**Требования к оформлению тезисов**

**Уважаемые коллеги, обращаем Ваше внимание на то, что авторами и соавторами тезисов могут быть только ученые в возрасте до 40 лет. Научный руководитель работы (при наличии) будет указан в публикации отдельной строкой.**

Подача тезисов для опубликования не является заявкой на выступление с докладом.

**ОБЪЕМ** тезисов – не более 4 печатных страниц формата А4, шрифт Times New Roman, кегль 12, межстрочный интервал 1,5, поля стандартные, выравнивание «по ширине», перенос слов – автоматический.

**СТРУКТУРА**

Строка 1: заголовок - прописные буквы жирным шрифтом

Строка 2: фамилии и инициалы авторов жирным шрифтом

Строка 3: полное название учреждения (без указания кафедры или отдела) с указанием города и страны - курсивом. Авторы, работающие в разных учреждениях, нумеруются цифрами (1, 2 и т.д.) после инициалов автора в соответствии с названием учреждения.

Символы и сокращения при первом их использовании расшифровываются. В заголовке сокращения не допускаются. В тексте разрешается размещение одной таблицы. Сокращения, используемые при составлении таблиц, выносятся в примечание после таблицы. Рисунки, диаграммы и фотографии в тексте не допускаются.

**РАЗДЕЛЫ:** цель исследования, материалы и методы, результаты, заключение (или выводы). Названия разделов выделяются жирным шрифтом.

**КОНТАКТНЫЕ ДАННЫЕ** первого автора должны быть приложены отдельным файлом по форме (Приложение № 2).

Название файла электронной версии тезисов формируется из ФИО первого автора, например, Иванов ИИ. Тезисы принимаются в электронном виде в формате Word (расширения .doc или .docx).

**ТРЕБОВАНИЯ К ФОТО:** к тезисам должно быть приложено **ЦВЕТНОЕ** фото первого автора.Допускаются форматы: **PNG, TIFF, JPEG**. **Фотографии в формате Word – не допускаются!** Уважаемые авторы, при изготовлении фото помните, что оно будет размещено в печатном сборнике, и его увидит множество людей.

Срок подачи тезисов – до **20 февраля 2020 г.**

**ОБРАЗЕЦ**

**РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ТЕХНОЛОГИИ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ ДЛЯ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ НТМБ**

**Устинова В.В.**

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

**Цель исследования:** во всем мире растет заболеваемость микобактериозом. Для развитых стран отмечают корреляцию сокращения числа случаев заболевания туберкулезом и увеличения заболеваемости микобактериозом. Клинические симптомы микобактериоза легких сходны с таковыми туберкулеза и хронических заболеваниях органов дыхания, а этиологический фактор микобактериоза, нетуберкулезные микобактерии (НТМБ), обладают устойчивостью к большинству противотуберкулезных препаратов (ПТП), поэтому важно вовремя дифференцировать их от микобактерий туберкулеза (МБТ). На сегодняшний день известно около 40 видов патогенных НТМБ, вызывающих микобактериоз. При этом для назначения адекватной химиотерапии врачу необходимо знать видовую принадлежность микобактерии, т.к. для разных видов характерен разный спектр устойчивости к лекарственным препаратам. В России зарегистрированы только два набора для видовой идентификации НТМБ производства немецкой компании Hain Lifescience, основанной на ПЦР с последующей гибридизацией продуктов реакции со специфическими зондами, иммобилизованными на нейлоновую мембрану. Эти тест-системы имеют ряд ограничений, главными из которых являются высокая стоимость исследования, длительное время проведения анализа и трудоемкость процесса постановки теста. В связи с этим целью нашего исследования стала разработка отечественной тест-системы для видовой идентификации НТМБ, распространенных на территории РФ. За основу разрабатываемой была принята технология ПЦР в режиме реального времени, позволяющая избежать недостатков существующих на отечественном рынке тест-систем.

**Материалы и методы**

Для выбора наиболее распространенных на территории РФ видов НТМБ была проанализирована видовая принадлежность штаммов НТМБ, полученных от больных с подозрением на туберкулез и микобактериоз, проходивших диагностику в ФГБНУ «ЦНИИТ» и лабораториях 17 региональных центров РФ. Штаммы были культивированы в автоматической системе учета роста культур Bactec MGIT 960. Биоинформатический поиск участков геномов для видовой идентификации НТМБ проводили с использованием он-лайн версии ПО Artemis (//www.webact.org/WebACT/generate) и NCBI protein-protein blast. Выравнивание нуклеотидных последовательностей проводили по алгоритму Muscle в ПО Ugene UniPro. Видовая принадлежность штаммов НТМБ была определена с использованием тест-систем GenoTypeCM и GenoTypeAS (Hain Lifescience, Германия). Для оценки внутривидовой вариабельности выбранных областей геномов были отобраны штаммы для каждого вида НТМБ из коллекции отдела микробиологии ФГБНУ «ЦНИИТ», выделенных от разных больных в период с 2013-2017 г.: 25 штаммов *M. avium*, 22 - *M. abscessus*, 21 - *M. chelonae*, 15 - *M. fortuitum*, 20 – *M. gordonae*,27 *- M. intracellulare*, 22 – *M. kansasii*, 25 – *M. lentiflavum*, 3 – *M. mucogenicum*, 4 – *M.peregrinum*, 2 – *M. smegmatis*, 15 – *M. xenopi* (всего 201 штамм НТМБ)*.* Наработку ПЦР-фрагментов с использованием подобранных праймеров для дальнейшего секвенирования проводили в амплификаторе CFX96-Touch (Biorad, США) при следующих условиях: активация 95°С - 5 мин., далее 35 циклов: 95°С - 15 сек., 61°С - 30 сек., 72°С – 30 сек.; финальная элонгация 72°С – 15 мин. Очистку полученных ПЦР-продуктов проводили электрофорезом в 1% агарозном геле с использованием набора реагентов DNA purification kit (Omnix, Санкт-Петербург), либо ферментативно. Далее проводили циклическое секвенирование по Сэнгеру с набором ABI PRISM BigDye Terminator v.1.3 («Applied Biosystems», США), согласно инструкции производителя с последующим разделением продуктов реакции капиллярным гель-электрофорезом на генетическом анализаторе «Нанофор-05» («Синтол», Россия). Полученные в результате секвенирования последовательности были добавлены в выравнивания, выполненные на предыдущем этапе. Подбор праймеров и Taq-Man зондов для секвенирования и для видовой идентификации НТМБ проводили с помощью ПО Primer3.

**Результаты**

Результаты анализа наиболее часто встречающихся видов НТМБ на территории РФ представлены в таблице. По итогам анализа для разработки тест-системы были отобраны следующие виды: *M. avium*, *M.* *abscessus,* *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. lentiflavum*, *M. mucogenicum*, *M. peregrinum*, *M. smegmatis*, *M. xenopi, M. malmoense.* Были выбраны участки геномов НТМБ для видовой идентификации, не использовавшиеся ранее, и выполнены их выравнивания. На основе выравниваний были подобраны праймеры для их прямого секвенирования. По результатам секвенирования была проведена оценка внутривидовой вариабельности выбранных участков геномов в клинических штаммах НТМБ и группировка видов для минимизации количества дифференцирующих смесей праймеров и зондов. Были разработаны системы видоспецифичных праймеров и зондов, учитывающие внутривидовую вариабельность НТМБ, выбранных для создания тест-системы. На сегодняшний день разработано 4 смеси, позволяющие выявлять каждая ДНК 3-х видов НТМБ и ДНК внутреннего положительного контроля. Первая смесь позволяет выявлять ДНК *M. avium, M. intracellulare, M. xenopi*; вторая – ДНК *M. kansasii, M. gordonae, M. lentiflavum*; третья – ДНК *M. abscessus, M. chelonae, M. mucogenicum*; четвертая – ДНК *M. fortuitum*, *M. peregrinum* и *M. smegmatis.*

**Таблица.** Виды НТМБ, выделенные из культур от больных, использованных для анализа распространенности видов НТМБ на территории РФ

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Вид НТМБ | Число больных | Процент наиболее часто встречающихся видов НТМБ |
| *M. avium* | 223 | 27,6 |
| *M. lentiflavum* | 127 | 15,4 |
| *M. intracellulare* | 111 | 13,5 |
| *M. gordonae* | 77 | 9,4 |
| *M. fortuitum* | 76 | 9,2 |
| *M. abscessus* | 62 | 7,5 |
| *M. kansasii* | 53 | 6,4 |
| *M. xenopi* | 39 | 4,7 |
| *M. chelonae* | 18 | 2,2 |
| *M. peregrinum* | 10 | 1,2 |
| *M. malmoense* | 8 | 1 |
| *M. smegmatis* | 4 | 0,5 |
| *M. mucogenicum* | 3 | 0,4 |
| *M. szulgai* | 2 | 0,2 |
| *M. interjectum* | 2 | 0,2 |
| *M. scrofulaceum* | 1 | 0,1 |
| *M. simiae* | 1 | 0,1 |
| *M. arupense* | 1 | 0,1 |
| *M. kumamotenense* | 1 | 0,1 |
| Всего | 822 | 100,0 |

Для предварительной оценки специфичности разработанного прототипа тест-системы для видовой идентификации НТМБ были использованы 201 штамм НТМБ, 16 штаммов МБТК и 14 штаммов микроорганизмов, не относящихся к микобактериям, из коллекции отдела микробиологии ФГБНУ «ЦНИИТ». Была показана 100% специфичность реакционных смесей.

**Заключение**

Разработан прототип тест-системы для видовой идентификации НТМБ, наиболее распространенных на территории РФ. На данный момент тест-система проходит клинические испытания в отделе микробиологии ФГБНУ «ЦНИИТ».

**Устинова Вера Витальевна,** младший научный сотрудник отдела микробиологии ФГБНУ «Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза»,

107564, г. Москва, Яузская аллея, д. 2

Тел.: +7 (ХХХ) ХХХ ХХХХ, e-mail: gmail@gmail.com