

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ МЕТОДОВ ИДЕНТИФИКАЦИИ НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ КЛИНИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

А.В. Лямин¹, Д.Д. Исмагуллин¹, А.В. Жестков¹, А.М. Ковалев²,
Л.А. Барышникова², С.С. Неняйкин¹

¹ Самарский государственный медицинский университет МЗ РФ, г. Самара, Россия

² Самарский областной клинический противотуберкулезный диспансер им. Н.В. Постникова, г. Самара, Россия

Резюме. В последнее время наблюдается значительный рост заболеваемости микобактериозами, который обусловлен увеличением доли иммуносупрессированных пациентов, наличием у них различных коморбидных состояний, а также совершенствованием методов диагностики. Выбор наиболее точного метода идентификации является крайне важным в определении тактики лечения пациентов. Цель исследования — провести сравнительный анализ современных методов идентификации НТМБ, выделенных из клинического материала в 2015 г. в Самарской области. В работе проводилась идентификация 78 штаммов микроорганизмов. Лабораторная диагностика проводилась с использованием метода ДНК-гибридизации и методом MALDI-ToF масс-спектрометрии. **Результаты.** При идентификации микроорганизмов с использованием MALDI-ToF масс-спектрометрии было выделено 16 штаммов (20,5%) *M. kansasii*; по 11 штаммов (14,1%) *M. avium* и *M. fortuitum*; 9 штаммов (11,5%) *M. gordonae*; по 3 штамма (3,8%) *M. peregrinum*, *M. szulgai*, *M. chimera* intracellulare group, по 2 штамма (2,6%) *M. abscessus*, *M. septicum*, *M. paragordoniae*, *M. senegalence*, по 1 штамму (1,3%) *M. chelonae*, *M. frederiksbergense*, *M. monacense*, *M. lentiflavum*. При использовании метода масс-спектрометрии было идентифицировано 15 видов НТМБ, методом ДНК-гибридизации — 9 видов. Полное совпадение результатов идентификации было отмечено всего у 45 (57,7%) штаммов, несовпадающие результаты выявлены у 16 штаммов (20,5%). Наиболее часто при использовании метода ДНК-гибридизации несовпадение было выявлено у медленно растущих культур (9 штаммов) с преобладанием микроорганизмов, идентифицированных как *M. gordonae*. Среди представителей быстрорастущих НТМБ было выявлено 7 расхождений в идентификации, более часто среди представителей групп *M. fortuitum* и *M. peregrinum*. Особое внимание стоит обратить на идентификацию штамма *M. kansasii* молекулярно-генетическим методом, который масс-спектрометрией был определен как *M. bovis*. Обе культуры *M. tuberculosis* complex, которые были идентифицированы при помощи MALDI-ToF спектрометрии, ДНК-гибридизацией не были определены до вида. 17 (21,8%) штаммов микроорганизмов, которые не были идентифицированы при использовании метода ДНК-гибридизации, идентифицированы с помощью спектрометрии, включая медленно растущие микроорганизмы, не относящиеся к микобактериям 7 штаммов (9,0%): *Gordonia rubriperticta*, *Nocardia forcinica*, *Tsukumurella* spp., *Rhodotorula mucilaginosa*. Точная видовая идентификация НТМБ является основополагающей для определения тактики лечения пациентов с микобактериозами. Возможности идентификации нетуберкулезных микобактерий с использованием метода ДНК-гибридизации являются недостаточными на сегодняшний день. Внедрение новых методов, таких как MALDI-ToF спектрометрия, позволяет идентифицировать большее количество видов не-

Адрес для переписки:

Лямин Артем Викторович
443079, Россия, г. Самара, ул. Гагарина, 18.
Тел.: 8 (846) 260-33-61.
E-mail: avlyamin@rambler.ru

Contacts:

Artem V. Lyamin
443079, Russian Federaton, Samara, Gagarin str., 18.
Phone: +7 (846) 260-33-61.
E-mail: avlyamin@rambler.ru

Библиографическое описание:

Лямин А.В., Исмагуллин Д.Д., Жестков А.В., Ковалев А.М., Барышникова Л.А., Неняйкин С.С. Сравнительный анализ методов идентификации нетуберкулезных микобактерий, выделенных из клинического материала // Инфекция и иммунитет. 2017. Т. 7, № 3. С. 285–291. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-285-291

Citation:

Lyamin A.V., Ismatullin D.D., Zhestkov A.V., Kovalyov A.M., Baryshnikova L.A., Nenajkin S.S. Comparative analysis of methods for identification of nontuberculous mycobacteria isolated from clinical material // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2017, vol. 7, no. 3, pp. 285–291. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-285-291

туберкулезных микобактерий, а также другие виды медленно растущих микроорганизмов, имеющих сходства с микобактериями по культуральным и морфологическим свойствам, что значительно повышает диагностические возможности лабораторий.

Ключевые слова: микобактериозы, нетуберкулезные микобактерии, ДНК-гибридизация, MALDI-ToF масс-спектрометрия, идентификация микроорганизмов.

COMPARATIVE ANALYSIS OF METHODS FOR IDENTIFICATION OF NONTUBERCULOUS MYCOBACTERIA ISOLATED FROM CLINICAL MATERIAL

Lyamin A.V.^a, Ismatullin D.D.^a, Zhestkov A.V.^a, Kovalyov A.M.^b, Baryshnikova L.A.^b, Nenjakkin S.S.^a

^a Samara State Medical University, Samara, Russian Federation

^b Samara Regional Clinical Tuberculosis Dispensary named N.V. Postnikov, Samara, Russian Federation

Abstract. Recently there has been a significant increase in the incidence of mycobacteriosis, which is due to an increase in the proportion of immunosuppressed patients, the presence of these various comorbid conditions, as well as the improvement of diagnostic methods. Selecting the most accurate method of identification is extremely important in determining treatment strategy of patients. The aim of the study was to conduct a comparative analysis of modern methods of identification NTMB isolated from clinical specimens in 2015 in the Samara region. The work was carried out identification of 78 strains of microorganisms. Laboratory diagnosis was carried out using the DNA hybridization method and MALDI-ToF mass spectrometry. When microbial identification using MALDI-ToF mass spectrometry was isolated 16 strains (20.5%) *M. kansasii*; 11 strains (14.1%) *M. avium* and *M. fortuitum*; 9 strains (11.5%) *M. gordonae*; strain 3 (3.8%) *M. peregrinum*, *M. szulgai*, *M. chimera* intracellulare group, strain 2 (2.6%) *M. abscessus*, *M. septicum*, *M. paragordoniae*, *M. senegalense*, 1 strain (1.3%) *M. chelonae*, *M. frederiksbergense*, *M. monacense*, *M. lentiflavum*. By using mass spectrometry, it was identified 15 types NTMB compared with 9 types — by DNA hybridization. Full match identification results was observed only in 45 (57.7%) strains of divergent strains were found in 16 (20.5%). Most often when using the DNA hybridization method, discrepancy was detected in slow-growing cultures (9 strains) with a predominance of microorganisms identified as *M. gordonae*. Among the representatives of fast-growing NTMB, seven investigations were identified in the identification, more often among representatives of the *M. fortuitum* and *M. peregrinum* groups. Particular attention should be paid to the identification of the *M. kansasii* strain by a molecular genetic method, which mass spectrometry was defined as *M. bovis*. Both cultures of *M. tuberculosis* complex, which were identified by MALDI-ToF spectrometry, DNA hybridization were not determined to species. 17 (21.8%) of microbial strains which have been identified using the method of DNA hybridization, identified by spectrometry, including slow-growing microorganisms, non-mycobacteria strains seven (9.0%): *Gordonia rubriperticta*, *Nocardia forcinica*, *Tsukumurella* spp., *Rhodotorula mucilaginosa*. Accurate species identification NTMB is fundamental to determine the tactics of treatment of patients with mycobacteriosis. Due to this rather limited possibility of identification of non-tuberculous mycobacteria, using a DNA-hybridization method is inadequate to date. The introduction of new techniques, such as MALDI-ToF spectrometry, can identify a greater number of species of nontuberculous mycobacteria, as well as other types of slow-growing microorganisms having similarities with mycobacteria on cultural and morphological properties, which significantly increases the diagnostic capabilities of laboratories.

Key words: mycobacteriosis, nontuberculous mycobacteria, DNA-hybridization method, MALDI-ToF mass spectrometry, microorganisms identification.

Введение

Микобактериозы — группа заболеваний различной локализации, в развитии которых главным этиологическим фактором являются нетуберкулезные микобактерии (НТМБ). В связи с трудностями выделения и идентификации данной группы микроорганизмов, отсутствием данных о потенциальном клиническом значении некоторых из них, ростом заболеваемости туберкулезом, довольно долгое время интерес к данной группе микроорганизмов среди микробиологов был значительно ограничен. Однако с накоплением достаточного количества данных о патогенетическом действии НТМБ в последние десятилетия проблема этиологической диагностики микобактериозов вновь начала приобретать серьезную актуальность.

Во всех развитых странах отмечается значительный рост заболеваемости микобактериозами. Это обусловлено в первую очередь внедрением в практику совершенно новых методов диагностики, также это связано с различными неинфекционными иммуносупрессивными состояниями пациентов — после системной глюкокортикоидной и цитостатической терапии, лечением противоопухолевыми препаратами, широким распространением вторичных и первичных иммунодефицитов, которые могут являться главными факторами риска инфицирования НТМБ. Не менее важной причиной является подъем заболеваемости ВИЧ-инфекцией, с которым параллельно было отмечено наибольшее число случаев смертности от генерализованных форм инфекций, вызываемых НТМБ [7].

К сожалению, в Российской Федерации практически отсутствуют статистические данные о распространенности микобактериозов, отсутствует современная клиническая классификация, данные о видовой структуре НТМБ, особенностях эпидемиологии. Значительной проблемой является отсутствие нормативных документов, регламентирующих основные этапы проведения лабораторной диагностики данной группы заболеваний [5]. Тем не менее, в отечественной литературе все чаще стали публиковаться данные о генерализованных формах микобактериозов с летальными исходами [1, 2, 3, 4].

Кроме потенциальной клинической значимости и роста заболеваемости микобактериозами важную роль в актуализации проблемы играет совершенствование методов диагностики. Появление высокоспецифичных и чувствительных методов выделения и идентификации НТМБ (культивирование в автоматизированных системах с использованием жидких питательных сред, молекулярно-генетические методы и метод MALDI-ToF масс-спектрометрии) позволило существенно ускорить диагностику микобактериозов и повысить ее эффективность [7, 10].

Классическая видовая идентификация НТМБ в микробиологической практике долгое время имела значительные ограничения, связанные с метаболическими, генетическими, культуральными и широким рядом других особенностей. В современной лабораторной диагностике микобактериозов используются метод ДНК-гибридизации, предложенный «Hain Lifescience» (Германия) и рекомендованный Всемирной организацией здравоохранения в 2008 г. как основной метод идентификации НТМБ. Технология основана на принципе обратной гибридизации продукта ПЦР с видоспецифичными зондами, иммобилизованными на ДНК-стрипах. Для НТМБ разработаны два набора для ступенчатой идентификации, позволяющие определить до 28 видов НТМБ. Стоит отметить, что преимуществами данной методики являются достаточно высокая скорость и точность идентификации [9]. Основным недостатком этого метода исследования являются высокая себестоимость наборов реагентов, а соответственно и одного анализа.

В настоящее время известно довольно высокое разнообразие возбудителей микобактериозов, их насчитывается более 200 постоянно обитающих в окружающей среде видов, из которых около 50 являются возможными этиологическими факторами заболеваний человека различной локализации [6]. Данный факт свидетельствует о том, что ДНК-гибридизация для идентификации НТМБ, позволяющая определить 28 видов, на сегодняшний день является недостаточной. Решением этой проблемы, стало внедрение в лабораторную практику современного метода

масс-спектрометрии, который осуществляется с помощью MALDI-ToF масс-спектрометра с соответствующим программным обеспечением. Значительным преимуществом данного метода является наличие базы данных с различными спектрами, которая позволяет идентифицировать более 160 видов НТМБ на базе масс-спектрометра стандартной комплектации при использовании соответствующей библиотеки спектров, а также низкая себестоимость одного анализа.

В специализированных лабораториях противотуберкулезной службы, направленных на научную деятельность, используется молекулярно-генетическая идентификация микобактерий по гену 16S рРНК, который обладает высокой консервативностью [11]. Результаты секвенирования последовательности 16S рРНК позволяют проводить идентификацию уже известных НТМБ и могут использоваться для регистрации новых видов.

Помимо описанных выше методик, в решении проблемы видовой дифференциации нашло применение мультилокусное секвенирование. Данный анализ заключается в секвенировании определенного набора генов. В результате каждый штамм характеризуется специфическим «аллельным профилем» или сиквенс-типом по выбранным локусам. Метод позволяет идентифицировать бактерии до подвида, однако данный анализ довольно тяжело внедрить в рутинную лабораторную диагностику в связи с трудоемкостью и высокой стоимостью [8].

Следует отметить, что методы, основанные на секвенировании широко используются в высокоспециализированных микробиологических лабораториях, при этом на идентификацию требуется большое количество времени и средств, что является существенным недостатком для рутинной лабораторной диагностики. Таким образом, оптимальным для микробиологической практики остаются методы, основанные на ДНК-гибридизации и масс-спектрометрии.

Целью исследования является сравнительный анализ идентификации НТМБ, выделенных из клинического материала в 2015 г. в Самарской области, методом ДНК-гибридизации и масс-спектрометрии.

Материалы и методы

В исследовании проводилась идентификация 78 штаммов микроорганизмов, выделенных из клинического материала в 2015 г. Критерием включения штаммов в исследование являлось соответствие культуральных свойств и сроков появления роста на плотных и жидких питательных средах НТМБ. Клинический материал, из которого были выделены культуры, представлен мокротой — 74 образца, мочой — 1 образец, промывными водами бронхов — 2 образца, про-

мывными водами желудка — 1 образец. Штаммы были выделены в бактериологической лаборатории ГБУЗ Самарский областной клинический противотуберкулезный диспансер им. Н.В. Постникова.

Процедуры идентификации НТМБ с использованием методики ДНК-гибридизации проводились также на базе лаборатории ГБУЗ Самарский областной клинический противотуберкулезный диспансер им. Н.В. Постникова. Дополнительно экстрагировали белки выросших микроорганизмов для проведения идентификации с использованием масс-спектрометра. Идентификацию проводили на приборе Microflex LT® на базе микробиологического отдела клиничко-диагностической лаборатории клиник ФГБОУ ВО Самарский государственный медицинский университет МЗ РФ.

Принцип метода ДНК-гибридизации заключается в том, что на ДНК-стрипах нанесены специфические пробы, которые комплементарны амплифицируемым нуклеиновым кислотам (ампликонам). После денатурации одноцепочечные ампликоны специфически связываются с пробами на стрипах (этап гибридизации) и затем визуализируются в последовательной энзиматической реакции (со стрептавидином и щелочной фосфатазой). Детекция микобактерий выполняется путем сравнения результатов гибридизации с шаблонами.

На базе противотуберкулезного диспансера проводились процедуры пробоподготовки культур микобактерий для идентификации с использованием масс-спектрометра, включающие этапы инактивации и экстракции белков НТМБ по методике, рекомендованной Bruker Daltonic GmbH (Германия).

Таблица 1. Молекулярно-генетическая идентификация НТМБ

Table 1. Molecular-genetic identification of NTMB

Выделенная культура НТМБ Selected culture of NMTB	Количество штаммов Number of strains
<i>Mycobacterium</i> spp.	11
<i>M. fortuitum</i>	15
<i>M. kansasii</i>	14
<i>M. avium</i>	13
<i>M. gordonae</i>	12
<i>M. abscessus</i>	2
<i>M. intracellulare</i>	2
<i>M. celatum</i>	1
<i>M. peregrinum</i>	1
<i>M. chelonae</i>	1
Не идентифицировано (High GC GR+) Not identified	4
Не идентифицировано Not identified	2

В работе использовались биомассы микобактерии, выращенные на питательной среде Левенштейна–Йенсена. Процедуры выделения белков для идентификации включали несколько этапов. Первый этап — инактивация НТМБ, помещенных в пробирку с водой. Далее биомассы микобактерий кипятили в твердотельном термостате при температуре 96°C в течении 30 мин. Второй этап — добавление этанола и последующее осаждение биомассы микобактерий, с помощью настольной центрифуги в течении 2 мин на максимальной скорости (13 000 об/мин). Супернатант удалялся дозатором, полученный осадок высушивался при комнатной температуре. Третий этап — экстракция белков с добавлением циркониевокремниевых шариков, чистого ацетонитрила с последующим вортексированием в течение 1 мин. Далее добавлялся 70% раствор муравьиной кислоты с последующим центрифугированием на максимальной скорости в течении 2 мин. Полученный супернатант наносился на металлическую мишень и после высыхания покрывался стандартным раствором матрицы НССА (альфа-циано-4-гидроксикоричная кислота). В качестве стандарта калибровки использовался коммерческий препарат DN5-Alfa *E. coli* (Bruker bacteria test standart).

Результаты

Выделение и идентификация микобактерий лабораториями противотуберкулезных диспансеров в большинстве своем проходит с помощью метода ДНК-гибридизации как стандартного, рекомендованного ВОЗ, метода.

При идентификации данным методом были получены результаты, приведенные в таблице 1.

Преобладающей группой оказались представители медленно растущих НТМБ, среди которых было выделено 42 штамма (53,8%). При анализе НТМБ по способности выделять пигмент наибольшее количество составили нефотохромогенные культуры — 16 штаммов (38,1% от общего количества медленно растущих НТМБ), основным представителем этой группы является *M. avium* (13 штаммов). Фотохромогенные НТМБ были выделены в 14 случаях (33,3% от общего количества медленно растущих НТМБ) и были представлены *M. kansasii*; среди скотохромогенных НТМБ было выделено 12 штаммов *M. gordonae* (28,6% от общего количества медленно растущих НТМБ). Быстрорастущих НТМБ было выделено 19 штаммов (24,4%). Основным представителем оказалась *M. fortuitum* — 15 штаммов.

Молекулярно-генетическим методом не удалось идентифицировать до вида некоторых представителей рода *Mycobacterium* — 11 штаммов (14,1%). 6 культур, выросших на среде Левенштейна–Йенсена не были идентифицированы, 4 из них были определены как грамположи-

тельные бактерии с высоким содержанием гуанина и цитозина в геноме. Количество неидентифицированных до вида культур составило 21,7% (17 штаммов). Также следует отметить, что из 78 штаммов, включенных в исследование, методом ДНК-гибридизации было идентифицировано всего 9 видов микобактерий.

По результатам MALDI-ToF масс-спектрометрии видовая идентификация расценивалась нами при значениях индекса Score более 2.

Идентификация анализируемых культур при помощи метода масс-спектрометрии, показала следующие результаты, приведенные в таблице 2.

При анализе результатов идентификации методом масс-спектрометрии преобладающей группой также оказались медленно растущие НТМБ — 45 штаммов (57,7%). При этом наибольшее количество составили нефотохромогенные культуры — 18 штаммов (40,0%); основные представители данной группы также относились к виду *M. avium* (11 штаммов). Фотохромогенные НТМБ были выделены в 16 (35,6%) случаях и были представлены *M. kansasii*. Было выделено 11 штаммов скотохромогенных НТМБ (28,6%), представленных *M. gordonae* и *M. paragordoniae*. Группа быстрорастущих НТМБ составила 21 штамм (26,9%), основные представители *M. fortuitum* и *M. peregrinum* в общем количестве 14 штаммов. Представители видов *M. frederiksbergense* и *M. lentiflavum* по современной классификации занимают промежуточное значение между медленно- и быстрорастущими НТМБ, и были выделены в одном случае.

Помимо НТМБ среди культур, выбранных для исследования, с помощью MALDI-ToF масс-спектрометрии были идентифицированы медленно растущие микроорганизмы, не относящиеся к микобактериям: *Gordonia rubriperticta*, *Paenibacillus glucanolyticus*, *Nocardia forcinica*, *Tsukumurella* spp., *Corynebacterium amycolatum* и *Rhodotorula mucilaginosa*, имеющие потенциальное клиническое значение. Общее количество таких культур составило 7 штаммов (9,0%). Основную часть приведенных микроорганизмов невозможно идентифицировать рутинными методами идентификации. Представители нокардий имеют разную степень кислотоустойчивости, что затрудняет определение их родовой и видовой принадлежности, при этом по клинической картине поражения органов дыхания нокардиозы схожи с туберкулезным процессом. *R. mucilaginosa* относится к условно-патогенным грибам, способным расти на средах, которые применяют для культивирования микобактерий, и может вызывать патологические процессы в легочной ткани.

При сравнительном анализе методов ДНК-гибридизации и масс-спектрометрии полное совпадение результатов видовой идентификации отмечено у 45 (57,7%) штаммов *M. kansasii*, *M. avium*, *M. fortuitum*, *M. gordonae* и *M. abscessus*.

Таблица 2. Результаты идентификации микроорганизмов с использованием MALDI-ToF масс-спектрометрии

Table 2. Results of identification of microorganisms using MALDI-ToF mass spectrometry

Выделенная культура НТМБ Selected culture of NMTB	Количество штаммов Number of strains
<i>M. kansasii</i>	16
<i>M. avium</i>	11
<i>M. fortuitum</i>	11
<i>M. gordonae</i>	9
<i>M. peregrinum</i>	3
<i>M. szulgai</i>	3
<i>M. chimera intracellulare</i> group	3
<i>M. abscessus</i>	2
<i>M. septicum</i>	2
<i>M. paragordoniae</i>	2
<i>M. senegalence</i>	2
<i>M. chelonae</i>	1
<i>M. frederiksbergense</i>	1
<i>M. monacense</i>	1
<i>M. lentiflavum</i>	1
<i>M. tuberculosis complex</i>	2
<i>M. bovis</i>	1
<i>Gordonia rubriperticta</i>	1
<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>	1
<i>Nocardia forcinica</i>	2
<i>Tsukumurella</i> spp.	1
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1
<i>Corynebacterium amycolatum</i>	1

Согласно нашим данным несоответствующие результаты двух анализируемых в работе методов обнаружены у 16 штаммов (20,5%). 17 штаммов микроорганизмов, у которых не был определен вид при использовании ДНК-гибридизации, были идентифицированы с помощью MALDI-ToF спектрометрии. Полученные данные по идентификации НТМБ приведены в таблице 3.

Обсуждение

При описании групп НТМБ, выделенных в исследовании, использовалась классификация, предложенная в 1954 г. А. Timple и Е. Runyon, которая наиболее широко применяется в настоящее время. Согласно этой классификации, НТМБ делятся на группы по скорости роста, культуральным свойствам и способности к пигментообразованию. К первым трем группам относятся медленно растущие НТМБ, подразделяющиеся на фотохромогенные, скотохромогенные, нефотохромогенные; четвертая группа — быстрорастущие микобактерии. Преобладающей группой микобактерий при исследовании обоими методами оказались медленно растущие НТМБ.

Таблица 3. Сравнительный анализ методов идентификации НТМБ

Table 3. Comparative analysis of NTMB identification methods

ДНК-гибридизация DNA hybridization	MALDI-ToF масс-спектрометрия MALDI-ToF mass spectrometry
Идентифицированная культура Identified culture	
<i>M. gordonae</i>	<i>M. paragordoniae</i>
<i>M. fortuitum</i>	<i>Paenibacillus glucanolyticus</i>
<i>M. fortuitum</i>	<i>M. septicum</i>
<i>M. fortuitum</i>	<i>M. septicum</i>
<i>M. peregrinum</i>	<i>M. fortuitum</i>
<i>M. fortuitum</i>	<i>M. peregrinum</i>
<i>M. gordonae</i>	<i>M. paragordoniae</i>
<i>M. fortuitum</i>	<i>M. senegalence</i>
<i>M. celatum</i>	<i>M. chimera intracellulare group</i>
<i>M. fortuitum</i>	<i>M. senegalence</i>
<i>M. gordonae</i>	<i>M. kansassi</i>
<i>M. kansassi</i>	<i>M. bovis</i>
<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chimera intracellulare group</i>
<i>M. gordonae</i>	<i>M. fortuitum</i>
<i>M. intracellulare</i>	<i>M. chimera intracellulare group</i>
<i>M. gordonae</i>	<i>M. peregrinum</i>

Однако видовой состав микобактерий, идентифицированных масс-спектрометрическим методом и ДНК-гибридизацией, различался как среди медленно-, так и среди быстрорастущих НТМБ.

Следует отметить, что в результате исследования масс-спектрометрическим методом все штаммы микроорганизмов были идентифицированы до конкретного вида (в 5 случаях — до группы или комплекса). В общей сложности определяемых этим методом НТМБ было 15 видов по сравнению с 9 видами, идентифицированными методом ДНК-гибридизации. Особо следует отметить, что 3 культуры были идентифицированы как *M. tuberculosis complex*, среди которых идентифицирован один штамм *M. bovis*.

Наиболее часто при использовании метода ДНК-гибридизации несовпадение было выявлено у медленно растущих культур (9 штаммов) с преобладанием микроорганизмов, иденти-

фицированных как *M. gordonae*. Среди представителей быстрорастущих НТМБ было выявлено 7 расхождений в идентификации, более часто среди представителей групп *M. fortuitum* и *M. peregrinum*. Особое внимание стоит обратить на идентификацию штамма *M. kansassii* молекулярно-генетическим методом, который масс-спектрометрией был определен как *M. bovis*. Обе культуры *M. tuberculosis complex*, которые были идентифицированы при помощи MALDI-ToF спектрометрии, ДНК-гибридизацией не были определены до вида.

В связи с ростом заболеваемости микобактериозами, внедрение новых высокоточных методов исследования является принципиально важным с точки зрения постановки правильного и точного диагноза. В первую очередь нужно учитывать, что главным критерием при постановке микобактериоза следует считать выделение чистой культуры НТМБ, ее идентификацию до вида и определение резистентности к антимикробным химиопрепаратам.

Лабораторная идентификация НТМБ является основополагающей для определения тактики лечения пациентов с микобактериозами, так как у медленно- и быстрорастущих микобактерий имеются выраженные различия в природной и приобретенной устойчивости к антимикробным препаратам. В связи с этим возможность идентифицировать с использованием метода ДНК-гибридизации только 28 видов НТМБ является недостаточной в современных условиях диагностики. Из 200 известных видов НТМБ более 50 имеют доказанное клиническое значение и требуют более детальной идентификации.

Внедрение новых методов, таких как MALDI-ToF спектрометрия, позволяет идентифицировать более 160 видов НТМБ, а также другие виды медленно растущих микроорганизмов, имеющих сходство с микобактериями по культуральным и морфологическим свойствам, что значительно повышает диагностические возможности лабораторий. Развитие микробиологической диагностики микобактериозов в Российской Федерации является одним из приоритетных направлений современной бактериологии и требует разработки нормативной базы для проведения идентификации НТМБ в лабораториях различного уровня.

Список литературы/References

- Бердников, Р.Б., Гринберг Л.М., Евсеев А.Ю. Летальный случай генерализованного микобактериоза у больного с терминальной стадией ВИЧ-инфекции // Туберкулез и болезни легких. 2016. Т. 94, № 4. С. 57–62. [Berdnikov R.B., Grinberg L.M., Evseev A.Yu. The lethal case of generalized mycobacteriosis in the patient at the terminal stage of HIV-infection. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Disease*, 2016, no. 4, pp. 47–62. doi: 10.21292/2075-1230-2016-94-4-57-64 (In Russ.)]
- Майская, М.Ю., Оттен Т.Ф., Ариэль Б.М. Формы легочного и генерализованного микобактериоза при ВИЧ-инфекции в морфологическом освещении // Туберкулез и социально-значимые заболевания. 2014. № 1–2. С. 21–25. [Mayskaya M.Yu., Otten T.F., Ariel B.M. Pulmonary and generalized forms of mycobacteriosis in HIV infection in the morphological aspect. *Tuberkulez i sotsial'no-znachimye zabolvaniya = Tuberculosis and Socially Significant Diseases*, 2014, no. 1–2, pp. 21–25 (In Russ.)]

3. Михайловский, А.М., Чуркин С.А., Пашкова Н.А., Лепеха Л.Н. Первый случай посмертной диагностики генерализованного нетуберкулезного микобактериоза у больной на поздней стадии ВИЧ-инфекции в Оренбургской области // Вестник современной клинической медицины. 2016. Т. 9, № 5. С. 88–93. [Mihajlovskij A.M., Churkin S.A., Pashkova N.A., Lepeha L.N. The first case of post-mortem diagnosis of generalized non-tuberculosis mycobacteriosis in a patient with advanced HIV infection in the Orenburg region. *Vestnik sovremennoi klinicheskoi meditsiny = Herald of Modern Clinical Medicine*, 2016, no. 5, pp. 88–93. doi: 10.20969/VSKM.2016.9(5).88-93 (In Russ.)]
4. Оттен Т.Ф., Фоменкова Н.В., Майская М.Ю. Генерализованный микобактериоз у пациента с ВИЧ-инфекцией на стадии СПИДа // Туберкулез и болезни легких. 2015. № 8. С. 57–62. [Otten T.F., Fomenkova N.V., Majskaja M.Ju. Generalised mycobacteriosis in a patient with HIV infection with AIDS. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Disease*, 2015, no. 8, pp. 57–62 (In Russ.)]
5. Чучалин А.Г. Респираторная медицина. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2007. Т. 1. 800 с. [Chuchalin A.G. Respiratornaya medicina [Respiratory medicine]. Moscow: GEOTAR-Media, 2007, vol. 1, 800 p.]
6. Daley C.L., Griffith D.E. Pulmonary non-tuberculous mycobacterial infections. *Int. J. Tuberc. Lung Dis.*, 2010, vol. 14, no. 6, pp. 665–671. doi: 10.4046/trd.2014.77.1.1
7. Jorgensen J.H., Carroll K.C., Funke G., Landry M.L., Richter S.S., Warnock D.W. *Manual of Clinical Microbiology*, 11th ed., vol. 1, pp. 536–570. doi: 10.1128/9781555817381
8. Hall L., Doerr K.A., Wohlfiel S.L., Roberts G.D. Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, no. 41, pp. 1447–1453.
9. Lee A.S., Jelfs P., Sintchenko V., Gilbert G.L. Identification of non-tuberculous mycobacteria: utility of the GenoType Mycobacterium CM/AS assay compared with HPLC and 16S rRNA gene sequencing. *J. Med Microbiol.*, 2009, no. 58, pp. 900–904. doi: 10.1099/jmm.0.007484-0
10. Springer B., Stockman L., Tescher K., Roberts G.D., Böttger E.C. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic method. *J. Clin. Microbiol.*, 1996, no. 34, pp. 296–303.
11. Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990's. *J. Clin. Microbiol. Rev.*, 2003, no. 2, pp. 319–354. doi: 10.1128/CMR.16.2.319-354.2003

Авторы:

Лямин А.В., к.м.н., доцент кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;

Исматуллин Д.Д., студент 6 курса медико-профилактического факультета ФГБУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;

Жестков А.В., д.м.н., профессор, зав. кафедрой общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия;

Ковалев А.М., к.б.н., биолог бактериологической лаборатории ГБУЗ Самарский областной клинический противотуберкулезный диспансер им. Н.В. Постникова, г. Самара, Россия;

Барышникова Л.А., д.м.н., заместитель главного врача по медицинской части ГБУЗ Самарский областной клинический противотуберкулезный диспансер им. Н.В. Постникова, г. Самара, Россия;

Неняйкин С.С., зав. отделением инфекционной безопасности и гигиены Клиник ФГБУ ВО Самарский государственный медицинский университет Минздрава России, г. Самара, Россия.

Authors:

Lyamin A.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation;

Ismatullin D.D., 6th year student of the Faculty of Medicine and Prevention, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation;

Zhestkov A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of General and Clinical Microbiology, Immunology and Allergology, Samara State Medical University, Samara, Russian Federation;

Kovalyov A.M., PhD (Biology), Biologist, Bacteriological Laboratory, N.V. Postnikov Samara Regional Clinical Tuberculosis Dispensary, Samara, Russian Federation;

Baryshnikova L.A., PhD, MD (Medicine), Deputy Chief Physician, N.V. Postnikov Samara Regional Clinical Tuberculosis Dispensary, Samara, Russian Federation;

Nenjajkin S.S., Head of the Department of Infectious Safety and Hygiene, Samara State Medical University Clinics, Samara, Russian Federation.