О. А. Журило, А. І. Барбова, П. С. Трофімова, С. В. Миронченко, Л. М. Сладкова СПОСІБ ВИДОВОЇ ІДЕНТИФІКАЦІЇ НЕТУБЕРКУЛЬОЗНИХ МІКОБАКТЕРІЙ ПРИ НАЯВНОСТІ КИСЛОТОСТІЙКИХ МІКОБАКТЕРІЙ В МОКРОТИННІ ХВОРОГО

ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»

Дніпропетровська медична академія МОЗ України

СПОСОБ ВИДОВОЙ ИДЕНТИФИКАЦИИ НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ ПРИ НАЛИЧИИ КИСЛОУСТОЙЧИВЫХ МИКОБАКТЕРИЙ В МОКРОТЕ БОЛЬНОГО

А. А. Журило, А. И. Барбова, П. С. Трофимова, С. В. Миронченко,
Л. М. Сладкова

Резюме

Цель исследования – повышение эффективности и стандартизация методов лабораторной диагностики микобактериозов путем разработки способа видовой ускоренной идентификации нетуберкулезных микобактерий (НТМБ) в условиях бактериологических лабораторий.

Материалы и методы. Объектом исследования была мокрота от пациентов с подозрением на туберкулез/микобактериоз.

Для фенотипической идентификации НТМБ использовали два подхода – классический с использованием биохимической и культуральной идентификации и современный с применением идентификационного иммунохроматографического теста BD MGIT TBc ID или STANDARD Q TB MPT64 Ag Test (производство SD Biosensor INC., Корея) для определения антигена MPT64, специфического для комплекса *M. tuberculosis*.

Генотипическую видовую идентификацию НТМБ осуществляли с помощью ДНК-стрип технологии Hain Lifescience (Германия) с использованием набора GenoType® Mycobacterium CM.

Результаты. Разработан способ видовой идентификации НТМБ при наличии кислотоустойчивых микобактерий в мокроте больного, в котором путем использованием современных генетических методов достигается сокращение срока их идентификации. Для решения задачи использовали две молекулярно-генетические системы – GeneXpert Ultra и GenoType Mycobacterium CM. Применение системы GeneXpert Ultra позволяет выявить наличие только микобактерий туберкулезного комплекса и очень быстро – в течение 1,5 часов. При наличии кислотоустойчивых микобактерий в исследуемом осадке, по результатам световой микроскопии и отрицательном результате исследования в системе GeneXpert Ultra, посев осадка мокроты в жидкую питательную среду Middlebrook 7H9 в системе BACTEC MGIT для получения чистой культуры микобактерий с последующим исследованием в системе GenoType Mycobacterium CM позволяет идентифицировать НТМБ методом линейного анализа ДНК зондами (LIPA), который предназначен для проведения амплификации ДНК и последующей гибридизацией на нейлоновых мембранах, так называемых ДНК-стрипах с маркерными олигонуклеотидными зондами. Применение предложенных в алгоритме исследования диагностических систем в способе позволяет существенно сократить срок исследования – до 2-х рабочих дней и идентифицировать виды НТМБ часто встречающиеся и клинически значимые.

Вывод. Разработан способ видовой идентификации НТМБ при наличии кислотоустойчивых микобактерий в мокроте больного. Позволяет сократить срок идентификации НТМБ с 4-х недель до 2-х рабочих дней.

Ключевые слова: микобактериоз, диагностика, нетуберкулезные микобактерии, идентификация, GenoType Mycobacterium CM/AS, ДНК-стрипы.

Укр. пульмонолог. журнал. 2020, № 3. С. 58–62.

Журило Олександр Анатолійович
ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології
ім. Ф. Г. Яновського НАМН України»
Зав. лабораторією мікробіології і біохімії туберкульозу
Д-р. мед. наук, професор
10, вул. М. Амосова, Київ, 03038, Україна, тел: +38(044) 275-54-30

METHOD OF NON-TUBERCULOSIS MYCOBACTERIA SPECIES IDENTIFICATION IN THE PRESENCE OF ACID-RESISTANT MYCOBACTERIA IN THE SPUTUM OF THE PATIENT

O. A. Zhurilo, A. I. Barbova, P. S. Trofimova, S. V. Mironchenko,
L. M. Sladkova

Abstract

The aim of study was to improve the efficiency and standardization the methods of laboratory diagnostics of mycobacteriosis by developing a method for the specific accelerated identification of non-tuberculosis Mycobacterium tuberculosis (NTMB) at bacteriological laboratories.

Materials and methods. The object of the study was sputum from patients with suspected tuberculosis/mycobacteriosis.

For the phenotypic identification of NTMB, two approaches were used: the classical – using biochemical and cultural identification, and the modern – using the BD MGIT TBc ID or STANDARD Q TB MPT64 Ag Test identification immunochromatographic test (manufactured by SD Biosensor INC., Korea) to determine the MPT64 antigen specific for the complex *M. tuberculosis*.

Genotypic species identification of NTMBs was performed using DNA strip technology by Hain Lifescience (Germany) using the GenoType® Mycobacterium CM kit.

Results. A method has been developed for the specific identification of NTMBs in the presence of acid-resistant mycobacteria in the sputum of the patient, in which, using modern genetic methods, a reduction in the period of their identification was achieved. To solve the problem, two molecular genetic systems were used – GeneXpert Ultra and GenoType Mycobacterium CM. The use of the GeneXpert Ultra system makes it possible to detect only tuberculosis complex mycobacteria very quickly within 1.5 hours. In the presence of acid-resistant mycobacteria in the test sediment, according to the results of light microscopy and a negative test result in the GeneXpert Ultra system, inoculation of sputum sediment in the Middlebrook 7H9 liquid nutrient medium in the WASTEC MGIT system to obtain a pure mycobacterium culture followed by examination in the GenoType Mycobacterium CM system allowed the identification of DNA probes linear analysis method (LIPA), which was designed for DNA by amplification and subsequent hybridization on nylon membranes, the so-called DNA-strips with marker oligonucleotide probes. The application of the diagnostic systems, proposed in this study algorithm can significantly reduce the study time – up to 2 working days and identify NTMB types that are frequently encountered and clinically significant.

Conclusion. A method for the specific identification of NTMB in the presence of acid-resistant mycobacteria in the sputum of the patient has been developed. It allows to shorten the identification period of NTMB from 4 weeks to 2 working days.

Key words: mycobacteriosis, diagnostics, non-tuberculous mycobacteria, identification, GenoType Mycobacterium CM/AS, DNA-strips.

Ukr. Pulmonol. J. 2020; 3: 58–62.

Aleksandr A. Zhurilo
SI "National institute of phthisiology and pulmonology named
after F. G. Yanovsky NAMS of Ukraine"
Chief of laboratory of microbiology and biochemistry of tuberculosis.
Doctor of medicine, professor
10, M. Amosova str., Kyiv, Ukraine, tel: +38(044) 275-54-30

У світі все більше уваги приділяється інфекційним процесам, викликаним нетуберкульозними мікобактеріями (НТМБ). Це пов'язано зі збільшенням числа випадків захворювання мікобактеріозами в різних регіонах світу [1-6]. Мікобактеріози представляють серйозну проблему як для лікарів-клініцистів, так і для фахівців лабораторної служби. Значна різноманітність збудників, складності проведення преаналітичного етапу, неоднозначність методів мікроскопічного дослідження і культивування, впровадження в практику принципово нових методів ідентифікації вимагають розробки нормативних документів, що регламентують алгоритми лабораторної діагностики і ідентифікації етіологічно-значимих НТМБ. Особливо гостро це питання стоїть у зв'язку зі значним підйомом захворюваності ВІЛ-інфекцією і збільшенням кількості пацієнтів з вираженими імунodefіцитами [10].

Для диференціації видів НТМБ раніше були доступні тільки біохімічні тести, які не є стандартизованими, мають недостатню чутливість і специфічність та вкрай трудомісткі [7]. Зараз у всьому світі широко застосовують генетичні методи визначення видів НТМБ, у тому числі GenoType Mycobacterium CM/AS (Hain Lifescience, Німеччина), який визнаний зручним для рутинної мікробіологічної практики і дозволяє визначати основні види НТМБ [8, 10].

В практику роботи впроваджуються різноманітні схеми фено- і генотипічної діагностики НТМБ. Це необхідно для того, щоб максимально скоротити терміни ідентифікації мікобактерій. Скорочення термінів виявлення збудника, видової ідентифікації мікобактерій може бути досягнуто за рахунок застосування у лабораторній практиці молекулярно-генетичних методів [8–10].

Важливе значення в ефективності діагностики мікобактеріозів має вдосконалення методів. Поява високоспецифічних і високочутливих методів ідентифікації НТМБ, а саме: культивування в автоматизованих системах з використанням рідких поживних середовищ і молекулярно-генетичні методи значно розширили можливості лабораторної діагностики. Усе це дозволило підвищити швидкість і якість діагностики мікобактеріозів [9].

Мета дослідження: підвищення ефективності і стандартизація методів лабораторної діагностики мікобактеріозів шляхом розробки способу видової прискореної ідентифікації НТМБ в умовах бактеріологічних лабораторій.

Матеріали і методи дослідження

Дослідження проводилось у лабораторії мікробіології і біохімії Державної установи «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського НАМН України» за кошти держбюджету.

Об'єктом дослідження було мокротиння від пацієнтів з підозрою на туберкульоз/мікобактеріоз.

Для фенотипічної ідентифікації НТМБ здійснювали два підходи – класичний з використанням біохімічної та культуральної ідентифікації та сучасний із застосуванням ідентифікаційного імунохроматографічного тесту.

При проведенні первинної фенотипічної ідентифікації відмічали такі властивості мікобактерій: морфологію

колоній, швидкість росту, здібність до утворення пігменту, кислотостійкість, ріст при різних температурах, ріст на середовищі з саліциловокислим натрієм. При аналізі результатів культурального дослідження відмічали строк появи росту культури на щільному середовищі, спроможність утворення пігменту в термостаті чи на світлі. Остаточна ідентифікація складалася з культуральних і деяких біохімічних тестів: визначення термостійкої каталази при 68 °С, гідролізу твіну-80, тесту редукції нітратів, ріст на середовищі з тібоном.

Сучасна імунохроматографічна ідентифікація мікобактерій з усіх позитивних культур, отриманих при проведенні культуральних досліджень на рідких або щільних поживних середовищах, передбачала наступний алгоритм дій: приготування препаратів для бактеріоскопічного дослідження та забарвлення їх за Цілем-Нільсеном для визначення кислотостійкості культури [7, 10]. При наявності кислотостійких бактерій проводили дослідження за допомогою імунохроматографічного тесту BD MGIT TBc ID або STANDARD Q TB MPT64 Ag Test (виробництво SD Biosensor INC., Корея) для визначення антигену MPT64, специфічного для комплексу *M. tuberculosis* [11]. При негативному результаті імунохроматографічного тесту робили висновок про наявність кислотостійких бактерій, що не відносяться до комплексу *M. tuberculosis*. Такі мікобактерії були відібрані для молекулярно-генетичної ідентифікації.

Генотипічну видову ідентифікацію НТМБ здійснювали за допомогою ДНК-стріп технології Hain Lifescience (Німеччина) з використанням набору GenoType® Mycobacterium CM, що ідентифікують *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* і МБТ та набору GenoType® Mycobacterium AS, що ідентифікує *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. gastri*, *M. asiaticum* і *M. shimoidei*.

Результати та їх обговорення

Нами було поставлене завдання розробити спосіб видової ідентифікації НТМБ при наявності кислотостійких мікобактерій в мокротинні хворого, в якому шляхом використання сучасних генетичних методів досягається скорочення терміну їх ідентифікації. Для вирішення завдання використали дві молекулярно-генетичні системи — GeneXpert Ultra і GenoType Mycobacterium CM.

Відомо, що клітинна стінка мікобактерій має схожі ознаки, властиві грампозитивним мікроорганізмам, проте на відміну від них містить значно більшу кількість ліпідів. Цей факт істотно впливає на сприйняття основних барвників, які застосовуються при бактеріоскопічному дослідженні нативного і обробленого матеріалу, а також чистих культур мікобактерій. Практично у всіх мікобактерій відсутня чутливість до анілінових барвників, що само собою створює додаткові труднощі в діагностиці мікобактеріозів. Застосування спеціального методу забарвлення за Цілем-Нільсеном дає можливість вия-

вити мікобактерії в клінічному матеріалі, але, на жаль, не дозволяє визначити їх видову належність.

В процесі роботи щодо розробки способу видової ідентифікації НТМБ були відібрані 234 проби мокротиння, в зразках яких виявлялись кислотостійкі бактерії з різним ступенем градації позитивного результату за методом світлової мікроскопії за Ціль-Нільсеном.

В подальшій роботі із застосуванням генетичної системи GeneXpert Ultra були досліджені всі зразки. В ході дослідження в системі GeneXpert Ultra з 234 зразків мокротиння МБТ-комплекс містили 220 зразків мокротиння. При цьому 14 проб мокротиння позитивних за результатами світлової мікроскопії не містили МБТ-комплекс. В подальшому, ці 14 проб були посіяні в рідке поживне середовище Middlebrook 7H9 в системі BACTEC MGIT для отримання чистої культури мікобактерій. Отримані чисті культури мікобактерій були ідентифіковані двома методами: генетичним, згідно запропонованого способу, та фенотипічним, згідно загальноприйнятої методики [10].

В першому випадку проби досліджувались в системі GenoType Micobacterium CM з використанням ДНК-стрипової технології. Протягом 2-х робочих днів були отримані результати, які наведені в табл. 1.

Біохімічний профіль і морфологічні властивості дослідних штамів порівнювали з даними табл. 2, щоб визначити видову належність НТМБ.

Дані генетичної і фенотипічної ідентифікації видів НТМБ повністю співпали, але проведення біохімічної ідентифікації потребувало 4-х тижнів, тобто видова належність виділених штамів була встановлена фенотипічним методом на 4 тижні пізніше.

Застосування системи GeneXpert Ultra дозволяє виявити наявність тільки мікобактерій туберкульозного комплексу і дуже швидко – протягом 1,5 годин. При наявності кислотостійких мікобактерій в осаді, що досліджується, за результатами світлової мікроскопії і негативному результаті дослідження в системі GeneXpert Ultra, посів осаду мокротиння в рідке поживне середо-

Таблиця 1

Результати дослідження чистих культур мікобактерій в системі GenoType Micobacterium CM, позитивних за світловою мікроскопією та негативних в системі GeneXpert Ultra

Чисті культури мікобактерій в рідкому середовищі	Генетична ідентифікація мікроорганізмів
1	<i>M. avium</i>
2	<i>M. avium</i>
3	<i>M. kansasii</i>
4	<i>M. xenopi</i>
5	<i>M. intracellulare</i>
6	<i>M. avium</i>
7	<i>M. intracellulare</i>
8	<i>M. intracellulare</i>
9	<i>M. avium</i>
10	<i>M. xenopi</i>
11	<i>M. kansasii</i>
12	<i>M. kansasii</i>
13	<i>M. avium</i>
14	<i>M. avium</i>

вище Middlebrook 7H9 в системі BACTEC MGIT для отримання чистої культури мікобактерій з наступним дослідженням в системі GenoType Micobacterium CM дозволяє ідентифікувати НТМБ

методом лінійного аналізу ДНК-зондами (LIPA), який призначений для проведення ампліфікації ДНК і подальшої гібридизації на нейлонових мембранах, так званих ДНК-стрипах з маркерними олігонуклеотидними зондами. Застосування запропонованих в алгоритмі дослідження діагностичних систем за цим способом дозволяє суттєво скоротити термін дослідження – до 2-х робочих днів та ідентифікувати види НТМБ, що часто зустрічаються і є клінічно-значимі, а саме: *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* та *M. xenopi*.

Таблиця 2

Результати дослідження чистих культур мікобактерій фенотипічним методом, позитивних за світловою мікроскопією

Властивості культури	<i>M. avium</i>	<i>M. xenopi</i>	<i>M. kansasii</i>	<i>M. malmoense</i>	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. terrae complex</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. simiae</i>	<i>M. smegmatis</i>	<i>M. vaccae</i>
Швидкість росту	П	П	П	П	П	П	П	Ш	Ш	П	Ш	Ш
Пігментація колоній	Н	С	Ф	Н	С	Н	С	Н	Н	Ф	Н	С
Ріст при температурі:												
22 °C	±	±	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45 °C	±	+	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–
Відновлення нітратів	–	–	+	–	–	±	–	+	–	–	+	+
Дегідрогенізація саліцилового натрію	–	–	–	–	–	–	–	+	±	–	–	–
Каталаза 68 °C	+	±	+	±	+	+	+	+	±	+	+	+
Гідроліз Твіну 80	–	–	+	+	–	+	+	–	–	–	+	+
Ріст на середовищі з 5,0 % NaCl	–	–	–	–	–	±	–	+	В	–	+	В

Примітки: П – повільно зростаючі, Ш – швидкозростаючі, Н – не хромогенні, С – скотохромогенні, Ф – фотохромогенні, В – варіює; «+» – наявність ознаки, «–» – відсутність ознаки, «±» – признак варіює.

Спосіб спрямований на ідентифікацію НТМБ з діагностичного матеріалу хворих з використанням сучасних генетичних підходів. У цьому способі здійснюється видова ідентифікація НТМБ при наявності кислотостійких мікобактерій в мокротинні хворого. Спосіб включає деконтамінацію і розрідження патологічного матеріалу від хворих, центрифугування мокротиння, приготування мазків і забарвлення їх за методом Ціля-Нільсена з наступною світловою мікроскопією осаду, отримання чистої культури мікобактерій шляхом посіву на рідке поживне середовище Middlebrook 7H9 в системі BACTEC MGIT, згідно корисної моделі, здійснюють дослідження осаду мокротиння в системі GeneXpert Ultra і при наявності кислотостійких мікобактерій в осаді за результатами світлової мікроскопії і негативному результаті дослідження в системі GeneXpert Ultra, проводять дослідження чистої культури мікобактерій в системі GenoType *Mycobacterium* CM (Common *Mycobacteria*) з використанням ДНК-стрипової технології з наступною оцінкою результатів.

При роботі з мокротинням після проведення його деконтамінації і гомогенізації з використанням *N*-ацетил-*L*-цистеїну і гідроксиду натрію та з наступним центрифугуванням в холодовій центрифугі при 3500 об/хв протягом 20 хв, отриманий осад має бути ресуспендований в 1,0–1,5 мл фосфатного буферу. Після обробки та ресуспендування мокротиння необхідно виконати наступні маніпуляції:

На скельце наносять 1–2 краплі ресуспендованого осаду, розподіляючи його тонким шаром в центрі скла на площі приблизно 1,0–2,0 см x 2,0–3,0 см. Приготовані мазки висушують при кімнатній температурі до висихання у шафі біологічної безпеки (ШББ). Фіксацію мазків проводять при температурі 65–75 °C не менше, як 1 годину із застосуванням електронагрівача для сушки предметних скелець. Висушений і зафіксований мазок забарвлюють за методом Ціля-Нільсена і переглядають в світловому мікроскопі за загальноприйнятою методикою.

Із ресуспендованого осаду проби роблять дослідження в системі GeneXpert Ultra. Для цього поміщають у чисту пробірку з кришкою, що загвинчується, 0,5 мл осаду для здійснення попередньої підготовки проби для дослідження у картриджі GeneXpert Ultra. До 0,5 мл осаду додають 1,5 мл реактиву для зразків. Енергійно перемішують і залишають для інкубації у штативі у ШББ при кімнатній температурі впродовж 15 хв. За цей проміжок часу необхідно 1–2 рази ретельно перемішати вміст пробірки. Після експозиції переносять 2,0 мл суміші у картридж GeneXpert Ultra, поміщають його в аналізатор GeneXpert Ultra і запускають відповідну програму виконання тесту.

В разі наявності кислотостійких мікобактерій в осаді за результатами світлової мікроскопії і негативному результаті в аналізаторі GeneXpert Ultra проводять посів осаду мокротиння в рідке поживне середовище Middlebrook 7H9 в системі BACTEC MGIT для отримання чистої культури мікобактерій. Після отримання чистої культури мікобактерій здійснюють ідентифікацію видів НТМБ за допомогою генетичної системи GenoType

Mycobacterium CM з використанням ДНК-стрипової технології з наступною оцінкою результатів.

Процедура проведення тесту складається з трьох етапів: виділення ДНК, мультиплексна ампліфікація з біотинильованими праймерами, реверс-гібридизація.

Гібридизація включає наступні етапи: хімічна денатурація продуктів ампліфікації; гібридизація одноланцюгових ампліконів, які помічені біотином, на мембранозв'язаних зондах; ретельна промивка; додавання кон'югату стрептавідину/лужної фосфатази (реакція забарвлення).

Виділення ДНК.

1. 0,7 мл осаду з бактеріями ресуспендують на вортексі в 300 мл деіонізованої води в пробірці з кришкою, що загвинчується.

2. Інкують пробірки з бактеріями на водяній бані 20 хв при 95 °C.

3. Обробляють пробу в ультразвуковій бані протягом 15 хв.

4. Центрифугують пробу на максимальній швидкості 5 хв, та використовують для полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) 5,0 мл супернатанту.

Ампліфікація.

Готують ампліфікаційну суміш (по 45,0 мл) в чистій від ДНК кімнаті. Зразки ДНК вносять в пробірки із сумішшю також в окремому приміщенні.

При використанні HotStar ДНК-полімерази від Qiagen на один зразок необхідно наступні кількості реагентів:

- 35,0 мл PNM;
- 5,0 мл 10-кратного ПЛР буфера для HotStar Tag (містить 15 мМ $MgCl_2$);
- 2,0 мл 25 мМ розчину $MgCl_2$;
- 0,2 мл (1,0 Од) HotStar Tag;
- 3,0 мл води (для молекулярно-біологічних досліджень);
- 5,0 мл розчину ДНК.

В залежності від системи фермент/буфер, що використовується, оптимальна концентрація $MgCl_2$ може коливатися між 1,5 та 2,5 мМ.

Кінцева концентрація $MgCl_2$ в цій ампліфікаційній суміші складає 2,5 мМ.

Проба контролю контамінації (негативний контроль) містить 5,0 мл води замість розчину ДНК. Готують мас-тер-мікс, що містить всі реагенти, за винятком розчину ДНК, і добре перемішують (не на вортексі!).

Аліквотують по 45,0 мл в кожну підготовлену ПЛР-пробірку.

Програма ампліфікації: 1 цикл (15 хв 95 °C); 10 циклів (30 с 95 °C, 2 хв 58 °C); 20 циклів (25 с 95 °C, 40 с 53 °C, 40 с 70 °C); 1 цикл (8 хв 70 °C).

Продукти ампліфікації можуть зберігатися при температурі від +8 до +20 °C.

Гібридизація.

Підготовка.

Попередньо нагрівають водяну баню з шейкером/TwinCubator до 45 °C, максимально допустиме відхилення від заданої температури ± 1 °C. Попередньо підігрівують розчин HYB та STR до 37–45 °C перед використан-

ням. Реагенти мають бути вільні від осаду. Нагрівають всі інші реагенти, за виключенням CON-C та SUB-C, до кімнатної температури. За допомогою відповідного дозуючого приладдя, розчиняють концентрат кон'югату (CON-C, помаранчевий) та концентрат субстрату (SUB-C, жовтий) у співвідношенні 1:100 у відповідних буферах (CON-C у CON-D та SUB-C у SUB-D) у потрібній кількості. Добре перемішують та доводять до кімнатної температури. Із розрахунку на кожну смужку: додають 10,0 мкл концентрату до 1,0 мл відповідного буферу. Розводять CON-C перед кожним використанням. Розчинений SUB-D стабільний протягом 4-х тижнів за умов зберігання при кімнатній температурі в захищеному від світла місці.

1. Розливають по 20,0 мкл розчину для денатурації (DEN, блакитного кольору) в куток кожної лунки.

2. Додають 20,0 мкл продукту ампліфікації, перемішують піпетуванням та інкубують 5,0 хв при кімнатній температурі.

Тим часом, беруть смужку з пробірки за допомогою пінцету та помічають її олівцем на зворотному боці в забарвленому місці.

Обережно додають до кожної лунки 1,0 мл попередньо нагрітого Буферу для гібридизації (HYB, зелений). Обережно перемішують лоток до отримання гомогенного забарвлення.

3. Поміщають смужки в лунки.

4. Поміщають плашку на вібруючу водяну баню для перемішування/ TwinCubator та інкубують 30 хв при 45 °C.

5. Повністю видаляють Буфер для гібридизації.

6. Додають 1,0 мл буферу для жорсткої відмивки (STR, червоний) до кожної лунки та інкубують 15 хв при 45 °C у водяній бані з шейкером/TwinCubator.

7. Працюють при кімнатній температурі у всіх наступних кроках.

Повністю видаляють буфер для жорсткої відмивки.

8. Промивають кожну смужку один раз з 1,0 мл відмиваючого розчину (RIN) на вібруючій платформі/TwinCubator (виливають RIN після інкубації).

9. Додають 1,0 мл розчиненого кон'югату (дивіться вище) до смужки та інкубують 30 хв на вібруючій платформі/TwinCubator.

10. Видаляють розчин та промивають смужку двічі протягом 1 хв у відмиваючому розчині та 1 хв в дистильованій воді (тобто за допомогою струї з пластикової пляшки) на вібруючій платформі/TwinCubator (видаляють розчин кожний раз).

11. Додають 1,0 мл розведеного субстрату (дивіться вище) до смужки та інкубують в захищених від світла умовах без вібрації.

В залежності від умов тестування (кімнатної температури), час інкубації субстрату може змінюватись від 3-х до 15 хв Збільшений час інкубації субстрату призведе до збільшення фонових сигналів та може вплинути на інтерпретацію результатів.

12. Зупиняють реакцію швидким подвійним відмиванням дистильованою водою.

13. За допомогою пінцету дістають смужку з плашки та висушують її між двох шарів адсорбуючого паперу.

Оцінка та інтерпретація результатів.

Смужку необхідно наклеїти на бланк-шаблон і зберігати в захищеному від світла місці. Еталон для оцінки додається до набору.

Висновок

Розроблений спосіб видової ідентифікації НТМБ при наявності кислотостійких мікобактерій в мокротинні хворого дозволяє скоротити термін ідентифікації НТМБ з 4-х тижнів до 2-х робочих днів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Billinger M, Olivier K, Viboud C, et al. Non-tuberculosis mycobacteria-associated lung disease in hospitalized persons, United States, 1998-2005. *Emerg. Infect. Dis.* 2009;15(10):1562-1569.
2. Blanc P, Dutronc H, Peuchant O, et al. Non-tuberculosis mycobacterial infections in a French Hospital: A 12-Year Retrospective Study. *PLoS One.* 2016;11(12):e0168290.
3. Falkinham J. Epidemiology of infection by non-tuberculosis mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 1996;9(2):177-215.
4. Lai C, Tan C, Chou C, et al. Increasing incidence of nontuberculous mycobacteria, Taiwan, 2000-2008. *Emerg. Infect. Dis.* 2010;16(2):294-296.
5. Mirsaeidi M, Machado R, Garcia J, et al. Non-tuberculosis mycobacterial disease mortality in the United States, 1999-2010: A population-based comparative study. *PLoS One.* 2014;9(3):e91879.
6. Moore J, Kruijshaar M, Ormerod L, et al. Increasing number of non-tuberculosis mycobacteria in England, Wales and Northern Ireland, 1995-2006. *BMC Public Health.* 2010;10:612.
7. Журило ОА, Барбова АІ, Глушкевич ТГ, та ін. Стандарти бактеріологічної діагностики туберкульозу в лабораторіях протитуберкульозних закладів України: монографія. Кіровоград. 2012;190 с.
8. Gitti Z, Neonakis I, Fanti G, et al. Use of the GenoType Mycobacterium CM and AS Assays to analyze 76 non-tuberculosis mycobacterial isolates from Greece. *J. Clin. Microbiol.* 2006;44(6):2244-2246.
9. Майорова АА. Идентификация нетуберкулезных микобактерий и выбор оптимальной комбинации методов для их видовой дифференциации: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Майорова Ангелина Александровна; ФГУЗ «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора РФ. М., 2007;26с.

REFERENCES

1. Billinger M, Olivier K, Viboud C, et al. Non-tuberculosis mycobacteria-associated lung disease in hospitalized persons, United States, 1998-2005. *Emerg. Infect. Dis.* 2009;15(10):1562-1569.
2. Blanc P, Dutronc H, Peuchant O, et al. Non-tuberculosis mycobacterial infections in a French Hospital: A 12-Year Retrospective Study. *PLoS One.* 2016;11(12):e0168290.
3. Falkinham J. Epidemiology of infection by non-tuberculosis mycobacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 1996;9(2):177-215.
4. Lai C, Tan C, Chou C, et al. Increasing incidence of nontuberculous mycobacteria, Taiwan, 2000-2008. *Emerg. Infect. Dis.* 2010;16(2):294-296.
5. Mirsaeidi M, Machado R, Garcia J, et al. Non-tuberculosis mycobacterial disease mortality in the United States, 1999-2010: A population-based comparative study. *PLoS One.* 2014;9(3):e91879.
6. Moore J, Kruijshaar M, Ormerod L, et al. Increasing number of non-tuberculosis mycobacteria in England, Wales and Northern Ireland, 1995-2006. *BMC Public Health.* 2010;10:612.
7. Zhurylo OA, Barbova AI, Glushkevych TH, et al. *Standarty bakteriologichnoyi diagnostyky tuberkulozu v laboratoriyakh protytuberkuloznykh zakladiv Ukrainy: monohrafiya* (Standards of bacteriological diagnostics of tuberculosis in laboratories of tuberculosis establishments of Ukraine: monograph). Kirovograd. 2012;190p.
8. Gitti Z, Neonakis I, Fanti G, et al. Use of the GenoType Mycobacterium CM and AS Assays to analyze 76 non-tuberculosis mycobacterial isolates from Greece. *J. Clin. Microbiol.* 2006;44(6):2244-2246.
9. Mayrova AA. *Identifikatsiya netuberkuleznykh mikobakteriy i vybor optimalnoy kombinatsii metodov dlya ikh vidovoy differentsiatsii: avtoreferet dissertatsii kandidata biologicheskikh nauk* (Identification of non-tuberculous mycobacteria and the choice of the optimal combination of methods for their species differentiation: abstract of the dissertation of the candidate of biological sciences). Mayrova Angelina Aleksandrovna; FGUZ «Moskovskiy nauchno-issledovatel'skiy institut epidemiologii i mikrobiologii im. GN Gabrichевского» Rospotrebnadzora. RF. M., 2007;26p.