

## ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА МИКОБАКТЕРИОЗОВ

**ЛЯМИН АРТЕМ ВИКТОРОВИЧ**, канд. мед. наук, доцент кафедры общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 443079, Самара, ул. Гагарина, 18, тел. +7-846-260-33-61, e-mail: avlyamin@rambler.ru

**ЖЕСТКОВ АЛЕКСАНДР ВИКТОРОВИЧ**, докт. мед. наук, профессор, зав. кафедрой общей и клинической микробиологии, иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 443079, Самара, ул. Гагарина, 18, тел. +7-846-260-33-61, e-mail: avzhestkov2015@yandex.ru

**ИСМАГУЛЛИН ДАНИР ДАМИРОВИЧ**, студент VI курса медико-профилактического факультета ФГБОУ ВО «Самарский государственный медицинский университет» Минздрава России, Россия, 443079, Самара, ул. Гагарина, 18, тел. +7-846-260-33-61, e-mail: danirhalitov@mail.ru

**КОВАЛЕВ АЛЕКСАНДР МИХАЙЛОВИЧ**, канд. биол. наук, биолог бактериологической лаборатории ГБУЗ «Самарский областной клинический противотуберкулезный диспансер им. Н.В. Постникова», Россия, 443068, Самара, ул. Ново-Садовая, 154, тел. +7-927-659-06-24, e-mail: alexferreiro@yandex.ru

**Реферат.** Микобактериозы — группа заболеваний, характеризующаяся поражением различных органов, с преимущественной локализацией в бронхолегочной системе. Особенностью этиологии микобактериозов является крайне высокое разнообразие возбудителей, относящихся к группе нетуберкулезных микобактерий. **Цель** — анализ современных данных по диагностике микобактериозов и идентификации нетуберкулезных микобактерий. **Материал и методы.** Проведен обзор публикаций отечественных и зарубежных авторов. Проанализированы особенности методов лабораторной диагностики микобактериозов, основанных на выделении нетуберкулезных микобактерий из биологического материала, и оценка их клинической значимости. **Результаты и их обсуждение.** На основе анализа исследований последних лет освещен современный взгляд на существующие причины роста заболеваемости микобактериозами. Представлены принципиальные особенности проведения преаналитического этапа, методик деконтаминации, микроскопического исследования клинического материала, культивирования нетуберкулезных микобактерий. Также описаны современные методы идентификации и их сравнительная характеристика. **Заключение.** В России отсутствуют утвержденные рекомендации по диагностике микобактериозов, а разнообразие нетуберкулезных микобактерий, в свою очередь, требует оптимизации алгоритмов их выделения и идентификации. Результаты, приведенные в зарубежных публикациях, демонстрируют противоречивые моменты лабораторной диагностики микобактериозов и требуют проведения дальнейших исследований в данном направлении.

**Ключевые слова:** микобактериозы, нетуберкулезные микобактерии, лабораторная диагностика.

**Для ссылки:** Лабораторная диагностика микобактериозов / А.В. Лямин, А.В. Жестков, Д.Д. Исмагуллин, А.М. Ковалев // Вестник современной клинической медицины. — 2017. — Т. 10, вып. 1. — С.29—35. DOI: 10.20969/VSKM.2017.10(1).29-35.

## LABORATORY DIAGNOSIS OF MYCOBACTERIOSIS

**LYAMIN ARTEM V.**, C. Med. Sci., associate professor of the Department of general and clinical microbiology, immunology and allergology of Samara State Medical University, Russia, 443079, Samara, Gagarin str., 18, tel. +7-846-260-33-61, e-mail: avlyamin@rambler.ru

**ZHESTKOV ALEXANDER V.**, D. Med. Sci., professor, Head of the Department of general and clinical microbiology, immunology and allergology of Samara State Medical University, Russia, 443079, Samara, Gagarin str., 18, tel. +7-846-260-33-61, e-mail: avzhestkov2015@yandex.ru

**ISMATULLIN DANIR D.**, 6-year student of faculty of preventative medicine of Samara State Medical University, Russia, 443079, Samara, Gagarin str., 18, tel. +7-846-260-33-61, e-mail: danirhalitov@mail.ru

**KOVALYOV ALEXANDER M.**, C. Biol. Sci., biologist of bacteriological laboratory of N.V. Postnikov Samara Region Clinical Tuberculosis Dispensary, Russia, 443068, Samara, Novo-Sadovaya str., 154, tel. +7-927-659-06-24, e-mail: alexferreiro@yandex.ru

**Abstract.** Mycobacteriosis unifies a group of diseases characterized by lesions of various organs with predominant localization in bronchopulmonary system. One of the etiological features is extremely high diversity of pathogens belonging to the group of nontuberculous mycobacteria (NTMB). **Aim.** Analysis of modern data on the diagnosis of mycobacteriosis and NTM identification. **Material and methods.** Review of publications of national and foreign authors. The article analyses the peculiarities of laboratory diagnosis of mycobacteriosis based on the NTMB allocation from biological material and evaluation of their clinical significance. **Results and discussion.** Analysis of the recent studies has illuminated a modern view on the underlying causes of the rise in mycobacteriosis incidence. The basic features of pre-analytical phase, methods of decontamination, microscopic examination as well as clinical material cultivation are presented. Current identification methods and their comparative characteristics are described. **Conclusion.** There are no approved guidelines for the diagnosis of mycobacteriosis in Russia. Variety of NTMB, in its turn, requires optimization of the algorithms for their isolation and identification. The results from foreign publications show contradictory aspects of laboratory diagnosis of mycobacteriosis and require further research in this direction.

**Key words:** mycobacteriosis, nontuberculous mycobacteria, laboratory diagnosis.

**For reference:** Lyamin AV, Zhestkov AV, Ismatullin DD, Kovalyov AM. Laboratory diagnosis of mycobacteriosis. The Bulletin of Contemporary Clinical Medicine. 2017; 10 (1): 29—35. DOI: 10.20969/VSKM.2017.10(1).29-35.

Термин «нетуберкулезные микобактерии» (НТМБ) объединяет в себе сапрофитные и потенциально патогенные микобактерии и наиболее точно характеризует разнообразную группу микроорганизмов, которую необходимо отделять от микобактерий туберкулезного комплекса. НТМБ — группа грамположительных кислотоустойчивых неспорообразующих бактерий, представителей рода *Mycobacterium*, постоянно обитающих в окружающей среде, в настоящее время насчитывается более 200 видов, из которых около 50 являются этиологическими факторами заболеваний различной локализации — микобактериозов [1].

За последнее десятилетие наблюдается заметный рост заболеваемости микобактериозами, который обусловлен, в первую очередь, увеличением доли иммунокомпрометированных пациентов и наличием у них различных коморбидных состояний, которые могут являться факторами риска при инфицировании НТМБ. Также это связано со значительным усовершенствованием методов идентификации НТМБ и активным внедрением их в практику.

Первое упоминание об атипичных микобактериях, впоследствии названных нетуберкулезными, было примерно в 30-е гг. XX в. [2]. В связи с трудностями выделения и идентификации данной группы микроорганизмов, отсутствием данных об их клиническом значении, а самое главное, ростом заболеваемости туберкулезом, интерес к данной группе микроорганизмов среди микробиологов был значительно ограничен. Однако с накоплением достаточного количества данных о патогенетическом действии НТМБ в последние десятилетия проблема диагностики микобактериозов вновь начала приобретать серьезную актуальность. Главным образом это связано с резким подъемом заболеваемости ВИЧ-инфекцией (ВИЧ — вирус иммунодефицита человека), что впоследствии привело к увеличению показателя смертности от генерализованных форм инфекций, вызываемых НТМБ [3]. Также увеличение частоты заболеваемости микобактериозами можно связать с иммуносупрессиями другого характера — системной глюкокортикоидной и цитостатической терапиями, которые используются при лечении тяжелых гипериммунных заболеваний, при пересадке органов для угнетения реакции отторжения трансплантата и при различных аутоиммунных заболеваниях. Важную роль играет широкое распространение вторичных и первичных иммунодефицитов неинфекционной этиологии, что было отмечено в различных исследованиях [4]. И, конечно же, важное значение в увеличении случаев диагностики микобактериозов имеет совершенствование методов диагностики. Появление высокоспецифичных и высокочувствительных методов выделения и идентификации НТМБ, а именно: культивирование в автоматизированных системах с использованием жидких питательных сред, молекулярно-генетические методы и метод высокопроизводительной жидкостной хроматографии миколовых кислот (High Performance Liquid Chromatography — HPLC), MALDI-TOF-масс-спектрометрия значительно расширили возможности лабораторной диагностики. Все это

в высокой степени позволило повысить скорость, качество и эффективность диагностики микобактериозов [4, 5].

Определенную сложность в диагностике микобактериозов носит неоднородность группы НТМБ. В РФ общепринятой считается классификация, основанная на разделении микобактерий на группы по скорости роста на питательных средах и пигментообразованию. Необходимо отметить, что в публикациях отечественных авторов наибольшее внимание уделено медленно растущим НТМБ, которые были идентифицированы молекулярно-генетическими методами [6, 7]. Данная особенность может быть связана со спецификой работы противотуберкулезной службы в РФ. Быстрорастущие НТМБ, со скоростью роста на плотных и жидких средах менее 3 сут, могут быть расценены как контаминирующая микрофлора.

Кроме разделения НТМБ по вышеуказанным признакам, среди них выделяют группы, объединенные по филогенетическим свойствам. Наиболее четко были описаны в литературе 3 комплекса НТМБ: *M.avium complex* (*M.avium*, *M.intracellulare*, *M.scrofulaceum*); *M.fortuitum complex* (*M.fortuitum*, *M.chelonae*); *M.terrae complex* (*M.terrae*, *M.triviale*, *M.nonchromogenicum*). Однако за последние годы появились данные о выделении 5 комплексов: к комплексам *M.avium*, *M.terrae*, *M.fortuitum* были добавлены *M.mucogenicum-phocaicum complex*, *M.intracellulare-chimaera complex*. С одной стороны, разделение на комплексы упрощает терапию микобактериозов, выделенных в одну группу, с другой — ставит новые задачи перед лабораторной службой в отношении диагностики представителей новых комплексов НТМБ, имеющих потенциальное клиническое значение [8, 9, 10].

**Особенности преаналитического этапа.** Для диагностики туберкулеза Всемирной организацией здравоохранения был принят алгоритм, который включает в себя трехкратное исследование образцов мокроты, собранных в течение 24 ч. Эта кратность обусловлена результатами систематических обзоров, в которых были приведены данные о том, что при увеличении количества исследований вероятность выделения микобактерий возрастает всего на 2% [11].

Однако данный подход нельзя однозначно использовать в отношении диагностики микобактериозов. Следует учитывать возможную транзитную колонизацию слизистых оболочек верхних дыхательных путей НТМБ из окружающей среды, в связи с чем выделение микроорганизмов данной группы из мокроты не всегда является критерием для постановки диагноза. По этой причине Американским торакальным обществом было установлено, что для постановки диагноза «микобактериоз» необходимо получение 3 утренних образцов, собранных в разные дни с интервалом примерно в неделю. Это обеспечивает снижение риска контаминацией клинического материала НТМБ из окружающей среды [11]. Основной причиной для обоснования такого подхода в диагностике микобактериозов являются результаты исследования, проведенного в Японии,

в котором были получены данные о диагностической значимости выделения НТМБ одного вида не менее чем в двух образцах мокроты. В случае использования в качестве исследуемого материала бронхоальвеолярного лаважа для верификации диагноза достаточно однократного выделения микобактерий [12, 13].

**Деконтаминация.** К стандартным методам разжижения и деконтаминации мокроты, которые рекомендованы в приказе МЗ РФ «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации» № 109 можно отнести:

- обработку материала 10% раствором трехзамещенного фосфорнокислого натрия;
- обработку 3% серной кислотой;
- обработку 4% раствором едкого натра.

Трехзамещенный фосфорнокислый натрий ( $\text{Na}_3\text{PO}_4$ ) хорошо подавляет сопутствующую флору и в течение 2—3 дней хранения материала при температуре  $+4^\circ\text{C}$ , не повреждает туберкулезные микобактерии и мало влияет на их способность к росту на питательных средах. Однако остается открытым вопрос о его влиянии на быстрорастущие НТМБ, которые могут иметь отличия в строении клеточной стенки.

Гидроокись натрия и серная кислота очень токсичны по отношению как к контаминирующим клинический материал микроорганизмам, так и к микобактериям. Поэтому при использовании данных методов необходимо строгое соблюдение указанного времени обработки. Оба эти метода также недостаточно изучены в отношении подавления ростовых свойств НТМБ; в литературе отсутствуют четкие критерии по концентрации и времени экспозиции в отношении различных групп микобактерий.

Так как приведенные выше методы имеют ряд недостатков, в нормативных документах приведены альтернативные методы деконтаминации, к которым можно отнести метод с использованием N-ацетил-L-цистеина (NALC) и гидроокиси натрия (NaOH) и метод с использованием 5% щавелевой кислоты или 4% серной кислоты.

Препарат NALC, который используется в качестве муколитического раствора, быстро разжижает мокроту и позволяет значительно снизить концентрацию деконтаминирующего вещества (NaOH) до 1%. Несмотря на то что метод более трудоемкий и дорогостоящий, он минимизирует негативное влияние этапа деконтаминации на витальные свойства микобактерий.

В случае высокой обсемененности клинического материала загрязняющей флорой, например у пациентов с муковисцидозом, деконтаминацию лучше проводить более агрессивными методами с использованием щавелевой или серной кислоты. Особенно эффективен данный метод в случае загрязнения мокроты неферментирующими грамотрицательными микроорганизмами и энтеробактериями.

Проблема качественной деконтаминации частично обуславливает низкую чувствительность культурального метода исследования на микобактерии, которая составляет порядка 80—90% [14, 15, 16]. Преаналитические ошибки, обуславливаю-

щие изменение жизнеспособности микобактерий в полученном клиническом материале, связанные с условиями хранения и проведения подготовки проб, могут составлять от 50 до 68% от всех ошибок в диагностике туберкулеза [17]. К сожалению, данные о влиянии этих факторов в отношении диагностики микобактериозов в литературе не представлены.

Помимо деконтаминации на качество выделения микобактерий из клинического материала значительное влияние оказывают условия хранения собранных образцов. Это обусловлено тем, что контаминирующая образцы микрофлора может значительно увеличить свою биомассу, что, безусловно, будет оказывать влияние на получение конечного результата. Наиболее приемлемым условием в отношении туберкулезных микобактерий является доставка их в лабораторию в кратчайшие сроки, в случае отсутствия такой возможности допускается охлаждение пробы в холодильнике при температуре плюс  $5\text{—}10^\circ\text{C}$ . Целью создания данных условий является снижение вероятности размножения контаминирующей микрофлоры в образцах мокроты. Однако хранение мокроты без консерванта при таких условиях не исключает возможность размножения в образцах психрофильной условно-патогенной микрофлоры.

При проведении подготовки проб для выделения НТМБ следует учитывать, что использование деконтаминантов при любых условиях косвенно или напрямую влияет на ростовые свойства микобактерий. Так, все применяемые деконтаминанты могут уничтожить и часть популяции микобактерий. В результате обработки некоторыми из них может погибнуть до 90% микобактерий [18, 19]. Кроме того, следует помнить, что микобактерии, выделяющиеся из дыхательных путей, окружены большим количеством слизи, затрудняющей их концентрирование. В связи с этим необходимо разрабатывать новые щадящие методы обработки, позволяющие, с одной стороны, подавить быстрорастущие условно-патогенные микроорганизмы, а с другой — максимально сохранить жизнеспособность присутствующих в материале микобактерий [16].

**Микроскопическое исследование.** Известно, что клеточная стенка микобактерий имеет схожие признаки, свойственные грамположительным микроорганизмам, однако в отличие от них содержит значительно большее количество липидов. Данный факт существенно влияет на восприятие основных красителей, которые применяются при микроскопическом исследовании нативного и обработанного материала, а также чистых культур. Практически у всех микобактерий отсутствует чувствительность к анилиновым красителям, что само собой создает дополнительные трудности в диагностике микобактериозов. Применение специальных методов окраски по методу Циля — Нельсена и восприимчивость к флюорохромным красителям (аурамин и родамин) дает возможность выявить микобактерии в клиническом материале, но, к сожалению, не позволяет провести дифференциальную диагностику НТМБ с микобактериями туберкулезного комплекса [4, 14].



При микроскопическом исследовании мокроты необходимо учитывать возможность ее контаминации микрофлорой со слизистых оболочек ротоглотки. При интерпретации результатов стоит учитывать, что некоторые НТМБ могут входить в состав транзитной микрофлоры нестерильных локусов. Также при пробоподготовке, особенно при взятии промывных вод бронхов (желудка), крайне необходимо соблюдать правила асептики для предупреждения попадания НТМБ, обитающих в окружающей среде и, в первую очередь, в неочищенной воде, чтобы исключить ложноположительные результаты бактериоскопии [8].

**Культуральный метод.** Культивирование микобактерий на питательных средах является наиболее широко используемым методом для диагностики микобактериозов. В целях обеспечения максимальной чувствительности данного метода важное значение имеет тип используемой питательной среды, а также использование добавок и поддержание оптимальной температуры инкубации [4].

Однако культивирование НТМБ существенно отличается от культивирования микобактерий туберкулезного комплекса. В первую очередь, это связано с высокой неоднородностью данной группы микроорганизмов. Общепринятой методикой выделения микобактерий из клинического материала считается культивирование на плотных (Финн-II, Левенштейна — Йенсена) и жидких (Миддлбрук) средах [5, 8]. В последнее время в медицинских лабораториях получили распространение автоматические и полуавтоматические системы культивирования, основанные на работе с жидкими питательными средами. Тем не менее остается открытым вопрос о выборе наиболее оптимальной комбинации среды при выделении НТМБ из клинического материала. Так, если использовать только жидкие питательные среды, то сохраняется риск невыделения из материала таких медленно растущих НТМБ, как *M. xenopi*, что обусловлено довольно замедленным метаболизмом этого микроорганизма. С другой стороны, слишком активный рост некоторых быстрорастущих НТМБ может быть косвенно расценен как контаминация материала сапрофитной микрофлорой. По этой причине необходима визуальная оценка всех отрицательных флаконов с использованием либо прямой микроскопии, либо пересева на плотные питательные среды.

Использование только плотных питательных сред также ограничивает возможность выделения некоторых микроорганизмов из НТМБ из-за особенностей их метаболизма, а также различий в температурном оптимуме при культивировании некоторых НТМБ.

**Современные методы идентификации НТМБ.** Так как при использовании только классических микробиологических методов возникает ряд нерешенных проблем, связанных с выделением и идентификацией НТМБ, достаточно часто на практике используются дополнительные методы, к которым можно отнести, в частности, молекулярно-генетические исследования.

За последнее время идентификация НТМБ, проводимая в лабораториях противотуберкулезной службы разных стран, вышла на качественно новый уровень. Прежде всего, это связано с появлением новейших высокоспецифичных и высокоточных методов диагностики, среди которых молекулярно-генетические методы сделали наибольший скачок, в особенности по сравнению с ранее используемыми в лабораторной диагностике микобактериозов биохимическими тестами и по сравнению с методом высокопроизводительной жидкостной хроматографии миколовых кислот (HPLC) [20].

Наибольшее распространение в лабораторных исследованиях, проводимых медицинскими учреждениями, получили методы линейного анализа ДНК-зондами (LIPA), предназначенными для проведения амплификации ДНК и последующей гибридизацией на нейлоновых мембранах, так называемых ДНК-стрипах с маркерными олигонуклеотидными зондами. Предложенные диагностические наборы позволяют идентифицировать часто встречающиеся и клинически значимые виды НТМБ. Данный метод позволяет исследовать культуру, выросшую как на плотной, так и жидкой питательных средах, максимальное время получения результата — от нескольких часов до 2 дней.

В более специализированных лабораториях научного профиля используется молекулярно-генетическая идентификация микобактерий по гену *16S rPHK*, который обладает высокой консервативностью: отличия в последовательности даже на 1% (и более) обычно позволяют говорить о видовом различии образцов [21, 22]. Результаты секвенирования последовательности *16S rPHK* для каждого вида вносятся в общедоступные базы данных, которые служат как для идентификации уже известных НТМБ, так и для регистрации новых видов. Помимо консервативных участков для видовой дифференциации используется анализ двух гипервариабельных последовательностей (так называемые области *A* и *B*) в гене *16S rRNA*. Как правило, достаточно анализа последовательности области *A* для определения видовой принадлежности большинства НТМБ. Область *B* анализируется в случаях описания новых видов или видов, не дифференцируемых только по области *A* и консервативных последовательностей. Например, последовательности *16S rRNA M. chelonae* и *M. abscessus* отличаются только 4 п.н., что затрудняет их дифференциацию данным методом [23]. Некоторые виды с недавней дивергенцией могут содержать весьма сходные последовательности гена *16S rPHK* (например, разница между *M. szulgai* и *M. malmoense* составляет два нуклеотида).

Помимо описанных выше методик в решении проблемы видовой дифференциации нашло применение мультилокусное секвенирование (*Multi Locus Sequence Typing, MLST*). 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.

Широко применяются методы, связанные с анализом полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (*PRA method*) последовательности гена, кодирующего белок теплового шока 65 кДа (*Hsp65*). Размер рестрикционных фрагментов, как правило, видоспецифичен (56-59). Данная методика хоть и является относительно быстрой и позволяет определять многие виды НТМБ, которые не идентифицируются фенотипическими методами, но, также как и MLST, не является актуальной в рутинной практике медицинских лабораторий.

Все вышеуказанные методы широко используются в специализированных микробиологических лабораториях. Однако стоит отметить, что при этом на идентификацию требуется большое количество времени и средств. Оптимальным решением данной проблемы является появление совершенно новой системы, которая произвела революцию в современной микробиологии. Она представлена в виде метода матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации MALDI (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization) TOF MS (Time of Flight Mass-Spectrometry) — время пролетной масс-спектрометрии. Данный метод основан на многократном воздействии импульсов лазера на предварительно покрытую матрицей бактериальную клетку и последующей ионизацией белков. Матрица представляет собой вещество ( $\alpha$ -циано-4-гидроксикоричная кислота), которое способно понижать деструктивные характеристики лазерного излучения и повышать последующую ионизацию анализируемого вещества. Далее полученные ионизированные белки движутся к детектору, который находится в анализаторе. Программное обеспечение прибора оценивает время пролета частиц и преобразует эту информацию в спектр молекулярных масс (масс-спектр), представленный в виде отношения массы и заряда. Масс-спектр сравнивается со спектрами из базы данных, и на основании наличия определенных белков, их массы и количества происходит идентификация бактерий. Важным преимуществом данного метода является то, что он обеспечивает высокую производительность, специфичность, чувствительность, а также непревзойденную скорость анализа, требующего меньше одной минуты, однако и этот метод не является идеальным. Качество диагностики зависит от наличия определенных баз данных, что оказывает определенное влияние на стоимость идентификации. Также на

идентификацию могут влиять условия культивирования микроорганизмов, методы подготовки проб и ряд других факторов. Сравнительная характеристика описанных выше методов представлена в *таблице*.

Видовая идентификация играет принципиально важное значение для выбора клинической тактики, так как позволяет не только оценить возможное участие НТМБ в патологическом процессе, но и определяет выбор антимикробной химиотерапии.

**Особенности определения резистентности к антимикробным препаратам.** Несмотря на то что НТМБ принадлежат к роду *Mycobacterium*, многие из них имеют существенные отличия от микобактерий туберкулезного комплекса по чувствительности к антимикробным препаратам. Большинство видов НТМБ имеют природную устойчивость как к противотуберкулезным препаратам, так и к препаратам других групп.

Всего существует несколько методов определения антибиотикорезистентности у микобактерий. Большинство из них основаны на культивировании микобактерий на плотных или жидких питательных средах с добавлением антимикробных препаратов разных концентраций. Осуществляются эти методы в виде прямого и непрямого посева. При прямом методе обычно используются две питательные среды, на которые производят посев. Клинический материал, подготовленный соответствующим образом, засевают на питательные среды, содержащие и не содержащие определенные концентрации антибактериальных препаратов. При непрямом методе на питательные среды, которые содержат и не содержат определенные концентрации лекарственных препаратов, засеивается суспензия чистой культуры микобактерий, выращенной на искусственных средах.

В международной практике также используют следующие методы определения чувствительности к антимикробным препаратам: метод пропорций на среде Левенштейна — Йенсена или на среде Миддлбука 7Н10; метод абсолютных концентраций на плотной яичной среде Левенштейна — Йенсена; метод коэффициента резистентности; радиометрический метод Bactec R460 [24]. Одним из наиболее перспективных на сегодняшний день методов является метод, основанный на двойных серийных микроразведениях препаратов различных групп для определения минимальных подавляющих концентраций. Производитель предлагает две тест-системы: для медленно растущих (13 наименований препаратов) и быстро растущих (15 наименований препаратов) НТМБ (Sensititre®).

Сравнительная характеристика методов идентификации НТМБ

Наименование	Точность	Стоимость
Высокопроизводительная жидкостная хроматография миколовых кислот	+	+
Линейный анализ ДНК-зондами	++	++++
Генное секвенирование 16S—23S участков р-ДНК	++++	+++
Мультилокусное секвенирование	+++++	++++
Метод, основанный на масс-спектрометрии	+++	++

Таким образом, микобактериозы представляют на сегодняшний день серьезную проблему как для врачей-клиницистов, так и для специалистов лабораторной службы. Значительное разнообразие возбудителей, сложности проведения преаналитического этапа, неоднозначность методов микроскопического исследования и культивирования, внедрение в практику принципиально новых методов идентификации требуют разработки нормативных документов, регламентирующих алгоритмы лабораторной диагностики и идентификации этиологически значимых НТМБ. Особенно остро этот вопрос стоит в связи со значительным подъемом заболеваемости ВИЧ-инфекцией и увеличением количества пациентов с выраженными иммунодефицитами.

**Прозрачность исследования.** Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.

**Декларация о финансовых и других взаимоотношениях.** Все авторы принимали участие в разработке концепции, дизайна исследования и в написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы не получали гонорар за исследование.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Daley, C.L. Pulmonary non-tuberculous mycobacterial infections / C.L. Daley, D.E. Griffith // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* — 2010. — Vol. 14, № 6 — P.665—671.
- Вейсфеллер, Д. Биология и изменчивость микобактерий туберкулеза и атипичные микобактерии: экспериментальные и теоретические исследования / Д. Вейсфеллер. — Будапешт, 1975. — 335 с.
- Елисеев, П.И. Роль молекулярно-генетических методов Genotype в повышении эффективности диагностики туберкулеза с лекарственной устойчивостью микобактерий и микобактериозов: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Елисеев Платон Иванович; ГБОУ ВПО «Северный государственный медицинский университет» Минздрава России. — СПб., 2013. — 23 с.
- Майрова, А.А. Идентификация нетуберкулезных микобактерий и выбор оптимальной комбинации методов для их видовой дифференциации: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Майрова Ангелина Александровна; ФГУЗ «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора РФ. — М., 2007. — 26 с.
- Springer, B. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic method / B. Springer, L. Stockman, K. Tescher // *J. Clin. Microbiol.* — 1996. — № 34. — P.296—303.
- Нетуберкулезные микобактерии у пациентов с заболеваниями органов дыхания (клинико-лабораторное исследование) / А.Э. Эргешов, Е.И. Шмелев, М.Н. Ковалевская [и др.] // *Пульмонология.* — 2016. — Т. 26, № 3. — С.303—308.
- Альховик, О.И. Распространенность нетуберкулезных микобактерий в Сибири / О.И. Альховик, М.А. Дымова, А.Г. Чередниченко // XIX Кашкинские чтения: тез. докл. Российско-китайской науч.-практ. конф. по медицинской микробиологии и клинической микологии // *Проблемы медицинской микологии.* — 2016. — Т. 18, № 2. — С.37.
- Клиническая лабораторная диагностика: национальное руководство: в 2 т. / В.В. Долгова, В.В. Меньшикова. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. — Т. II. — 808 с.
- RpoB gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp. nov., *Mycobacterium phocaicum* sp. nov. and *Mycobacterium aubagnense* sp. nov. / T. Adekambi, P. Berger, D. Raoult, M. Drancourt // *Int. J. Syst. Evol. Micr.* — 2006. — № 56. — P.133—143.
- Tortoli, E. Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp. nov. / E. Tortoli, L. Rindi, M.J. Garcia [et al.] // *Int. J. Syst. Evol. Micr.* — 2004. — № 54. — P.1277—1285.
- Griffith, D.E. An official ATS IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial disease / D.E. Griffith, T. Aksamit, B.A. Brown-Eliot // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* — 2007. — № 175. — P.367—416.
- Pye, A. Effect of storage and postage on recovery and quantitation of bacteria in sputum samples / A. Pye, S.L. Hill, P. Bharadwa // *J. Clin. Pathol.* — 2008. — № 61. — P.352.
- Mase, S.R. Yield of serial sputum specimen examinations in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review / S.R. Mase, A. Ramsay // *Int. J. Tuberc. Lung Dis.* — 2007. — № 11. — P.485—495.
- Севастьянова, Э.В. Выявление туберкулеза методом микроскопии / Э.В. Севастьянова, В.И. Голышевская. — Тверь: Триада, 2008. — 100 с.
- Голышевская, В.И. Современное состояние микробиологической диагностики туберкулеза в России / В.И. Голышевская, Э.В. Севастьянова // Актуальные проблемы туберкулеза и болезней легких: материалы научной сессии, посвященной 85-летию ЦНИИТ РАМН. — М., 2006. — С.17—18.
- Голышевская, В.И. Культуральные методы диагностики туберкулеза: учеб. пособие для проведения базового курса обучения специалистов бактериологических лабораторий учреждений противотуберкулезной службы / В.И. Голышевская, М.В. Шульгина; под ред. чл.-корр. РАМН, проф. В.В. Ерохина. — М.; Тверь: Триада, 2008. — 208 с.
- Лопакоев, К.В. Новый интегральный показатель «эпидемиологический потенциал туберкулеза» / К.В. Лопакоев, Т.П. Сабгайда, С.А. Попов // *Социальные аспекты здоровья населения.* — 2009. — № 1. — С.4.
- Перельман, М.И. Туберкулез / М.И. Перельман. — М.: Медицина, 2002. — С.150—233.
- Современное состояние лабораторной службы России по диагностике туберкулеза: основные проблемы и пути их преодоления / В.И. Голышевская, Э.В. Севастьянова, О.А. Иртуганова, В.В. Ерохин // *Проблемы туберкулеза и болезней легких.* — 2006. — № 12. — С.36—42.
- Лабинская А.С. Оппортунистические инфекции: возбудители и этиологическая диагностика / А.С. Лабинская, Н.Н. Костюкова (ред.). — М.: Изд-во «Бином», 2013. — 752 с.
- McNabb, A.D. Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (hsp65) for routine identification of mycobacterium species isolated from clinical sources / A.D. McNabb, K. Eisler, M. Adlie [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* — 2004. — № 42. — P.3000—3011.
- Tortoli, E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990's. / E. Tortoli // *J. Clin. Microbiol. Rev.* — 2003. — № 2. — P.319—354.
- Evaluation of the MicroSeq system for identification of mycobacteria by 16S ribosomal DNA sequencing and



its integration into a routine clinical mycobacteriology laboratory / L. Hall, K.A. Doerr, S.L. Wohlfiel, G.D. Roberts // J. Clin. Microbiol. — 2003. — № 41. — P.1447—1453.

24. Huitt, G.A. Clinic in chest medicine. Nontuberculous mycobacteria / G.A. Huitt, C.L. Daley // Elsevier. — 2015. — Vol. 36, № 1. — P.125.

## REFERENCES

1. Daley CL, Griffith DE. Pulmonary non-tuberculous mycobacterial infections. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2010; 14 (6): 665–671.
2. Vejsfeller D. Biologija i izmenchivost' mikobakterij tuberkuleza i atipichnye mikobakterii: jeksperimental'nye i teoreticheskie issledovanija [Biology and variability of *Mycobacterium tuberculosis* and atypical mycobacteria: an experimental and theoretical study]. Budapesht. 1975; 335 p.
3. Eliseev PI. Rol' molekularno-geneticheskikh metodov; Genotype v povyshenii jeffektivnosti diagnostiki tuberkuleza s lekarstvennoj ustojchivost'ju mikobakterij i mikobakteriozov [Role of molecular-genetic techniques; Genotype to improve the diagnosis of drug-resistant tuberculosis mycobacteria and mycobacteriosis]. Sankt-Peterburg [Saint Petersburg]. 2013; 23 p.
4. Majrova AA. Identifikacija netuberkuleznych mikobakterij i vybor optimal'noj kombinacii metodov dlja ih vidovoj differenciacii [Identification of nontuberculous mycobacteria and the selection of the optimal combination of methods for species differentiation]. Moskva [Moscow]. 2007; 26 p.
5. Springer B, Stockman L, Tescher K et al. Two-laboratory collaborative study on identification of mycobacteria: molecular versus phenotypic methods. *J Clin Microbiol.* 1996; 34; 296–303.
6. Jergeshov AJe, Shmelev EI, Kovalevskaja MN, Larionova EE, Chernousova L.N. Netuberkuleznye mikobakterii u pacientov s zabolevanijami organov dyhanija (kliniko-laboratornoe issledovanie) [Non-tuberculous mycobacteria in patients with respiratory diseases (clinico-laboratory research)]. *Pul'monologija [Pulmonology]*. 2016; 26 (3): 303-308.
7. Al'hovik OI, Dymova MA, Cherednichenko AG. Rasprostranennost' netuberkuleznych mikobakterij v Sibiri [The prevalence of nontuberculous mycobacteria in Siberia]: Tezisy dokladov Vserossijskoj nauchno-prakticheskoi konferencii po medicinskoj mikrobiologii i klinicheskoj mikologii [Abstracts of all-Russian scientific-practical conference on medical Microbiology and clinical Mycology]. XIX Kashkinskije chtenija Problemy medicinskoj mikologii [Problems in medical Mycology]. 2016; 37.
8. Dolgova VV, Men'shikova VV. Klinicheskaja laboratornaja diagnostika: nacional'noe rukovodstvo [Clinical diagnosis laboratornaja: national enterprise guide]. Moskva [Moscow]: GJeOTAR-Media. 2013; 808 p.
9. Adekambi T, Berger P, Raoult D, Drancourt M. RpoB gene sequence-based characterization of emerging non-tuberculous mycobacteria with descriptions of *Mycobacterium bolletii* sp nov, *Mycobacterium phocaicum* sp nov and *Mycobacterium aubagnense* sp nov. *Int J Syst Evol Micr.* 2006; 56: 133–143.
10. Tortoli E, Rindi L, Garcia MJ, Chiaradonna P, Dei R, Garzelli C et al. Proposal to elevate the genetic variant MAC-A, included in the *Mycobacterium avium* complex, to species rank as *Mycobacterium chimaera* sp nov. *Int J Syst Evol Micr.* 2004; 54: 1277–1285.
11. Griffith DE, Aksamit T, Brown-Eliot BA et al. An official ATS IDSA statement: diagnosis, treatment, and prevention of nontuberculous mycobacterial disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2007; 175: 367–416.
12. Pye A, Hili SL, Bharadwa P. Effect of storage and postage on recovery and quantitation of bacteria in sputum samples. *J Clin Pathol.* 2008; 61: 352-354.
13. Mase SR, Ramsay A. Yield of serial sputum specimen examinations in the diagnosis of pulmonary tuberculosis: a systematic review. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2007; 11: 485-495.
14. Sevast'janova EV, Golyshevskaja VI. Vyjavlenie tuberkuleza metodom mikroskopii [Detection method microscopy]. Tver' [Tver]: Triada. 2008; 100 p.
15. Golyshevskaja VI. Sovremennoe sostojanie mikrobiologicheskoi diagnostiki tuberkuleza v Rossii [The modern state of microbiological diagnosis of TB in Russia]. Aktual'nye problemy tuberkuleza i boleznej legkih: materialy nauchnoj sessii, posvjashhennoj 85-letiju CNIIT RAMN [Actual problems of tuberculosis and lung disease: materials of scientific session dedicated to the 85th anniversary of the RAMS], Moskva [Moscow]. 2006; 17–18.
16. Golyshevskaja VI, Shul'gina MV, Erohin VV. Kul'tural'nye metody diagnostiki tuberkuleza: uchebnoe posobie dlja provedenija bazovogo kursa obuchenija specialistov bakteriologicheskikh laboratorij uchrezhdenij protivotuberkuleznoj sluzhby [Culture methods for diagnosis of tuberculosis: a training manual for conducting the basic course of training specialists of the bacteriological laboratory of the TB control service]. Tver' [Tver]: Triada. 2008; 208p.
17. Lopakov KV, SabgajdaTP, Popov SA. Novyj integral'nyj pokazatel' «Jepidemiologicheskij potencial tuberkuleza» social'nye aspekty zdorov'ja naselenija [New integrated indicator of «the potential Epidemiological tuberculosis»]. Social'nye aspekty zdorov'ja naselenija [Social aspects of population health]. 2009; 1: 4.
18. Perel'man MI, Korjakin VA, Protopopova NM. Tuberkulez [Tuberculosis]. Moskva [Moscow]: Medicina [Medicine]. 2002; 150-233.
19. Golyshevskaja VI, Sevast'janova EV, Irtuganova OA, Erohin VV. Sovremennoe sostojanie laboratornoj sluzhby Rossii po diagnostike tuberkuleza: osnovnye problemy i puti ih preodolenija [Modern state of the laboratory service of Russia in the diagnosis of tuberculosis: problems and ways of overcoming them]. *Problemy tuberkuleza i boleznej legkih [Problems of tuberculosis and lung disease]*. 2006; 12: 36–42.
20. Labinskaja AS, Kostjukova NN. Opportunisticheskie infekcii: vozbuditeli i jetiologicheskaja diagnostika [Opportunistic infections: causative agents and aetiological diagnosis]. Moskva [Moscow]: BINOM. 2013; 752 p.
21. McNabb AD, Eisler K, Adlie M, Amos M, Rodrigues G, Stephens WA, Black I, Renton J. Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (hsp65) for routine identification of mycobacterium species isolated from clinical sources. *J Clin Microbiol.* 2004; 42: 3000–3011.
22. Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990's. *Clin Microbiol Rev.* 2003; 2: 319–354.
23. Hall L, Doerr KA, Wohlfiel SL, Roberts GD. 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; 41: 1447–1453.
24. Huitt GA, Daley CL. Elsevier Clinic in chest medicine. Nontuberculous mycobacteria. 2015; 36 (1): 125.