дезактивируют в термоблоке при +95 °С в течение 20 минут для инактивации бактерий. Рабочая зона для выделения и работы с ДНК должна находиться отдельно от зоны амплификации ДНК, а зона, где проводят гибридизацию, должна находиться отдельно от всех рабочих зон лаборатории.

Для выделения ДНК может быть использован любой метод, принятый в лаборатории. Однако в случае необходимости можно использовать следующий быстрый метод выделения ДНК из культур микобактерий.

1а. Поместить бактерии с плотной питательной среды в 300 мкл воды.

1б. Поместить 1000 мкл образца с жидких сред в пробирку типа эппендорф, центрифугировать 5 минут при 2500 g, удалить супернатант и ресуспендировать осадок в 100–300 воды. Перемешать на вортексе.

2. Инкубировать пробу 20 минут при +95 °С на водяной бане.

3. Инкубировать пробу 15 минут в ультразвуковой бане (этот шаг является необязательным).

4. Центрифугировать образец 5 минут при максимальных оборотах, для амплификации использовать 5 мкл.

5. Если ДНК предполагается хранить, перенесите надосадочную жидкость в отдельную пробирку.

Амплификация

Приготовление амплификационной смеси на 1 образец GenoType® Mycobacterium CM:

Реактивы	Количество
PNM-праймеры	35 мкл
полимеразный буфер	5 мкл
раствор MgCl ₂	2 мкл
ДНК-полимераза	0,2 мкл
деионизированная вода	3 мкл

Для реакции использовать 45 мкл амплификационной смеси и 5 мкл ДНК.

Приготовление амплификационной смеси на 1 образец GenoType® Mycobacterium AS:

Реактивы	Количество
АМ-А	10 мкл
АМ-В	35 мкл

Для реакции использовать 45 мкл амплификационной смеси и 5 мкл ДНК.

Перед приготовлением реакционной смеси центрифугировать пробирку с ДНК на максимальных оборотах.

Добавить 5 мкл ДНК, доведя объем пробирки до 50 мкл.

Не пренебрегайте использованием отрицательных контролей!

Программа амплификации:

Время	Температура	Кол-во циклов
15 мин	95 °С	1 цикл
30 сек 2 мин	95 °С 58 °С	10 циклов
25 сек 40 сек 40 сек	95 °С 53 °С 70 °С	20 циклов
8 мин	70 °С	1 цикл

Продукты амплификации могут храниться от +4 до -20 °С.

Подготовка к гибридизации

Предварительно до начала работы подготовить:

- емкость с хлорсодержащим реагентом;
- широкий поднос, дно которого выстлано салфетками (для просушки ванночки), рядом положить салфетки, чтобы можно было их периодически обновлять;
- одноразовые наконечники 200, 1000 мкл;
- механические пипетки переменного объема 200, 1000 мкл;
- таймер;
- одноразовые пастеровские пипетки;
- зубочистки;
- пробирки на 50 мл 3 шт. Пробирки подписать.
 - буфер SUB, пробирку завернуть в фольгу
 - буфер CON
 - H₂O
- два буфера НУВ и STR прогреть до 45 °С и приготовить растворы CON и SUB;
 - SUB на 990 мкл SUB-D добавляем 10 мкл SUB-D (на 1 образец) CON на 990 мкл
 - CON-D добавляем 10 мкл CON-D (на 1 образец)

Процедура гибридизации

1. Взять ванночку для стрипов и ориентировать ее так, чтобы всегда можно было определить, где находится первый образец.

2. В необходимое количество ячеек, в верхнюю часть лунки, добавить по 20 мкл денатурирующего раствора DEN.

3. Далее в образовавшуюся каплю добавить 20 мкл ампликонов после реакции амплификации.

4. Содержимое капли перемешать пипетированием.

5. Инкубировать пробы 5 минут при комнатной температуре.

Одновременно из контейнера с соответствующими стрипами из набора CM или AS пластиковым пинцетом на бумагу достать стрипы и пронумеровать в соответствии с количеством проб (с того конца, который помечен полоской).

Внимание! Стрипы очень нежные и могут порваться.

6. Предварительно прогреть гибридизационный буфер НУВ до 45 °С.

7. В нижнюю часть лунки добавить 1000 мкл прогретого гибридизационного буфера НУВ.

8. Аккуратно покачивая ванночку, перемешать содержимое, цвет должен стать однородным.

9. Стрипы пластиковым пинцетом взять за подписанный край и в соответствии с ориентацией ванночки и выложить по порядку.

10. Все манипуляции выполнять аккуратно, **пинцет не погружать** в раствор во избежание контаминации.

11. Зубочисткой аккуратно поправить стрип в лунке ванночки, если он перевернулся «лицом» вниз.

Ванночку поставить в прибор для гибридизации.

Запустить Программу гибридизации.

Программа 1 – шаг 1 НУВ – 20 минут 45 °С

По окончании инкубации пастеровскими пипетками удалить реагенты из ячеек ванночки. После этого перевернуть ванночку и просушить остатки реактивов на салфетке до тех пор, пока салфетка не перестанет намокать.

12. В вытяжном шкафу добавить отмывочный раствор STR1000 мкл, не касаясь лунок ванночки. Раствор должен быть прогрет до 45 °С. Ванночку поставить в прибор для гибридизации.

Программа 1 – шаг 2 STR – 10 минут 45 °С

По окончании инкубации удалить реагенты из ячеек ванночки, вылить их в емкость с хлорсодержащим раствором, затем резким движением

опустить ванночку (лицом вниз) на свежие салфетки, несколько раз постукивая, удалить остаток реагента до тех пор, пока салфетка не перестанет намокать (чем суше, тем лучше).

13. Добавить приготовленный раствор конъюгата CON – 1000 мкл в каждую лунку

Ванночку поставить в прибор для гибридизации.
Программа 1 – шаг 3 CON – 20 минут 37 °С

По окончании инкубации удалить реагенты из ячеек ванночки, вылить их в емкость с хлорсодержащим раствором, как описано в пункте 13.

14. Добавить отмывочный раствор RIN 1000 мкл в каждую лунку (раствор должен иметь комнатную температуру). Ванночку поставить в прибор для гибридизации.

Программа 1 – шаг 4 RIN – 1 минута 25 °С

По окончании инкубации удалить реагенты из ячеек ванночки, вылить их в емкость с хлорсодержащим раствором, как описано в пункте 13.

15. Добавить для отмывки H₂O – 1000 мкл в каждую лунку.

Ванночку поставить в прибор для гибридизации.
Программа 1 – шаг 5 water – 1 минута 25 °С

По окончании инкубации удалить реагенты из ячеек ванночки, вылить их в емкость с хлорсодержащим раствором, как описано в пункте 13.
16. Визуализация результатов.

Добавить приготовленный проявляющий раствор SUB – 1000 мкл в каждую лунку, ванночку поставить в прибор для гибридизации.

Программа 1 – шаг 6 SUB – от 5 до 20 минут 25 °С

Накрыть поверхность фольгой (внимание, столик прибора для гибридизации не должен покачиваться).

По окончании инкубации удалить реагенты из ячеек ванночки, вылить их в емкость с хлорсодержащим раствором, как описано в пункте 13.

17. Для остановки реакции провести отмывку, добавив 1000 мкл H₂O в каждую лунку, ванночку поставить в прибор для гибридизации.

Программа 1 – шаг 7 water – 1 минута 25 °С

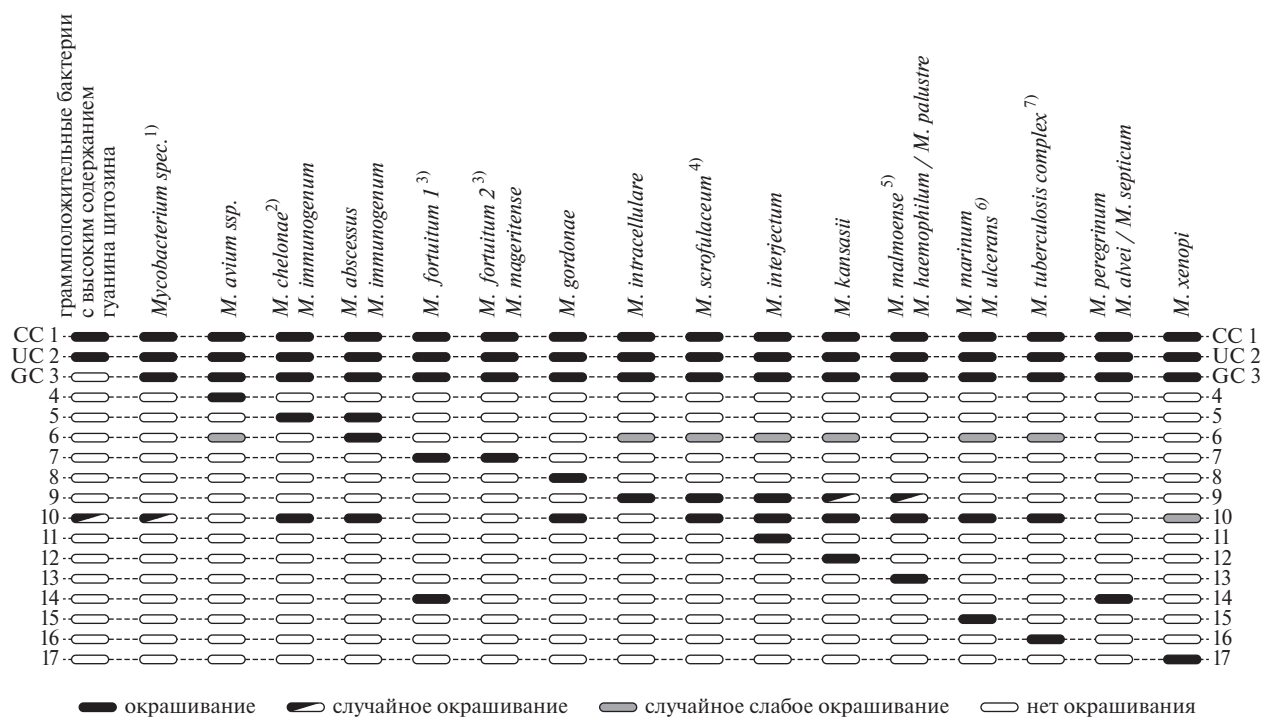


Рисунок 3. Интерпретация GenoType® CM.

Figure 3. GenoType® CM interpretation.

- 1) Виды в дальнейшем возможно дифференцировать набором GenoType Mycobacterium AS.
- 2) В случае, если не окрашиваются полоски GC, то это может быть так же штамм *M. abscessus*.
- 3) На основе различий в зонде *M. fortuitum* подразделяется на 2 группы.
- 4) *M. «paraffinicum»* и *M. parascrofulaceum* показывают те же полоски, что и *M. scrofulaceum*.
- 5) *M. nebraskense*, показывает те же полоски, что и *M. haemophilum*, можно определить набором GenoType Mycobacterium AS.
- 6) *M. ulcerans* можно определить набором GenoType Mycobacterium AS.
- 7) Для дальнейшей дифференциации используется набор GenoType MTBC.

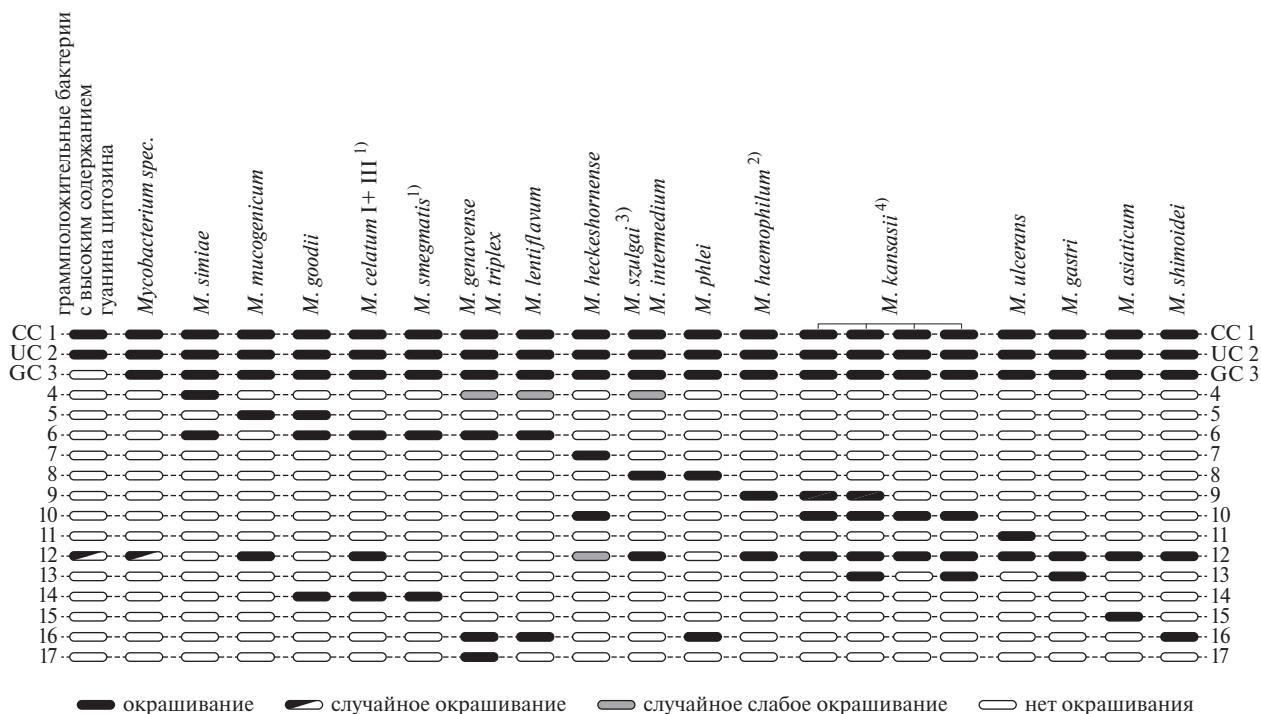


Рисунок 4. Интерпретация GenoType® AS.

Figure 4. GenoType® AS interpretation.

- 1) При использовании бактерий, выросших на жидкой среде, контаминирующие бактерии могут дать такие же сигнальные полосы. Поэтому эти результаты действительны только тогда, когда ДНК была выделена из бактерий, выросших на плотной среде (единичные, морфологически идентичные).
- 2) *M. nebraskense* дает такую же сигнальную полосу, как и *M. haemophilum*.
- 3) Если эта полоса выявилась при использовании набора GenoType *Mycobacterium* AS, то дифференциацию между *M. szulgai* и *M. intermedium* можно проводить, используя набор GenoType *Mycobacterium* CM. *M. szulgai* покажет сигнальные области 1, 2, 3, 10 и 11, а *M. intermedium* будет зафиксирована в областях 1, 2, 3 и 10.
- 4) Из-за вариаций в последовательности возможны 4 различных сигнальных области *M. kansasii*.

По окончании инкубации удалить реагенты из чашек ванночки, вылить их в емкость с хлорсодержащим раствором, как описано в пункте 13.
18. Повторяем пункт 17.

Контроль качества, оценка и интерпретация результатов

Контроль качества

Чтобы убедиться в корректном проведении тестирования и для контроля пригодности реактивов каждый стрип имеет 3 контрольные зоны: зона Контроль Конъюгата (CC) – линия в этой зоне должна быть хорошо проявлена, подтверждая правильность реакции; зона Универсального Контроля (UC) – эта зона выявляет все известные микобактерии и представителей группы грамположительных бактерий с высоким содержанием G+C. Если эта зона и зона контроля конъюгата положительны, но остальные полосы не указывают на

специфическую микобактерию, для идентификации соответствующего вида бактерии нужно использовать дополнительные методы идентификации. Зона Контроля Рода (GC), подтверждает присутствие представителей рода *Mycobacterium*. Интенсивность окрашивания варьирует в зависимости от вида микобактерии. См. таблицу интерпретации GenoType® CMAS (рис. 3, 4).

Ограничения метода

Этот тест может проводиться только обученным высококвалифицированным персоналом, который знаком с молекулярно-биологическими методами.

Как и в любой системе детекции на основе гибридизации, в данной тест-системе допускается возможность того, что по причине высокой вариабельности бактериального генома определенные подтипы не будут распознаны.

Возможные проблемы и их решение

Сплошные слабые сигналы или отсутствие сигналов (включая зону Контроля Конъюгата).

- Комнатная температура слишком низкая, или реактивы не доведены до комнатной температуры. Отсутствует или в недостаточном количестве добавлен CON-C и/или SUB-C.

Слабые сигналы или их отсутствие за исключением зоны Контроля Конъюгата.

- Количество и/или качество выделенной ДНК не позволило пройти реакции амплификации. Проверьте ампликоны в 2%-ном агарозном геле. В случае отсутствия ампликонов повторите выделение ДНК и амплификацию. При необходимости попробуйте другой метод выделения ДНК. Температура инкубации слишком высокая.

Выделенный бактериальный материал не определяется Универсальным Контролем и Контролем Рода.

Негомогенное окрашивание – во время инкубации стрипы не были полностью погружены в раствор, ванночка недостаточно встряхивалась.

Сильное фоновое окрашивание – использовались слишком концентрированные растворы CON-C и/или SUB-C, этапы промывки не были выполнены соответствующим образом, отмывающие растворы слишком холодные.

Учет и документирование результатов

Все бланки со стрипами должны быть заполнены по следующим позициям: дата (число, месяц, год); порядковый номер стрипа; номер лабораторного образца; тип использованного материала. Бланки хранятся в специальных папках учета первичных результатов.

Описывая алгоритм применения существующих лабораторных методов идентификации микобактерий, необходимо подчеркнуть, что эти технологии не являются взаимоисключающими. Кроме того, в условиях ограниченного финансирования все еще сохраняют актуальность некоммерческие лабораторные методы. Примерный алгоритм идентификации может быть представлен следующей схемой (рис. 5).

Следует подчеркнуть, что непрерывное развитие технологий и появление новых методов позволяют с минимальными трудозатратами и в кратчайшие сроки проводить идентификацию возбудителя. Поэтому предложенный здесь алгоритм идентификации микобактерий будет совершенствоваться за счет внедрения новых подходов.

В заключение следует отметить, что микобактериологические лаборатории могут быть эффективными только тогда, когда они своевременно реагируют на быстрое развитие новых

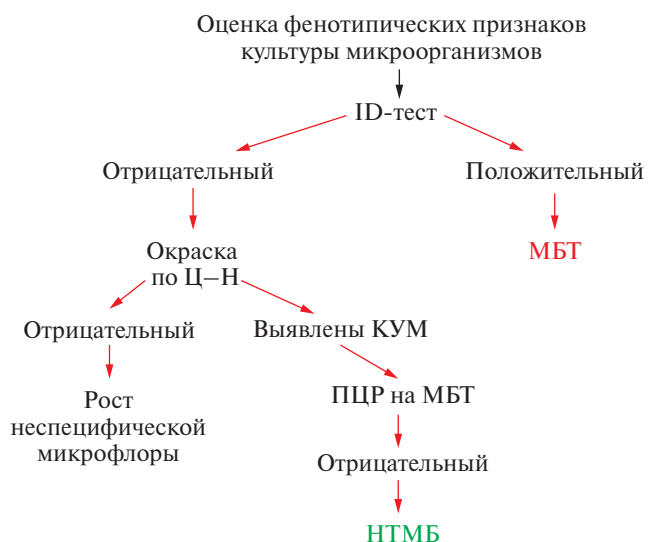


Рисунок 5. Алгоритм идентификации МБТ от НТМБ и неспецифической микрофлоры.

Figure 5. The algorithm for differentiation between MTBC, NTM and non-specific microflora.

технологий и внедряют их в свою повседневную практику. Только совокупность используемых методик может дать ответ о принадлежности выявленного микроорганизма к роду микобактерий и более тонкой дифференциации между МБТ и НТМБ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Севастьянова Э.В., Ларионова Е.Е., Андриевская И.Ю. Выявление микобактерий методом микроскопии препаратов, окрашенных по Цилю–Нильсену. Часть 1. Для микроскопии приготовление и окрашивание препаратов // Вестник ЦНИИТ. 2019. – № 1. – С. 100–108.
2. Севастьянова Э.В., Ларионова Е.Е., Андриевская И.Ю. Выявление микобактерий методом микроскопии препаратов, окрашенных по Цилю–Нильсену. Часть 2. Микроскопическое исследование препаратов // Вестник ЦНИИТ. 2019. – № 2. – С. 81–89.
3. Черноусова Л.Н., Пузанов В.А., Андреевская С.Н., Смирнова Т.Г., Ларионова Е.Е., Попов С.А. Лабораторная диагностика туберкулеза. Методические материалы к проведению цикла тематического усовершенствования / Под редакцией проф. Ерохина В.В. М. – 2012. – 707 с.
4. Черноусова Л.Н., Севастьянова Э.В., Ларионова Е.Е., Смирнова Т.Г., Андреевская С.Н., Попов С.А., Журавлев В.Ю., Пузанов В.А., Марьяндышев А.О., Вахрушева Д.В., Кравченко М.А., Сафонова С.Г., Васильева И.А., Эргешов А.Э. Федеральные клинические рекомендации по организации и проведению микробиологической и молекулярно-генетической диагностики туберкулеза. РОФ. – М. – 2015. – 35 с.

5. Abdeldaim G., Svensson E., Blomberg J., Herrmann B. Duplex detection of the Mycobacterium tuberculosis complex and medically important non-tuberculosis mycobacteria by real-time PCR based on the rnpB gene. *APMIS*, 2016, vol. 124, no. 11, pp. 991–995.
6. Brend A.J., Mugo D., Musyimi R. Scott J.A.G. et al. Performance of the MGIT TBc identification test and meta-analysis of MPT64 assays for identification of the Mycobacterium tuberculosis Complex in liquid culture. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, vol. 49, no. 12, pp. 4343–4346.
7. Chen J.H., Cheng V.C., She K.K., Yam W.C., Yuen K.Y. Application of a dual target PCRhigh resolution melting (HRM) method for rapid nontuberculous mycobacteria identification. *J. Microbiol. Methods*, 2017, vol. 132, pp. 1–3.
8. European Centre for Disease Prevention and Control. Handbook on TB laboratory diagnostic methods for the European Union, Stockholm, ECDC, 2016, 114 p.
9. Favez G. Lung diseases due to atypical mycobacteria. *Schweiz. Med. Wochenschr.*, 1975, vol. 105, no. 31, pp. 987–991.
10. García-Martos P., García-Agudo L., Rodríguez-Jiménez M.J., Rodríguez-Iglesias M. Rapid identification of Mycobacterium tuberculosis complex from broth cultures by immunochromatographic assay. *Rev. Esp. Quimioter.*, 2010, vol. 23, no. 4, pp. 206–209.
11. Gomathi N.S., Devi S.M., Rvindra Sondalagere Lakshmi, Selvakumar Nagamiah et al. Capilia test for identification of Mycobacterium tuberculosis in MGIT (TM)-positive cultures. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 2012, vol. 16, no. 6, pp. 788–792.
12. Gopinath K., Singh S. Multiplex PCR assay for simultaneous detection and differentiation of Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium avium complexes and other Mycobacterial species directly from clinical specimens. *J. Appl. Microbiol.*, 2009, vol. 107, no. 2, pp. 425–435.
13. Hong Y.J., Chung Y.H., Kim T.S., Song S.H., Park K.U., Yim J.J., Song J., Lee J.H., Kim E.C. 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.
14. 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.
15. Middlebrook G., Cohn M.L. Bacteriology of tuberculosis laboratory methods. *Am.J. Public Health Nations Health.*, 1958, vol. 48, no. 7, pp. 844–853.
16. 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.
17. Shrestha N.K., Tuohy M.J., Hall G.S., Reischl U., Gordon S.M., Procop G.W. Detection and differentiation of Mycobacterium tuberculosis and nontuberculous mycobacterial isolates by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, vol. 41, pp. 5121–5126.
18. Ustinova V.V., Smirnova T.G., Sochivko D.G., Varlamov D.A., Larionova E.E., Andreevskaya S.N., Andrievskaya I.Yu., Kiseleva E.A., Chernousova L.N., Ergeshov A. New assay to diagnose and differentiate between Mycobacterium tuberculosis complex and nontuberculous mycobacteria. *Tuberculosis*, 2019, vol. 114, pp. 17–23.
19. Global tuberculosis report. Geneva, WHO, 2019.

REFERENCES

1. Sevastyanova E.V., Larionova E.E., Andrievskaya I.Yu. Microscopic detection of mycobacteria by Ziehl–Neelsen staining technique. Part 1. Smear preparation and staining procedure. *CTRI Bulletin*, 2019, no. 1, pp. 100–108. (In Russ.)
2. Sevastyanova E.V., Larionova E.E., Andrievskaya I.Yu. Microscopic detection of mycobacteria by Ziehl–Neelsen staining technique. Part 2. Sputum smear microscopy. *CTRI Bulletin*, 2019, no. 2, pp. 81–89. (In Russ.)
3. Chernousova L.N., Puzanov V.A., Andreevskaya S.N., Smirnova T.G., Larionova E.E., Popov S.A. Laboratory diagnosis of TB. Educational materials for a refresher cycle. Ed. by V.V. Erokhin. Moscow, 2012, 707 p. (In Russ.)
4. Chernousova L.N., Sevastyanova E.V., Larionova E.E., Smirnova T.G., Andreevskaya S.N., Popov S.A., Zhuravlev V.Yu., Puzanov V.A., Maryandyshev A.O., Vakhrusheva D.V., Kravchenko M.A., Safonova S.G., Vasilyeva I.A., Ergeshov A.E. Federal clinical recommendations for organization and implementation of microbiological and molecular genetic diagnosis of TB. Moscow, ROF, 2015, 35 p. (In Russ.)
5. Abdeldaim G., Svensson E., Blomberg J., Herrmann B. Duplex detection of the Mycobacterium tuberculosis complex and medically important nontuberculosis mycobacteria by real-time PCR based on the rnpB gene. *APMIS*, 2016, vol. 124, no. 11, pp. 991–995.
6. Brend A.J., Mugo D., Musyimi R. Scott J.A.G. et al. Performance of the MGIT TBc identification test and meta-analysis of MPT64 assays for identification of the Mycobacterium tuberculosis Complex in liquid culture. *Journal of Clinical Microbiology*, 2011, vol. 49, no. 12, pp. 4343–4346.
7. Chen J.H., Cheng V.C., She K.K., Yam W.C., Yuen K.Y. Application of a dual target PCRhigh resolution melting (HRM) method for rapid nontuberculous mycobacteria identification. *J. Microbiol. Methods*, 2017, vol. 132, pp. 1–3.
8. European Centre for Disease Prevention and Control. Handbook on TB laboratory diagnostic methods for the European Union, Stockholm, ECDC, 2016, 114 p.
9. Favez G. Lung diseases due to atypical mycobacteria. *Schweiz. Med. Wochenschr.*, 1975, vol. 105, no. 31, pp. 987–991.
10. García-Martos P., García-Agudo L., Rodríguez-Jiménez M.J., Rodríguez-Iglesias M. Rapid identification of Mycobacterium tuberculosis complex from broth cultures by immunochromatographic assay. *Rev. Esp. Quimioter.*, 2010, vol. 23, no. 4, pp. 206–209.

11. Gomathi N.S., Devi S.M., Rvindra Sondalagere Lakshmi, Selvakumar Nagamiah et al. Capilia test for identification of Mycobacterium tuberculosis in MGIT (TM)-positive cultures. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 2012, vol. 16, no. 6, pp. 788–792.
12. Gopinath K., Singh S. Multiplex PCR assay for simultaneous detection and differentiation of Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium avium complexes and other Mycobacterial species directly from clinical specimens. *J. Appl. Microbiol.*, 2009, vol. 107, no. 2, pp. 425–435.
13. Hong Y.J., Chung Y.H., Kim T.S., Song S.H., Park K.U., Yim J.J., Song J., Lee J.H., Kim E.C. 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.
14. 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.
15. Middlebrook G., Cohn M.L. Bacteriology of tuberculosis laboratory methods. *Am. J. Public Health Nations Health.*, 1958, vol. 48, no. 7, pp. 844–853.
16. 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.
17. Shrestha N.K., Tuohy M.J., Hall G.S., Reischl U., Gordon S.M., Procop G.W. Detection and differentiation of Mycobacterium tuberculosis and nontuberculous mycobacterial isolates by real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, vol. 41, pp. 5121–5126.
18. Ustinova V.V., Smirnova T.G., Sochivko D.G., Varlamov D.A., Larionova E.E., Andreevskaya S.N., Andrievskaya I.Yu., Kiseleva E.A., Chernousova L.N., Ergeshov A. New assay to diagnose and differentiate between Mycobacterium tuberculosis complex and nontuberculous mycobacteria. *Tuberculosis*, 2019, vol. 114, pp. 17–23.
19. Global tuberculosis report. Geneva, WHO, 2019.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»
107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2

Ларионова Елена Евгеньевна – к.б.н., старший научный сотрудник отдела микробиологии
Тел.: +7 (499) 785-90-91
E-mail: larionova_lena@mail.ru

Андреевская Софья Николаевна – к.м.н., старший научный сотрудник отдела микробиологии
Тел.: +7 (499) 785-90-91
E-mail: andsofia@mail.ru

Смирнова Татьяна Геннадьевна – к.м.н., зав. отделом микробиологии
Тел.: +7 (499) 785-90-91
E-mail: s_tatka@mail.ru

Севастьянова Элина Викторовна – д.б.н., ведущий научный сотрудник отдела микробиологии
Тел.: +7 (499) 785-90-91
E-mail: elinasev@yandex.ru

Чернусова Лариса Николаевна – д.б.н. профессор, главный научный сотрудник отдела микробиологии
Тел.: +7 (499) 785-90-91
E-mail: lchernousova@mail.ru

FOR CORRESPONDENCE:

Central TB Research Institute
2, Yauzskaya alley, 107564, Moscow, Russia

Elena E. Larionova, Candidate of Biological Sciences, Senior Researcher, Microbiology Department
Tel.: +7 (499) 785-90-91
E-mail: larionova_lena@mail.ru

Sofia N. Andreevskaya, Candidate of Medical Sciences, Senior Researcher, Microbiology Department
Tel.: +7 (499) 785-90-91
E-mail: andsofia@mail.ru

Tatiana G. Smirnova, Candidate of Medical Sciences, Head, Microbiology Department
Tel.: +7 (499) 785-90-91
E-mail: s_tatka@mail.ru

Elina V. Sevastyanova, Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher, Microbiology Department
Tel.: +7 (499) 785-90-91
E-mail: elinasev@yandex.ru

Larisa N. Chernousova, Doctor of Biological Sciences, Professor, Principal Researcher, Microbiology Department
Tel.: +7 (499) 785-90-91
E-mail: lchernousova@mail.ru