

## ДИСКРИМИНИРУЮЩАЯ СПОСОБНОСТЬ МЕТОДА МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР ПРИ ВЫЯВЛЕНИИ МИКОБАКТЕРИАЛЬНОЙ КОИНФЕКЦИИ

Т. Г. Смирнова<sup>1</sup>✉, С. Н. Андреевская<sup>1</sup>, В. В. Устинова<sup>1</sup>, Е. Е. Ларионова<sup>1</sup>, Е. А. Киселева<sup>1</sup>, Л. Н. Черноусова<sup>1</sup>, А. Эргешов<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Центральный научно-исследовательский институт туберкулеза, Москва, Россия

<sup>2</sup> Московский государственный медико-стоматологический университет имени А. И. Евдокимова, Москва, Россия

Диагностика микобактериальной коинфекции — одна из актуальных проблем здравоохранения. Целью исследования было определить дискриминирующую способность метода мультиплексной ПЦР видовой идентификации при выявлении смешанных популяций микобактерий. Исследование выполнено на модельных образцах, представляющих собой смесь ДНК микобактерий двух видов в соотношении 1 : 1, 1 : 9, 1 : 99 и 1 : 999 с разной суммарной концентрацией ДНК (от 10<sup>3</sup> ГЭ/мл до 10<sup>6</sup> ГЭ/мл). Модельные образцы исследовали набором «Амплитуб-РВ-дифференциация» («Синтол»; Россия), основанном на мультиплексной ПЦР. Показано, что набор способен выявлять смеси видов микобактерий с высокой дискриминирующей способностью. Дискриминирующая способность метода ПЦР в режиме реального времени при анализе смеси ДНК двух видов микобактерий зависела от суммарного содержания ДНК в образце и варьировала от 0,1% для высоконагруженных образцов (суммарная концентрация ДНК × 10<sup>6</sup> ГЭ/мл) до 50% для низконагруженных образцов (суммарная концентрация ДНК × 10<sup>3</sup> ГЭ/мл) и соответствовала количеству ДНК вида в смеси не менее 5 × 10<sup>2</sup> ГЭ/мл. При количестве ДНК каждого вида в смеси не менее 5 × 10<sup>2</sup> ГЭ/мл результат ПЦР на выявление коинфекции не зависел от вида микобактерий, входящих в смесь, что необходимо учитывать при анализе результатов ПЦР.

**Ключевые слова:** микобактерии туберкулезного комплекса, нетуберкулезные микобактерии, микобактериальная коинфекция, мультиплексная ПЦР, микобактериоз, туберкулез

**Финансирование:** исследование проведено в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФГБНУ "ЦНИИТ" № НИОКТР 122041100246-3 «Межвидовой и внутривидовой полиморфизм микобактерий у больных туберкулезом и микобактериозом на фоне специфической терапии».

**Вклад авторов:** Т. Г. Смирнова — проведение эксперимента (постановка ПЦР в режиме реального времени), анализ полученных данных, подготовка черновика рукописи; С. Н. Андреевская — анализ литературы, интерпретация данных, обзор публикаций по теме статьи; В. В. Устинова — постановка ПЦР; Е. Е. Ларионова — анализ данных; Е. А. Киселева — подготовка модельных образцов, Л. Н. Черноусова, А. Эргешов — разработка дизайна исследования; все авторы участвовали в обсуждении результатов.

✉ **Для корреспонденции:** Татьяна Геннадьевна Смирнова  
Яузская аллея, д. 2, к. 1А, г. Москва, 107564, Россия; s\_tatka@mail.ru

**Статья получена:** 21.06.2024 **Статья принята к печати:** 16.07.2024 **Опубликована онлайн:** 04.08.2024

**DOI:** 10.24075/vrgmu.2024.029

## DISCRIMINATORY POWER OF MULTIPLEX PCR FOR DETECTION OF MYCOBACTERIAL CO-INFECTION

Smirnova TG<sup>1</sup>✉, Andreevskaya SN<sup>1</sup>, Ustinova VV<sup>1</sup>, Larionova EE<sup>1</sup>, Kiseleva EA<sup>1</sup>, Chernousova LN<sup>1</sup>, Ergeshov A<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Central Tuberculosis Research Institute, Moscow, Russia

<sup>2</sup> Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russia

The diagnosis of mycobacterial co-infection is one of the pressing public health issues. The study was aimed to determine discriminatory power of multiplex PCR used for species identification when detecting mixed mycobacterial populations. The study involved model samples representing the mixtures of DNA of two mycobacterial species with the ratios of 1 : 1, 1 : 9, 1 : 99, and 1 : 999 and different total DNA concentrations (10<sup>3</sup> gEq/mL to 10<sup>6</sup> gEq/mL). The model samples were assessed using the multiplex PCR-based AmpliTube-RV-Differentiation kit (Syntol LLC; Russia). It has been shown that the kit is capable of detecting the mixtures of mycobacterial species with high discriminatory power. The discriminatory power of real-time PCR used for analysis of the mixture of DNA of two mycobacterial species depended on the total DNA content in the sample and varied between 0.1% for high-rate samples (total DNA concentration 10<sup>6</sup> gEq/mL) and 50% for low-rate samples (total DNA concentration 10<sup>3</sup> gEq/mL) and corresponded to the amount of DNA of the species in the sample of at least 5 × 10<sup>2</sup> gEq/mL. When the amount of DNA of each species in the mixture was at least 5 × 10<sup>2</sup> gEq/mL, the results of PCR test for detection of co-infection did not depend on the mycobacterial species contained in the mixture, which should be taken into account when analyzing PCR results.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis* complex, nontuberculous mycobacteria, mycobacterial co-infection, multiplex PCR, mycobacteriosis, tuberculosis

**Funding:** the study was conducted within the framework of the State Assignment of the Central Tuberculosis Research Institute, R&D project No. 122041100246-3 "Interspecific and intraspecific polymorphism of mycobacteria in patients with tuberculosis and mycobacteriosis receiving specific therapy"

**Author contribution:** Smirnova TG — experimental procedure (real-time PCR), data analysis, manuscript draft; Andreevskaya SN — literature review, data interpretation, review of publications on the issue; Ustinova VV — PCR; Larionova EE — data analysis; Kiseleva EA — model sample preparation; Chernousova LN, Ergeshov A — developing the study design; all authors contributed to discussion

✉ **Correspondence should be addressed:** Tatiana G. Smirnova  
Yauza alley, 2, str. 1A, Moscow, 107564, Russia; s\_tatka@mail.ru

**Received:** 21.06.2024 **Accepted:** 16.07.2024 **Published online:** 04.08.2024

**DOI:** 10.24075/brsmu.2024.029

Заболевания микобактериальной этиологии, в том числе туберкулез, представляют собой существенную проблему для здравоохранения. Туберкулез является второй по частоте причиной смерти от инфекционных заболеваний [1]. Заболеваемость туберкулезом в РФ снижается, а заболевания, вызываемые нетуберкулезными микобактериями, встречаются все чаще. Такая же тенденция

отмечена во всем мире [2–6]. Исследователи связывают рост микобактериоза со старением общемирового населения и повышением частоты встречаемости врожденных и приобретенных иммунодефицитных состояний [4, 7–9].

В ряде случаев, чаще в пожилом возрасте и при иммуносупрессии, пациент может быть инфицирован одновременно МБТК и НТМБ, или несколькими видами

НТМБ [2, 10–12]. В России частота встречаемости микобактериальной коинфекции составляет 1,16% от всех бактериовыделителей. Наиболее распространенными сочетаниями видов в составе смешанных популяций микобактерий являются *M. tuberculosis* + *M. avium*, *M. tuberculosis* + *M. abscessus*, *M. avium* + *M. intracellulare*, *M. avium* + *M. kansasii*, *M. avium* + *M. abscessus* [2].

Случаи смешанной микобактериальной инфекции важно вовремя диагностировать, так как невыявленное коинфицирование несколькими видами микобактерий неизбежно приведет к неудачному лечению. Неудача лечения будет обусловлена тем, что нетуберкулезные микобактерии устойчивы к большинству противотуберкулезных препаратов и имеют видоспецифичный профиль чувствительности к антибактериальным препаратам [13–15].

Поскольку туберкулез и микобактериоз имеют схожую клинико-рентгенологическую картину, дифференцировать их можно, проведя видовую идентификацию культуры микобактерий методами ВЭЖХ, масс-спектрометрии или молекулярно-генетическими методами [16–19]. Преимущество молекулярно-генетической диагностики туберкулеза и микобактериоза заключается в том, что она позволяет проводить анализ не только из культур, но и непосредственно из клинического диагностического материала. В 2021 г. в ФГБНУ «ЦНИИТ» совместно с «НПФ Синтол» был разработан тест «Амплитуб-НТМБ-дифференциация», основанный на мультиплексной ПЦР, который позволяет выявлять МБТК, проводить дифференциацию МБТК с НТМБ и выявлять 12 видов НТМБ (*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. xenopi*, *M. chimaera*, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. lentiflavum*, *M. paragordoniae*, *M. abscessus*, *M. chelonae*, *M. fortuitum*, *M. malmoense*) [20].

Согласно назначению, тест должен иметь хороший потенциал для выявления микобактериальной коинфекции, в том числе обусловленной несколькими видами НТМБ. Следовательно, представлялось актуальным определить способность этого набора выявлять смешанные популяции микобактерий в зависимости от видового состава смеси.

Цель исследования — определить дискриминирующую способность метода мультиплексной ПЦР для видовой идентификации при выявлении смешанных популяций микобактерий.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Объект исследования

Модельные образцы представляли собой смешанную в разных соотношениях ДНК микобактерий, наиболее часто выявляемых в составе смешанных популяций. Для создания модельных образцов использовали ДНК, выделенную из культур штаммов микобактерий из коллекции микобактериальных культур отдела микробиологии ФГБНУ «ЦНИИТ» *M. tuberculosis* H37Rv (TMC 102), *M. avium* (ATCC-35719), *M. intracellulare* (ATCC-25120), *M. kansasii* (ATCC-12478), *M. abscessus* (ATCC-19977).

Таблица 1. Виды НТМБ и соответствующие им реакционные пробирки и каналы детекции

№ пробирки стрипа	Канал детекции			
	FAM	ROX	HEX	Cy5
1	МБТК	НТМБ	МБТК	-
2	<i>M. avium</i>	<i>M. xenopi</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chimaera</i>
3	<i>M. kansasii</i>	<i>M. gordonae</i>	<i>M. lentiflavum</i>	<i>M. paragordoniae</i>
4	<i>M. abscessus</i>	<i>M. chelonae</i>	<i>M. fortuitum</i>	<i>M. malmoense</i>

## Дизайн исследования

ДНК из культур исследуемых видов микобактерий была выделена набором «Амплитуб-РВ» («Синтол»; Россия). Концентрацию ДНК микобактерий каждого вида определяли спектрофотометрически (Спектрофотометр Picopet «Picodrop»; Великобритания) и пересчитывали на число геномных эквивалентов. Далее готовили серийные разведения ДНК микобактерий каждого вида, которые смешивали в пропорциях 1:1, 1:9, 1:99 и 1:999, суммарная концентрация ДНК в смесях составляла  $10^6$  ГЭ/мл,  $10^5$  ГЭ/мл,  $10^4$  ГЭ/мл и  $10^3$  ГЭ/мл. Модельные образцы были исследованы с использованием набора «Амплитуб-НТМБ-дифференциация» («Синтол»; Россия). Амплификацию проводили в термоциклере с оптическим модулем CFX96Touch (Bio-Rad; США). Видовую идентификацию осуществляли согласно инструкции к набору по наличию кинетических кривых усиления флюоресценции по соответствующим сигналам: кинетические кривые в пробирке стрипа № 1 отражали накопление продуктов амплификации, соответствующих специфичным участкам генома МБТК и/или участкам генома, специфичным для всех видов НТМБ, в пробирках № 2–4 — кинетические кривые усиления сигнала флюоресценции соответствовали наличию в образце ДНК целевых для набора видов НТМБ (табл. 1).

Таким образом, были исследованы образцы разной степени нагрузки ДНК, каждый из которых содержал ДНК двух видов микобактерий, смешанную в разных пропорциях (табл. 2). Каждый вариант модельных образцов был исследован в 10-ти повторностях.

Дискриминирующую способность метода устанавливали по его предельной возможности обнаруживать два вида микобактерий, что будет выражено в наименьшей доле содержания в образце ДНК одного из видов микобактерий, обнаруживаемой в составе смеси во всех 10-ти повторностях.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Результаты исследования модельных образцов ДНК методом мультиплексной ПЦР для видовой идентификации микобактерий представлены в табл. 3. Дискриминирующая способность мультиплексной ПЦР для видовой идентификации зависела от суммарной концентрации ДНК в образце. При высокой суммарной концентрации ДНК, равной  $10^6$  ГЭ/мл дискриминирующая способность метода составляла 0,1%, при концентрации  $10^5$  ГЭ/мл — 1%, при  $10^4$  ГЭ/мл — 10% и при  $10^3$  ГЭ/мл — 50%. Такая закономерность была характерна для всех исследованных видов микобактерий и прослеживалась также при дифференциации МБТК и НТМБ. Во всех видах модельных образцов эта минимальная доля вида соответствовала концентрации ДНК вида микобактерий как минимум  $5 \times 10^2$  ГЭ/мл.

Вероятность обнаружения каждого вида в доле, на одну ступень ниже дискриминируемой (далее —

Таблица 2. Характеристика модельных образцов ДНК

Соотношение (вид 1 : вид 2)	Концентрация ДНК видов микобактерий в смеси (ГЭ/мл) при суммарной нагрузке ДНК на образец:			
	10 <sup>6</sup> ГЭ/мл	10 <sup>5</sup> ГЭ/мл	10 <sup>4</sup> ГЭ/мл	10 <sup>3</sup> ГЭ/мл
1 : 1	5,00 × 10 <sup>5</sup> / 5,00 × 10 <sup>5</sup>	5,00 × 10 <sup>4</sup> / 5,00 × 10 <sup>4</sup>	5,00 × 10 <sup>3</sup> / 5,00 × 10 <sup>3</sup>	5,00 × 10 <sup>2</sup> / 5,00 × 10 <sup>2</sup>
1 : 9	1,00 × 10 <sup>5</sup> / 9,00 × 10 <sup>5</sup>	1,00 × 10 <sup>4</sup> / 9,00 × 10 <sup>4</sup>	1,00 × 10 <sup>3</sup> / 9,00 × 10 <sup>3</sup>	1,00 × 10 <sup>2</sup> / 9,00 × 10 <sup>2</sup>
1 : 99	1,00 × 10 <sup>4</sup> / 9,90 × 10 <sup>5</sup>	1,00 × 10 <sup>3</sup> / 9,90 × 10 <sup>4</sup>	1,00 × 10 <sup>2</sup> / 9,90 × 10 <sup>3</sup>	1,00 × 10 <sup>1</sup> / 9,90 × 10 <sup>2</sup>
1 : 999	1,00 × 10 <sup>3</sup> / 9,99 × 10 <sup>5</sup>	1,00 × 10 <sup>2</sup> / 9,99 × 10 <sup>4</sup>	1,00 × 10 <sup>1</sup> / 9,99 × 10 <sup>3</sup>	1,00 × 10 <sup>0</sup> / 9,99 × 10 <sup>2</sup>
9 : 1	9,00 × 10 <sup>5</sup> / 1,00 × 10 <sup>5</sup>	9,00 × 10 <sup>4</sup> / 1,00 × 10 <sup>4</sup>	9,00 × 10 <sup>3</sup> / 1,00 × 10 <sup>3</sup>	9,00 × 10 <sup>2</sup> / 1,00 × 10 <sup>2</sup>
99 : 1	9,90 × 10 <sup>5</sup> / 1,00 × 10 <sup>4</sup>	9,90 × 10 <sup>4</sup> / 1,00 × 10 <sup>3</sup>	9,90 × 10 <sup>3</sup> / 1,00 × 10 <sup>2</sup>	9,90 × 10 <sup>2</sup> / 1,00 × 10 <sup>1</sup>
999 : 1	9,99 × 10 <sup>5</sup> / 1,00 × 10 <sup>3</sup>	9,99 × 10 <sup>4</sup> / 1,00 × 10 <sup>2</sup>	9,99 × 10 <sup>3</sup> / 1,00 × 10 <sup>1</sup>	9,99 × 10 <sup>2</sup> / 1,00 × 10 <sup>0</sup>

преддискриминируемая доля), варьировала для разных видов микобактерий, входящих в состав смеси (табл. 3). Наибольшая вероятность быть обнаруженной в составе смеси в преддискриминируемой доле (1 × 10<sup>2</sup> ГЭ/мл) была у МБТК, *M. avium* и *M. intracellulare*, которые выявлялись как второй вид в смеси в 7/10–9/10 повторностях, в зависимости от суммарного содержания ДНК. Вероятность выявления в преддискриминируемой доле *M. kansasii* была несколько ниже (5/10–6/10) и наименьшей — у *M. abscessus* (2/10–4/10). Такая же закономерность для вероятности обнаружения микобактерий в смеси в преддискриминируемой доле была показана и при анализе результатов дифференциации МБТК и НТМБ: *M. avium* как НТМБ в преддискриминируемой доле были выявлены в составе смеси с *M. tuberculosis* в 8/10–9/10 повторности, с *M. abscessus* — 4/10–5/10. При доле вида микобактерий, на две ступени ниже дискриминируемой (соответствует 1,00 × 10<sup>1</sup> ГЭ/мл), результат ПЦР на этот вид был отрицательным и в смеси регистрировали только доминирующий вид.

Таким образом, можно заключить, что мультиплексная ПЦР позволяет выявлять смесь видов микобактерий, если концентрация ДНК каждого из видов составляет не менее 5 × 10<sup>2</sup> ГЭ/мл. При более низкой концентрации ДНК микобактерий (1 × 10<sup>2</sup> ГЭ/мл) чувствительность набора для обнаружения смешанных популяций микобактерий будет зависеть от видового состава: вероятность выявить в смеси МБТК *M. avium* и *M. intracellulare* выше, чем *M. kansasii* и, особенно, *M. abscessus*.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

МБТК и НТМБ вызывают заболевания человека, характеризующиеся практически идентичной клинико-рентгенологической картиной [21]. Однако, в зависимости от этиологического агента, схемы терапии пациентов будут кардинально различаться, поэтому необходимость дифференциальной диагностики заболеваний, вызванных МБТК и НТМБ, закреплена в нормативных документах [22, 23]. В существующих нормативах все же не учтена возможность инфицирования одного пациента несколькими видами микобактерий и не определена ценность методов этиологической диагностики микобактериальных коинфекций.

Особенно полезны при диагностике заболеваний микобактериальной природы молекулярно-генетические методы, которые позволяют определить возбудителя в течение суток, в отличие от культуральных исследований, результаты которых получают не ранее, чем через три недели [24]. Существует достаточно много отечественных ПЦР-тестов, которые позволяют выявлять МБТК и/или

проводить дифференциацию видов внутри комплекса МБТК [25]. Зарегистрированных в РФ наборов, детектирующих НТМБ в диагностическом материале, только два: набор «МТВ-тест» производства «ТестГен» (Россия), который предназначен для выявления МБТК или НТМБ, и использованный в представленном исследовании набор «Амплитуб-НТМБ-дифференциация» производства «НПФ Синтол» (Россия), который, помимо дифференциации МБТК от НТМБ, позволяет провести видовую идентификацию НТМБ. Следовательно, «Амплитуб-НТМБ-дифференциация» — единственный зарегистрированный в РФ отечественный набор, позволяющий проводить ускоренную видовую идентификацию возбудителей микобактериальных инфекций. Поэтому целью проведенного исследования было оценить возможность этого теста выявлять микобактериальную коинфекцию. Для этого были созданы модельные образцы, представляющие собой смешанную в разных соотношениях ДНК микобактерий разных видов. Было показано, что набор «Амплитуб-НТМБ-дифференциация» позволяет выявлять микобактериальную коинфекцию, если концентрация ДНК видов НТМБ в смеси составляет не менее 5 × 10<sup>2</sup> ГЭ/мл, или от 0,1 до 50% вида в смеси в зависимости от суммарной концентрации ДНК в образце.

Исследований, оценивающих диагностическую ценность молекулярно-генетических методов для выявления смешанной инфекции, недостаточно. Лишь в одном проведена оценка методов GeneXpert (Cepheid, США) и мультилокусного секвенирования для выявления смешанных культур микобактерий [26]. Его авторы показали, что GeneXpert способен идентифицировать МБТК в смеси с разными видами НТМБ в доле 1% (в рамках описанного исследования предел детекции вида в составе смеси — 3000 КОЕ/мл).

Сравнение результатов дискриминирующей способности картриджной технологии GeneXpert и метода ПЦР в режиме реального времени, описанного в нашем исследовании, показало, что дискриминирующая способность метода мультиплексной ПЦР при выявлении МБТК в составе смешанных популяций выше, чем установленная для GeneXpert (5 × 10<sup>2</sup> ГЭ/мл против 3 × 10<sup>3</sup> КОЕ/мл соответственно). Кроме того, система GeneXpert выявляет только МБТК и не способна выявить смесь разных видов микобактерий. При наличии коинфекции МБТК и НТМБ результат исследования GeneXpert отразит только наличие МБТК, а при смеси видов НТМБ результат исследования GeneXpert будет отрицательным.

Дискриминирующая способность метода секвенирования, установленная ранее [26], зависела от видов микобактерий, входящих в состав смеси. Смесь МБТК с *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. abscessus* и *M. fortuitum* методом секвенирования определялась как два вида

Таблица 3. Результаты исследования модельных образцов смеси ДНК двух видов микобактерий методом мультиплексной ПЦР

Комбинация видов (вид 1 : вид 2)	Соотношение	Число положительных результатов ПЦР из числа исследованных образцов ДНК по целевым каналам детекции при суммарной концентрации ДНК			
		10 <sup>6</sup> ГЭ/мл	10 <sup>5</sup> ГЭ/мл	10 <sup>4</sup> ГЭ/мл	10 <sup>3</sup> ГЭ/мл
<i>M. tub.</i> : <i>M. avi.</i>	1 : 1	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –10/10
	1 : 9	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –9/10; <i>M. avi.</i> – 1/10
	1 : 99	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –8/10; <i>M. avi.</i> – 2/10	<i>M. avi.</i> – 10/10
	1 : 999	MIX –10/10	MIX –9/10; <i>M. avi.</i> – 1/10	<i>M. avi.</i> – 10/10	<i>M. avi.</i> – 10/10
	9 : 1	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –7/10; МБТК – 3/10
	99 : 1	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –7/10; МБТК – 3/10	МБТК – 10/10
	999 : 1	MIX –10/10	MIX –8/10; МБТК – 2/10	МБТК – 10/10	МБТК – 10/10
<i>M. tub.</i> : <i>M. abs.</i>	1 : 1	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –10/10
	1 : 9	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –8/10; <i>M. abs.</i> – 2/10
	1 : 99	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –9/10; <i>M. abs.</i> – 1/10	<i>M. abs.</i> – 10/10
	1 : 999	MIX –10/10	MIX –8/10; <i>M. abs.</i> – 2/10	<i>M. abs.</i> – 10/10	<i>M. abs.</i> – 10/10
	9 : 1	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –3/10 МБТК – 7/10
	99 : 1	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –3/10; МБТК – 7/10	МБТК – 10/10
	999 : 1	MIX –10/10	MIX –4/10; МБТК – 6/10	МБТК – 10/10	МБТК – 10/10
<i>M. avi.</i> : <i>M. int.</i>	1 : 1	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –10/10
	1 : 9	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –7/10; <i>M. int.</i> – 3/10
	1 : 99	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –8/10; <i>M. int.</i> – 2/10	<i>M. int.</i> – 100%
	1 : 999	MIX –10/10	MIX –9/10; <i>M. int.</i> – 1/10	<i>M. int.</i> – 10/10	<i>M. int.</i> – 100%
	9 : 01	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –9/10; <i>M. avi.</i> – 1/10
	99 : 1	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –8/10; <i>M. avi.</i> – 2/10	<i>M. avi.</i> – 10/10
	999 : 1	MIX –10/10	MIX –8/10; <i>M. avi.</i> – 2/10	<i>M. avi.</i> – 10/10	<i>M. avi.</i> – 10/10
<i>M. avi.</i> : <i>M. kans.</i>	1 : 1	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –10/10
	1 : 9	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –8/10; <i>M. kans.</i> – 2/10
	1 : 99	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –9/10; <i>M. kans.</i> – 1/10	<i>M. kans.</i> – 10/10
	1 : 999	MIX –10/10	MIX –8/10; <i>M. kans.</i> – 2/10	<i>M. kans.</i> – 10/10	<i>M. kans.</i> – 10/10
	9 : 1	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –5/10; <i>M. avi.</i> – 5/10
	99 : 1	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –5/10; <i>M. avi.</i> – 5/10	<i>M. avi.</i> – 10/10
	999 : 1	MIX –10/10	MIX –6/10; <i>M. avi.</i> – 4/10	<i>M. avi.</i> – 10/10	<i>M. avi.</i> – 10/10
<i>M. avi.</i> : <i>M. abs.</i>	1 : 1	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –10/10
	1 : 9	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –9/10; <i>M. abs.</i> – 1/10
	1 : 99	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –8/10; <i>M. abs.</i> – 2/10	<i>M. abs.</i> – 100%
	1 : 999	MIX –10/10	MIX –9/10; <i>M. abs.</i> – 1/10	<i>M. abs.</i> – 10/10	<i>M. abs.</i> – 100%
	9 : 1	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –2/10; <i>M. avi.</i> – 8/10
	99 : 1	MIX –10/10	MIX –10/10	MIX –4/10; <i>M. avi.</i> – 6/10	<i>M. avi.</i> – 10/10
	999 : 1	MIX –10/10	MIX –3/10; <i>M. avi.</i> – 7/10	<i>M. avi.</i> – 10/10	<i>M. avi.</i> – 10/10

**Примечание:** НТМБ — нетуберкулезные микобактерии; МБТК — микобактерии туберкулезного комплекса; *M. tub.* — *M. tuberculosis*; *M. avi.* — *M. avium*; *M. int.* — *M. intracellulare*; *M. kans.* — *M. kansasii*; *M. abs.* — *M. abscessus*; MIX — модельный образец распознан как смесь видов микобактерий; серым выделены ячейки с частотой выявления видов микобактерий в преддискриминируемой доле.

в том случае, если доля одного из видов составляла не менее 1% ( $3 \times 10^3$  КОЕ/мл). При исследовании методом секвенирования смеси МБТК и *M. avium*, наличие *M. avium* в смеси определяли, если ее доля составляла не менее 10% ( $3 \times 10^4$  КОЕ/мл), если доля *M. avium* была меньше 10% — определялись только МБТК [26]. Следовательно, дискриминирующая способность мультиплексной ПЦР выше, чем метода секвенирования для видов *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. abscessus*. Дискриминирующая способность метода мультиплексной ПЦР для смеси МБТК + *M. fortuitum* нами не определялась, так как вид *M. fortuitum*, по нашим данным, не является частой причиной заболеваний микобактериальной природы и крайне редко встречается в составе смешанных популяций, выделенных от пациентов [2]. Преимуществом мультиплексной

ПЦР перед секвенированием при выявлении микобактериальной коинфекции является также тот факт, что для секвенирования используют ДНК, выделенную из культур микобактерий, а для мультиплексной ПЦР — ДНК, выделенную непосредственно из диагностического материала, что ускоряет получение результата и делает его независимым от видоспецифичных культуральных особенностей микобактерий.

#### Выводы

Была изучена диагностическая ценность метода мультиплексной ПЦР при выявлении смешанных популяций микобактерий. Показано, что основанный на мультиплексной ПЦР набор «Амплитуб-НТМБ-дифференциация» способен

выявлять смеси видов микобактерий с высокой дискриминирующей способностью. Дискриминирующая способность метода ПЦР в режиме реального времени при анализе смеси ДНК двух видов микобактерий зависела от суммарного содержания ДНК в образце и варьировала от 0,1% для высоконагруженных образцов (суммарная концентрация ДНК  $10^6$  ГЭ/мл) до 50% для низконагруженных образцов (суммарная концентрация ДНК  $\times 10^3$  ГЭ/мл) и соответствовала количеству ДНК вида в смеси не менее  $5 \times 10^2$  ГЭ/мл. При количестве ДНК

каждого вида в смеси не менее  $5 \times 10^2$  ГЭ/мл результат ПЦР на выявление коинфекции не зависел от видов микобактерий, входящих в смесь. Если количество ДНК вида микобактерий в смеси было ниже  $5 \times 10^2$  ГЭ/мл, прослеживалась зависимость результатов ПЦР от вида микобактерий: вероятность выявить в составе смеси МБТК виды *M. avium* и *M. abscessus* была выше, чем *M. kansasii*; наименьшая вероятность быть выявленной в преддискриминируемой доле была у *M. abscessus*, что необходимо учитывать при анализе результатов ПЦР.

## Литература

- Global tuberculosis report 2023. Geneva: World Health Organization, 2023; 75 p.
- Смирнова Т. Г., Андреевская С. Н., Ларионова Е. Е., Черноусова Л. Н., Эргешов А. Смешанные популяции микобактерий у больных туберкулезом и микобактериозом: частота выявления и спектр видов. Туберкулез и социально-значимые заболевания. 2023; 2 (42): 19–24.
- Суркова Л. К., Залуцкая О. М., Скрягина Е. М., Николенко Е. Н., Яцкевич Н. В., Стринович А. Л. и др. Выделение и идентификация нетуберкулезных микобактерий и диагностика микобактериоза легких в Республике Беларусь. Клиническая инфектология и паразитология. 2020; 9 (2): 161–9.
- Park SC, Kang MJ, Han CH, Lee SM, Kim CJ, Lee JM, et al. Park SC, Kang MJ, Han CH, Lee SM, Kim CJ, Lee JM, Kang YA. Prevalence, incidence, and mortality of nontuberculous mycobacterial infection in Korea: a nationwide population-based study. BMC Pulm Med. 2019; 19 (1): 140.
- Nasiri MJ, Dabiri H, Darban-Sarokhalil D, Hashemi Shahraki A. Prevalence of Non-Tuberculosis Mycobacterial Infections among Tuberculosis Suspects in Iran: Systematic Review and Meta-Analysis. PLoS One. 2015; 10 (6): e0129073.
- Brode SK, Daley CL, Marras TK. The epidemiologic relationship between tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial disease: a systematic review. Int J Tuberc Lung Dis. 2014; 18 (11): 1370–7.
- Henkle E, Winthrop KL. Nontuberculous mycobacteria infections in immunosuppressed hosts. Clin Chest Med. 2015; 36 (1): 91–9.
- To K, Cao R, Yegiazaryan A, Owens J, Venketaraman V. General Overview of Nontuberculous Mycobacteria Opportunistic Pathogens: Mycobacterium avium and Mycobacterium abscessus. J Clin Med. 2020; 9 (8): 2541.
- Lin CK, Yang YH, Lu ML, Tsai YH, Hsieh MJ, Lee YC, et al. Incidence of nontuberculous mycobacterial disease and coinfection with tuberculosis in a tuberculosis-endemic region: A population-based retrospective cohort study. Medicine (Baltimore). 2020; 99 (52): e23775.
- Ishiekwene C, Subran M, Ghitan M, Kuhn-Basti M, Chapnick E, Lin YS. Case report on pulmonary disease due to coinfection of Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium abscessus: Difficulty in diagnosis. Respir Med Case Rep. 2017; 20: 123–4.
- Jun HJ, Jeon K, Um SW, Kwon OJ, Lee NY, Koh WJ. Nontuberculous mycobacteria isolated during the treatment of pulmonary tuberculosis. Respir Med. 2009; 103 (12): 1936–40.
- Kurahara Y, Tachibana K, Tsuyuguchi K, Suzuki K. Mixed pulmonary infection with three types of nontuberculous mycobacteria. Intern Med. 2013; 52 (4): 507–10.
- Андреевская С. Н., Ларионова Е. Е., Смирнова Т. Г., Андреевская И. Ю., Киселева Е. А., Черноусова Л. Н. Лекарственная чувствительность медленно растущих нетуберкулезных микобактерий. Туберкулез и болезни легких. 2016; 94 (4): 43–50.
- Shahraki AH, Heidarieh P, Bostanabad SZ, Khosravi AD, Hashemzadeh M, Khandan S, et al. "Multidrug-resistant tuberculosis" may be nontuberculous mycobacteria. Eur J Intern Med. 2015; 26 (4): 279–84.
- Bazzi AM, Abulhamayel Y, Rabaan AA, Al-Tawfiq JA. The impact of the coexistence of mycobacterium avium with mycobacterium tuberculosis on the result of GeneXpert and MGIT susceptibility test. J Infect Public Health. 2020; 13 (5): 827–9.
- Макарова М. В., Краснова М. А., Мороз А. М. Сравнительные данные применения высокоэффективной жидкостной хроматографии для идентификации микобактерий, выделенных на жидкой и плотной питательных средах. Туберкулез и болезни легких. 2009; 86 (10): 46–48.
- Shitikov E, Ilna E, Chernousova L, Borovskaya A, Rukin I, Afanas'ev M, et al. Mass spectrometry based methods for the discrimination and typing of mycobacteria. Infect Genet Evol. 2012; 12 (4): 838–45.
- Смирнова Т. Г., Андреевская С. Н., Ларионова Е. Е., Андреевская И. Ю., Устинова В. В., Черноусова Л. Н. Мониторинг видового разнообразия нетуберкулезных микобактерий в ряде областей РФ с использованием ДНК-стрипов Genotype Mycobacterium CM/AS (Hain Lifescience, Германия). Туберкулез и болезни легких. 2017; 95 (5): 54–59.
- Старкова Д. А., Журавлев Ю. В., 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): 16–22.
- Smirnova T, Ustinova V, Andreevskaya S, Lariionova E, Kiseleva E, Chernousova L, et al. Evaluation of a new assay for nontuberculous mycobacteria species identification in diagnostic material and cultures. Tuberculosis (Edinb). 2021; 130: 102124.
- Гунтупова Л. Д., Борисов С. Е., Соловьева И. П. Микобактериозы во фтизиопульмонологической практике: обзор литературы и собственный опыт. Практическая медицина. 2011; 51 (3): 39–50.
- Приказ № 951 МЗ РФ от 29.12.2014. Об утверждении методических рекомендаций по совершенствованию диагностики и лечения туберкулеза органов дыхания.
- Севастьянова Э. В., Черноусова Л. Н. Современные алгоритмы микробиологической диагностики туберкулеза. Туберкулез и болезни легких. 2018; 96 (7): 11–17.
- Эргешов А. Э., Черноусова Л. Н., Андреевская С. Н. Новые технологии диагностики лекарственно-устойчивого туберкулеза. Вестник Российской академии медицинских наук. 2019; 74 (6): 413–22.
- Эргешов А. Э., Андреевская С. Н., Смирнова Т. Г., Черноусова Л. Н. Туберкулез с лекарственной устойчивостью возбудителя: механизмы формирования и методы молекулярно-генетической диагностики. Вестник Российской академии медицинских наук. 2023; 78 (6): 609–20.
- Liang Q, Shang Y, Huo F, Xue Y, Li Y, Dong L, et al. Assessment of current diagnostic algorithm for detection of mixed infection with Mycobacterium tuberculosis and nontuberculous mycobacteria. J Infect Public Health. 2020; 13 (12): 1967–71.

## References

1. Global tuberculosis report 2023. Geneva: World Health Organization, 2023; 75 p.
2. Smirnova TG, Andreevskaya SN, Larionova EE, Chernousova LN, Ergeshov A. Smeshannye populjicii mikobakterij u bol'nyh tuberkulezom i mikobakteriozom: chastota vyjavlenija i spektr vidov. *Tuberkulez i social'no-znachimnye zabolevanija*. 2023; 2 (42): 19–24. Russian.
3. Surkova LK, Zaluckaya OM, Skryagina EM, Nikolenko EN, Jackevich NV, Strinovich AL, i dr. Vydelenie i identifikacija netuberkuleznych mikobakterij i diagnostika mikobakterioza legkih v Respublike Belarus'. *Klinicheskaja infektologija i parazitologija*. 2020; 9 (2): 161–9. Russian.
4. Park SC, Kang MJ, Han CH, Lee SM, Kim CJ, Lee JM, et al. Park SC, Kang MJ, Han CH, Lee SM, Kim CJ, Lee JM, Kang YA. Prevalence, incidence, and mortality of nontuberculous mycobacterial infection in Korea: a nationwide population-based study. *BMC Pulm Med*. 2019; 19 (1): 140.
5. Nasiri MJ, Dabiri H, Darban-Sarokhalil D, Hashemi Shahraki A. Prevalence of Non-Tuberculosis Mycobacterial Infections among Tuberculosis Suspects in Iran: Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS One*. 2015; 10 (6): e0129073.
6. Brode SK, Daley CL, Marras TK. The epidemiologic relationship between tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial disease: a systematic review. *Int J Tuberc Lung Dis*. 2014; 18 (11): 1370–7.
7. Henkle E, Winthrop KL. Nontuberculous mycobacteria infections in immunosuppressed hosts. *Clin Chest Med*. 2015; 36 (1): 91–9.
8. To K, Cao R, Yegiazaryan A, Owens J, Venketaraman V. General Overview of Nontuberculous Mycobacteria Opportunistic Pathogens: *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium abscessus*. *J Clin Med*. 2020; 9 (8): 2541.
9. Lin CK, Yang YH, Lu ML, Tsai YH, Hsieh MJ, Lee YC, et al. Incidence of nontuberculous mycobacterial disease and coinfection with tuberculosis in a tuberculosis-endemic region: A population-based retrospective cohort study. *Medicine (Baltimore)*. 2020; 99 (52): e23775.
10. Ishiekwe C, Subran M, Ghitan M, Kuhn-Basti M, Chapnick E, Lin YS. Case report on pulmonary disease due to coinfection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium abscessus*: Difficulty in diagnosis. *Respir Med Case Rep*. 2017; 20: 123–4.
11. Jun HJ, Jeon K, Um SW, Kwon OJ, Lee NY, Koh WJ. Nontuberculous mycobacteria isolated during the treatment of pulmonary tuberculosis. *Respir Med*. 2009; 103 (12): 1936–40.
12. Kurahara Y, Tachibana K, Tsuyuguchi K, Suzuki K. Mixed pulmonary infection with three types of nontuberculous mycobacteria. *Intern Med*. 2013; 52 (4): 507–10.
13. Andreevskaya SN, Larionova EE, Smirnova TG, Andrievskaya IYu, Kiseleva EA, Chernousova LN. Lekarstvennaja chuvstvitel'nost' medlennorastushih netuberkuleznych mikobakterij. *Tuberkulez i bolezni legkih*. 2016; 94 (4): 43–50. Russian.
14. Shahraki AH, Heidarieh P, Bostanabad SZ, Khosravi AD, Hashemzadeh M, Khandan S, et al. "Multidrug-resistant tuberculosis" may be nontuberculous mycobacteria. *Eur J Intern Med*. 2015; 26 (4): 279–84.
15. Bazzi AM, Abulhamayel Y, Rabaan AA, Al-Tawfiq JA. The impact of the coexistence of mycobacterium avium with mycobacterium tuberculosis on the result of GeneXpert and MGIT susceptibility test. *J Infect Public Health*. 2020; 13 (5): 827–9.
16. Makarova MV, Krasnova MA, Moroz AM. Sravnitel'nye dannye primeneniya vysokojeffektivnoj zhidkostnoj hromatografii dlja identifikacii mikobakterij, vydelenykh na zhidkoj i plotnoj pitatel'nyh sredah. *Tuberkulez i bolezni legkih*. 2009; 86 (10): 46–48. Russian.
17. Shitikov E, Ilina E, Chernousova L, Borovskaya A, Rukin I, Afanas'ev M, et al. Mass spectrometry based methods for the discrimination and typing of mycobacteria. *Infect Genet Evol*. 2012; 12 (4): 838–45.
18. Smirnova TG, Andreevskaya SN, Larionova EE, Andrievskaya IYu, Ustinova VV, Chernousova LN. Monitoring vidovogo raznoobrazija netuberkuleznych mikobakterij v rjace oblastej RF s ispol'zovaniem DNK-stripov Genotype *Mycobacterium CM/AS* (Hain Lifescience, Germanija). *Tuberkulez i bolezni legkih*. 2017; 95 (5): 54–59. Russian.
19. Starkova DA, Zhuravlev YuV, Vyazovaya AA, Soloveva NS, Kulikova ON, Narvskaya OV. Vidovoe raznoobrazie netuberkuleznych mikobakterij u bol'nyh mikobakteriozom na territorijah Severo-Zapadnogo federal'nogo okruga Rossii. *Tuberkulez i bolezni legkih*. 2019; 97 (6): 16–22. Russian.
20. Smirnova T, Ustinova V, Andreevskaya S, Larionova E, Kiseleva E, Chernousova L, et al. Evaluation of a new assay for nontuberculous mycobacteria species identification in diagnostic material and cultures. *Tuberculosis (Edinb)*. 2021; 130: 102124.
21. Guntupova LD, Borisov SE, Soloveva IP. Mikobakteriozy vo ftiziiopul'monologicheskoi praktike: obzor literatury i sobstvennyj opyt. *Prakticheskaja medicina*. 2011; 51 (3): 39–50. Russian.
22. Prikaz # 951 MZ RF ot 29.12.2014. Ob utverzhenii metodicheskikh rekomendacij po sovershenstvovaniju diagnostiki i lechenija tuberkuleza organov dyhanija. Russian.
23. Sevastyanova YeV, Chernousova LN. Sovremennye algoritmy mikrobiologicheskoi diagnostiki tuberkuleza. *Tuberkuljoz i bolezni ljogkih*. 2018; 96 (7): 11–17. Russian.
24. Ergeshov AE, Chernousova LN, Andreevskaya SN. Novye tehnologii diagnostiki lekarstvenno-ustojchivogo tuberkuleza. *Vestnik Rossijskoj akademii medicinskih nauk*. 2019; 74 (6): 413–22. Russian.
25. Ergeshov AE, Andreevskaya SN, Smirnova TG, Chernousova LN. Tuberkulez s lekarstvennoj ustojchivost'ju vozбудitelja: mehanizmy formirovanija i metody molekularno-geneticheskoi diagnostiki. *Vestnik Rossijskoj akademii medicinskih nauk*. 2023; 78 (6): 609–20. Russian.
26. Liang Q, Shang Y, Huo F, Xue Y, Li Y, Dong L, et al. Assessment of current diagnostic algorithm for detection of mixed infection with *Mycobacterium tuberculosis* and nontuberculous mycobacteria. *J Infect Public Health*. 2020; 13 (12): 1967–71.