



А.І. Барбова, О.А. Журило, П.С. Трофімова,
С.В. Миронченко

ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології
імені Ф.Г. Яновського НАМН України», Київ

Досвід виділення, індикації і ідентифікації нетуберкульозних мікобактерій, отриманий під час I Національного дослідження поширення хіміорезистентного туберкульозу в Україні

Мета роботи — вивчення наявності нетуберкульозних мікобактерій у циркулюючій мікобактеріальній популяції хворих на туберкульоз, що брали участь у дослідженні поширення хіміорезистентного туберкульозу в Україні, з'ясування етіологічної ролі нетуберкульозних мікобактерій, їхнє виділення та ідентифікація, вивчення деяких морфологічних та біологічних властивостей.

Матеріали та методи. Мазки мокротиння від пацієнтів досліджено на наявність кислотостійких бактерій шляхом прямої мікроскопії після забарвлення за методом Ціля—Нільсена. Для всіх зразків з позитивними результатами мікроскопії виконано весь спектр бактеріологічних досліджень з діагностики туберкульозу, згідно з алгоритмом, схваленим наказом МОЗ України № 620. Проведено бактеріологічні дослідження з ідентифікації клінічних ізолятів за стандартними методиками, викладеними в наказі МОЗ України № 45. Видова ідентифікація культур складалася з двох етапів: первинного та остаточного.

Для посіву використано такі середовища: рідке — бульйон Middlebrook 7H9 і щільне ячне Левенштейна—Єнсена. Передпосівну обробку клінічного матеріалу здійснювали за допомогою 0,5% стерильного розчину N-ацетил-L-цистеїну з 1,0% натрію гідроксиду (BBL Mucorger NALC-NAOH). Пробірки поміщали в систему BACTEC MGIT 960 та інкубували. Засів здійснювали паралельно на щільне середовище Левенштейна—Єнсена.

Для ідентифікації штамів використовували ID MTB MGIT тест і визначали спроможність росту клінічних ізолятів мікобактерій на середовищі з саліциловокислим натрієм та паранітробензойною кислотою (для визначення належності мікобактерій до туберкульозного комплексу).

Для остаточної ідентифікації мікобактерій застосовували генетичну тест-систему GenoType® MTB DR (Hain, Laifsains), що дало змогу визначити вид нетуберкульозних мікобактерій.

Результати та обговорення. Отримано 1598 клінічних ізолятів мікобактерій. З них 48 (2,9%) клінічних ізолятів ідентифіковано як нетуберкульозні мікобактерії. Наведено схему первинної ідентифікації нетуберкульозних мікобактерій.

У структурі нетуберкульозних мікобактерій переважали нефотохромогенні — 77,1%. Фотохромогенні мікобактерії виділено у 16,7%, мікобактерії, що швидко росли, — у 6,3%.

Для визначення видової належності нетуберкульозних мікобактерій використали систему GenoType® MTB DR (Hain, Laifsains). Виділено такі нетуберкульозні мікобактерії: *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. avium*, *M. fortuitum*. Із 48 штамів 20 (41,7%) були чистими культурами нетуберкульозних мікобактерій, 28 (58,3%) були в мікстах (*M. tuberculosis* + НТМБ). Найчастіше з мокротиння хворих виділяли *M. avium* у мікстах з *M. tuberculosis* — 39,6%, у чистій культурі *M. avium* виділяли в 20,8% випадків. Мінімальною була питома вага *M. fortuitum* — 6,25%. При цьому помічено вірогідну різницю між поширеністю *M. avium* та інших штамів нетуберкульозних мікобактерій.

Висновки. У процесі I Національного дослідження поширення хіміорезистентного туберкульозу в Україні отримано 48 (2,9%) клінічних ізолятів мікобактерій, які були ідентифіковані як нетуберкульозні. При цьому в 20 (1,2%) випадках виявлено чисті культури нетуберкульозних мікобактерій. У 28 (1,7%) зразках виявлено їх у мікстах, котрі містили як *M. tuberculosis*, так і нетуберкульозні мікобактерії. Автори наводять схему первинної ідентифікації нетуберкульозних мікобактерій. У структурі

нетуберкульозних мікобактерій переважали нефотохромогенні мікобактерії — 77,1%. Фотохромогенні мікобактерії виділяли у 16,7% випадків, такі, що швидко ростуть, — у 6,3%. Для визначення видової належності нетуберкульозних мікобактерій використали систему GenoType® MTB DR (Hain, Laifsaing). Виділено такі нетуберкульозні мікобактерії: *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. avium*, *M. fortuitum*. Частіше з мокротиння хворих виділяли *M. avium* у мікстах з *M. tuberculosis* — 39,6%, в чистій культурі — 20,8%. Мінімальною була питома вага *M. fortuitum* — 6,25%. При цьому зауважено вірогідну різницю між поширеністю виділених штамів *M. avium* і інших нетуберкульозних мікобактерій.

Ключові слова

Нетуберкульозні мікобактерії, поширення, виділення, ідентифікація.

Останнім часом у світі збільшилася кількість випадків захворювань, зумовлених нетуберкульозними мікобактеріями (НТМБ), тобто збудниками мікобактеріозів. З одного боку, це пов'язано з поширенням імунодепресивних захворювань, насамперед СНІДу, який є причиною опортуністичних інфекцій — туберкульозу та мікобактеріозів, а з другого — з ретельним розшифруванням етіології захворювання завдяки удосконаленню діагностики, впровадженню нових технологій та розширенню спектра фено- й генотипових методів ідентифікації. Ще однією причиною є закономірність життєдіяльності власне циркулюючої мікобактеріальної популяції — хоча б мінімальне зниження рівня захворюваності на туберкульоз призводить до поступового збільшення ураження мікобактеріозами [4, 10, 12].

Збудники мікобактеріозів, тобто НТМБ, за швидкістю зростання, морфологією колоній і здатністю до пігментотворення розподіляють на 4 основні групи [13].

Мікобактерії 1, 2, 3-ї груп, що зростають повільно, за здатністю продукувати жовтий пігмент диференціюють на фотохромогенні мікобактерії (*M. kansasii*, *M. marinum*, *M. simiae*), які утворюють пігмент на світлі, на скотохромогенні мікобактерії (*M. gordonae*, *M. szulgai* і *M. scrofulaceum*), які не вимагають світла для синтезу пігменту і утворюють його в темряві під час інкубації в термостаті, та нефотохромогенні мікобактерії (*M. avium* — *complex*, *M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. ulcerans*, *M. terrae*, *M. haemophilum*, *M. genavense*), які не синтезують пігмент.

Мікобактерії 4-ї групи (*M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. smegmatis* і *M. flavescens*) — такі, що швидко зростають, на живильних середовищах починають рости на 3–7-му добу [5].

Ми вивчали наявність НТМБ у циркулюючій мікобактеріальній популяції у хворих на туберкульоз з метою дослідження поширення хіміорезистентного туберкульозу в Україні. Також з'ясували етіологічну роль НТМБ, виділення та ідентифікацію їх, деякі морфологічні й біологічні властивості.

Матеріали та методи

Дослідження проводили в акредитованій лабораторії мікробіології і біохімії ДУ «Національний інститут фтизіатрії і пульмонології імені Ф.Г. Яновського НАМН України» за кошти держбюджету.

Збирали мокротиння в стерильні поліпропіленові контейнери по 50,0 мл у формі пробірки із кришечками, що герметично закручувалися.

Мазки мокротиння досліджено на наявність кислотостійких бактерій шляхом прямої мікроскопії після забарвлення за методом Ціля — Нільсена. Для всіх зразків із позитивними результатами мікроскопії виконано весь спектр бактеріологічних досліджень з діагностики туберкульозу, згідно з алгоритмом, схваленим Наказом МОЗ України № 620 [7]. Проведено бактеріологічні дослідження з ідентифікації клінічних ізолятів за стандартними методиками, які викладено в Наказі МОЗ України № 45. Видова ідентифікація культур складалася з двох етапів: первинної та остаточної [2].

Для посіву використано середовища: рідке — бульйон Middlebrook 7H9 і щільне яєчне Левенштейна—Єнсена [1, 6, 9].

Передпосівну обробку клінічного матеріалу здійснювали за допомогою 0,5% стерильного розчину N-ацетил-L-цистеїну з 1,0% натрію гідроксиду (BBL Mycorprep NALC-NAOH) [11]. Додавали однаковий об'єм цієї суміші до зразка мокротиння. Інкубували пробірку із сумішшю за кімнатної температури протягом 15 хв. Центрифугували пробірки зі зразками за прискорення 3000 g протягом 15 хв, зливали супернатант із пробірок, потім до осаду додавали 0,8–1,0 мл стерильного фосфатного буфера (BBL Mycorprep Phosphate Buffer).

Для пригнічення росту супутньої мікрофлори в бульйоні Middlebrook 7H9 використовували суміш антибіотиків PANTA, яка складається з поліміксину В, амфотерицину В, налідиксової кислоти, триметоприму, азлоциліну. Розводили антибіотики PANTA в 15,0 мл збагачувальної добавки OADC (MGIT Growth Supplement) і додавали 0,8 мл розчину до кожної пробірки MGIT безпосередньо перед посівом матеріалу.

Пробірки поміщали в систему ВАСТЕС MGIT 960 та інкубували [6].

Паралельно здійснювали посів клінічного матеріалу на щільне середовище Левенштейна—Єнсена.

Для визначення належності виділених мікобактерій до туберкульозного комплексу застосовували ідентифікаційний імунохроматографічний тест (ID MTB MGIT) і культуральні тести щодо спроможності росту клінічних ізолятів мікобактерій на середовищі із саліциловокислим натрієм та паранітробензойною кислотою [8].

Для проведення остаточної ідентифікації мікобактерій застосовували генетичну тест-систему GenoType® MTB DR (Hain, Lainsains), що дало змогу провести видову диференціацію НТМБ, виділених із мокротиння хворих [3].

Для контролю придатності щільного яєчного та рідкого середовищ використовували лабораторні штами *M. tuberculosis H37Rv*, *M. kansasii*, *M. fortuitum*.

Результати та обговорення

У процесі I Національного дослідження поширення хіміорезистентного туберкульозу в Україні отримано 1598 клінічних ізолятів мікобактерій із 1658 зразків мокротиння, що містили кислотостійкі бактерії (КСБ+) від хворих, які взяли участь у дослідженні. Цей показник становив 96,4% загальної кількості спостережень.

Із 1658 зразків мокротиння 48 (2,9%) клінічних ізолятів ідентифіковано як НТМБ. При цьому в 20 (1,2%) виявлено чисті культури НТМБ. В 28 (1,7%) випадках виявлено мікст-культури, які містили як *M. tuberculosis*, так і НТМБ.

Під час первинної ідентифікації виявлено такі властивості мікобактерій: морфологію колоній, швидкість росту, здатність до утворення пігменту, кислотостійкість, ріст за різних температур, на середовищі із саліциловокислим натрієм або паранітробензойною кислотою. Остаточна ідентифікація складалася з культуральних, деяких біохімічних тестів: термостабільної каталази, гідролізу твіну-80 та росту на середовищі з натрієм хлориду та імунохроматографічного тесту (рис. 1).

Мета проведення — первинна ідентифікація відокремлення мікобактерії туберкульозного комплексу від НТМБ. Досліджували термін появи росту культури на щільному середовищі, спроможність утворення пігменту в термостаті чи на світлі.

У 1595 (99,8%) випадках спостерігався повільний ріст. У 3 (0,2%) випадках ріст культури спостерігався менше ніж за тиждень від посіву, що підтверджує те, що ці мікобактерії належать до 4-ї групи.

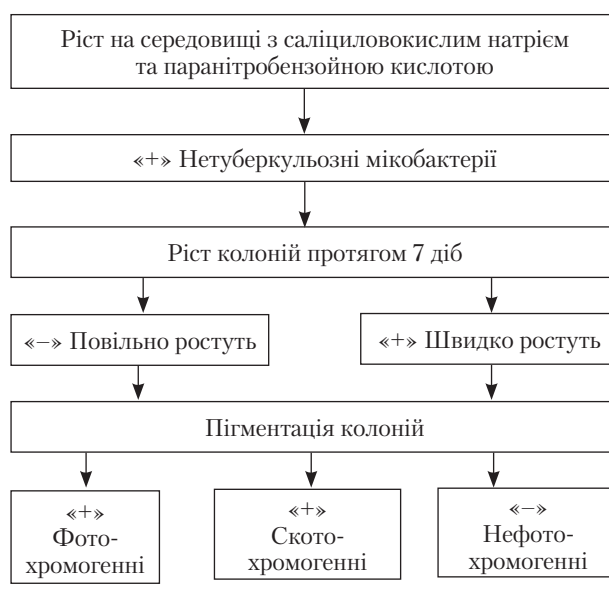


Рис. 1. Схема первинної ідентифікації НТМБ

Примітка. «+» — властиво; «-» — не властиво.

У 1264 випадках культури на щільному середовищі росли у вигляді R-форм — були сухими, шорсткуватими, товстими, з нерівними краями. У 292 випадках колонії росли у вигляді S-форми, були гладенькими та блискучими, у 42 варіантах ріст колоній був змішаним — у SR-формі.

У темряві під час інкубації посівів у термостаті помічено ріст колоній тільки з кремовим кольором, що характерно для *M. tuberculosis*, але за морфологією колонії відрізнялися. Після 24 год перебування пробірок з посівами на світлі за кімнатної температури в 16 пробірках з культурами від 8 хворих з'явилось жовте забарвлення колоній, при цьому в 6 пробірках від 3 хворих серед грубих R-колоній із кремовим кольором на середовищі одночасно росли дрібні, випуклі колонії з гладенькою блискучою поверхнею яскраво-жовтого кольору, що дало нам змогу висловити припущення про наявність мікст-культур — МБТ + фотохромогенні НТМБ (табл. 1).

З усіх культур зроблено препарати для світлової бактеріоскопії, забарвлювали за методом Ціля—Нільсена. Всі культури були кислотостійкими, тобто мікобактеріями.

Особливу увагу звернули на вивчення методом бактеріоскопії препаратів, зроблених із культур, що містили різні за морфологією та забарвленням колонії. У культурах, що утворювали пігмент на світлі, під час бактеріоскопії палички були великими, розташовувалися хрестоподібно.

Паралельно з посівами на щільне середовище Левенштейна—Єнсена проведено культуральні дослідження 1598 зразків мокротиння в рідкому середовищі в системі ВАСТЕС MGIT 960. Усі

Таблиця 1. Результати первинної ідентифікації культур

Культура мікобактерій	Швидкість росту		Наявність пігменту колоній (колір)			Ріст при 37 °С	Разом
	Повільна	Швидка	Кремовий	Жовтий (на світлі)	Кремово-жовтий (на світлі)		
Кількість штамів	1595	3	1590	3	5	1598	1598

вони дали позитивний результат. Позитивні проби MGIT досліджені за методом бактеріоскопії на наявність корд-фактора, присутність якого після культивування в рідкому середовищі свідчить про те, що культура належить до *M. tuberculosis*.

Із 1598 культур 1578 утворювали корд-фактор. 6 культур мікобактерій на щільному поживному середовищі росли у вигляді пігментованих колоній, 3 – швидко росли та 11 нефотохромогенних культур корд-фактора не утворювали. Таким чином, культури, що не утворювали корд-фактора, належать до НТМБ.

Досліджували всі культури, які не утворювали корд-фактор під час культивування в рідкому середовищі і мали поліморфізм колоній на твердому середовищі. Висловлено припущення, що ці мікобактерії можна було б зарахувати до НТМБ 3-ї групи за Раньоном. Ідентифікація таких мікобактерій складна, оскільки нефотохромогенні мікобактерії за морфологією колоній, відсутністю забарвлення колоній, швидкістю росту, оптимальною температурою росту та за бактеріоскопічною характеристикою практично не відрізняються від *M. tuberculosis*.

Зроблено припущення, що в деяких пробірках вирости мікст-культури: *M. tuberculosis complex* + НТМБ 1-ї та 3-ї груп (за Раньоном). Безсумнівно, популяція мікобактерій, яка виділяється з організму хворого, неоднорідна та в деяких випадках може містити мікст-культури *M. tuberculosis* й НТМБ, тому цілком можливо серед виділених культур очікувати росту мікстів культур *M. tuberculosis complex* та нефотохромогенних мікобактерій. Для підтвердження цього припущення ми провели дослідження за методом ідентифікації з допомогою імунохроматографічного тесту, який за своєю специфічністю дає змогу відокремити *M. tuberculosis complex* від мікобактерій нетуберкульозного комплексу. Подальші дослідження спрямовані також на ретельне вивчення всіх виділених культур, роз'єднання мікст-культур, отримання окремих нетуберкульозних культур мікобактерій та остаточну ідентифікацію виділених мікобактерій.

Для цього всі культури мікобактерій досліджували за допомогою імунохроматографічного тесту (ID MTV MGIT тест) та за методикою культуральної ідентифікації мікобактерій за

допомогою середовища Левенштейна–Єнсена з саліциловокислим натрієм (500 та 1000 мкг/мл). Ця хімічна речовина інгібує ріст *M. tuberculosis complex*, а інші мікобактерії в її присутності добре ростуть.

З культур, що вирости в кожній пробірці, готували бактеріальну суспензію в ізотонічному розчині натрію хлориду. Потім одну частину бактеріальної суспензії з кожної культури використовували для тесту ID MTV MGIT, а другу – засівали по 0,2 мл на 2 пробірки з саліциловокислим натрієм та на 2 пробірки з паранітробензойною кислотою. Посіви інкубували при 37 °С до появи росту. Посіви переглядали раз на тиждень.

В результаті ідентифікації 1598 культур за допомогою тесту ID MTV MGIT виявлено 1578 позитивних результатів, що свідчило про наявність *M. tuberculosis complex* у цих ізолятах, водночас за культуральними тестами ідентифікації 1550 культур не дали ріст на середовищі з саліциловокислим натрієм та з паранітробензойною кислотою, що свідчило про наявність *M. tuberculosis complex*. 48 культур дали ріст на цих середовищах, тобто в цих культурах були мікобактерії нетуберкульозного комплексу. Аналіз результатів ідентифікації підтверджує припущення, що серед виділених культур були як чисті НТМБ, так і мікстові туберкульозних і НТМБ. Результати попередньої ідентифікації культур за допомогою тестів диференціальної діагностики наведено в табл. 2.

Для біохімічної ідентифікації мікобактерій застосовано такі тести: наявність термостабільної каталази 68 °С, гідроліз твіну-80, ріст на середовищі з тибоном (табл. 3). Результати ключових біохімічних тестів застосовані для диференціації як мікобактерій туберкульозного і нетуберкульозного комплексу, так і груп всередині НТМБ.

Таким чином, за результатами первинної ідентифікації, з урахуванням швидкості росту, морфології колоній, здатності утворювати пігмент, кислотостійкості, характеру розташування паличок у бактеріоскопічних препаратах, росту на середовищах із саліциловокислим натрієм, з паранітробензойною кислотою та за результатами тесту ID MTV MGIT культури, виділені від 1598 хворих, ідентифіковано як рід мікобактерій, з них у 1550 хворих виділено *M. tuberculosis*,

Таблиця 2. Результати попередньої ідентифікації виділених культур за допомогою тестів диференціальної діагностики

Показник	Тест						Разом
	Корд-фактор		ID MTB MGIT тест		Ріст на середовищі з саліциловокислим натрієм		
	Корд «+»	Корд «-»	ID MTB MGIT «+»	ID MTB MGIT «-»	Ріст «+»	Ріст «-»	
Кількість штамів мікобактерій	1578	20	1578	20	1550	48	1598

Примітка. «+» — позитивний результат; «-» — негативний результат. Так само в табл. 3.

у 48 — НТМБ, які склали 3,0% загальної кількості виділених мікобактерій, що виростили на живильних середовищах. Виділення кожної з цих культур було підтверджено двічі (табл. 4).

Таким чином, у структурі НТМБ переважали нефотохромогенні мікобактерії (77,1%) з високою вірогідністю ($p < 0,01$). Фотохромогенні мікобактерії виділяли у 16,7%, мікобактерії, що швидко ростуть, — у 6,3% ($p < 0,01$). Подальші дослідження спрямовано на ідентифікацію НТМБ.

Для остаточної ідентифікації мікобактерій застосували генетичну тест-систему GenoTypeMTB DR (Hain, Laifsaing), яка дала змогу визначити види НТМБ, виділені з мокротиння хворих [3].

Досліджено 48 штамів мікобактерій, що дали ріст на середовищі з саліциловокислим натрієм та за результатами попередньої ідентифікації були зараховані до групи НТМБ (табл. 5).

Отже, виділено такі НТМБ: *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. avium*, *M. fortuitum*. З 48 штамів 20 (41,7%) були чистими культурами НТМБ, 28 (58,3%) — мікстовими (*M. tuberculosis* + НТМБ). Найчастіше з мокротиння хворих виділяли *M. avium* у мікстових культурах з *M. tuberculosis* — 39,6%, у чистій культурі *M. avium* виділяли в 20,8% випадків

Таблиця 3. Тести біохімічної ідентифікації НТМБ

Тест	Група нетуберкульозних мікобактерій	
	Фотохромогенні	Нефотохромогенні
Термостабільна каталаза 68 °С	+	+
Гідроліз твіну-80	+	-
Ріст на середовищі з тибоном	-	+

Таблиця 4. Результати визначення груп (за Раньоном) нетуберкульозних мікобактерій після ідентифікації ($M \pm m$)

Група	Кількість виділених НТМБ		
	Абс.	Загальна кількість культур, %	Кількість культур НТМБ, %
Фотохромогенні	8	0,5 ± 0,05	16,7 ± 1,8*
Нефотохромогенні	37	2,3 ± 0,2	77,1 ± 16,2*
Мікобактерії, що швидко ростуть	3	0,2 ± 0,02	6,3 ± 0,6*
Разом культур НТМБ	48	3,0 ± 0,6	100

Примітка. * $p < 0,01$ за порівняння між собою показників виділення НТМБ різних груп.

Таблиця 5. Результати видової молекулярно-генетичної ідентифікації нетуберкульозних мікобактерій ($M \pm m$)

Вид	Кількість (n = 48)		
	Абс.	Загальна кількість мікобактерій, %	Загальна кількість НТМБ, %
<i>M. kansasii</i>	3	0,2 ± 0,1	6,25 ± 3,5*
Мікст <i>M. tuberculosis</i> + <i>M. kansasii</i>	5	0,3 ± 0,1	10,4 ± 4,4*
<i>M. xenopi</i>	4	0,25 ± 0,1	8,3 ± 4,0*
Мікст <i>M. tuberculosis</i> + <i>M. xenopi</i>	4	0,25 ± 0,1	8,3 ± 4,0*
<i>M. avium</i>	10	0,6 ± 0,2	20,8 ± 5,9*
Мікст <i>M. tuberculosis</i> + <i>M. avium</i>	19	1,2 ± 0,3	39,6 ± 7,1*
<i>M. fortuitum</i>	3	0,2 ± 0,1	6,25 ± 3,5*
Мікст <i>M. tuberculosis</i> + <i>M. fortuitum</i>	0	0	0
Чисті культури НТМБ	20	1,25 ± 0,3	41,7 ± 7,1
Мікст-культури МБТ + НТМБ	28	1,8 ± 0,3	58,3 ± 7,1

Примітка. * $p < 0,01$ за порівняння між собою показників виділення *M. avium* та інших видів НТМБ.



Рис. 2. Схема введення пацієнтів до загальнонаціонального дослідження за поширенням хіміорезистентного туберкульозу

($p < 0,01$). Мінімальною була питома вага *M. fortuitum* — 6,25%. При цьому виявлено вірогідну різницю між поширенням штамів *M. avium* та інших штамів НТМБ.

Таким чином, з 1598 виділених культур мікобактерій 48 були ідентифіковані як НТМБ (рис. 2).

Висновки

У процесі I Національного дослідження поширення хіміорезистентного туберкульозу в Україні отримано 1598 (96,4%) клінічних ізолятів мікобактерій із 1658 зразків мокротиння, що містили кислотостійкі бактерії.

48 (2,9%) клінічних ізолятів ідентифіковано як НТМБ. При цьому в 20 (1,2%) випадках виявлено чисті культури НТМБ, у 28 (1,7%) — мікст-культури, які містили як *M. tuberculosis*, так і НТМБ. Наведено схему первинної ідентифікації нетуберкульозних мікобактерій.

У структурі НТМБ переважали нефотохромогенні мікобактерії (3-тя група за Раньоном) — 77,1%. Фотохромогенні мікобактерії виділено у 16,7% (1-ша група за Раньоном), мікобактерії, що швидко ростуть, — у 6,3% (4-та група за Раньоном).

Для визначення видової належності НТМБ застосовували генетичну тест-систему GenoType® MTB DR (Hain, Laifsains). Виділено такі НТМБ: *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. avium*, *M. fortuitum*. Із 48 штамів 20 (41,7%) були чистими культурами НТМБ, 28 (58,3%) — мікстовими (*M. tuberculosis* + НТМБ). Отже, найчастіше з мокротиння хворих виділялися *M. avium* у мікстових культурах з *M. tuberculosis* — 39,6%, у чистій культурі *M. avium* — у 20,8% випадків. Мінімальною була питома вага *M. fortuitum* — 6,25%. При цьому виявлено вірогідну різницю між поширеністю *M. avium* та інших штамів НТМБ.

Дослідження проведено за кошти державного бюджету в рамках теми НДР А 19.06 «Розробити технологію гено-фенотипічної діагностики легеневих уражень, які спричинені нетуберкульозними мікобактеріями», № держреєстрації 0118U007365 (01.19—12.21).

Конфлікту інтересів немає.

Участь авторів: збір, аналіз, інтерпретація даних — А.І. Барбова; дизайн дослідження, написання, редагування статті — О.А. Журило; статистичне опрацювання, аналіз — П.С. Трофімова; пошук літератури, збір даних — С.В. Миронченко.

Дослідження пройшло розгляд Комітетом етики при плануванні теми НДР закладом. У цьому дослідженні форми згоди пацієнтів не потрібні. Робота проводилась або з мокротинням від хворих, або з чистими культурами мікобактерій. Експериментальні дослідження на тваринах не передбачались.

Список літератури

- Барбова А.І., Журило О.А., Жемкова Ж.А. та ін. Застосування автоматизованої системи MGIT для діагностики туберкульозу легень і визначення медикаментозної стійкості мікобактерій: метод. реком.— К., 2007.— 24 с.
- Журило О.А., Барбова А.І., Глушкевич Т.Г. та ін. Стандарти бактеріологічної діагностики туберкульозу в лабораторіях протитуберкульозних закладів України.— К., 2012.—190 с.
- Лабинская А.С., Костюкова Н.Н. Оппортунистические инфекции: возбудители и этиологическая диагностика // Руководство по медицинской микробиологии. Книга III, том 1.— М.: БИНОМ, 2013.— 752 с.
- Литвинов В.И., Макарова М.В., Краснова М.А. Нетуберкулезные микобактерии.— М.: МНПЦБТ, 2008.— 256 с.
- Майрова А.А. Идентификация нетуберкулезных микобактерий и выбор оптимальной комбинации методов для их видовой дифференциации: автореф. дис. ...канд. биол. наук.—М., 2007.—26 с.
- Наказ МОЗ України. Інструкція з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції. 06.02.2002 р., № 45.
- Наказ МОЗ України. Уніфікований клінічний протокол первинної, вторинної (спеціалізованої) і третинної (високоспеціалізованої) медичної допомоги дорослим «Туберкульоз». 04.09.2014 р., № 620.
- Фещенко Ю.І., Журило О.А., Барбова А.І. та ін. Диференціація мікобактерій комплексу *Mycobacterium tuberculosis*: методичні рекомендації.— К., 2006.— 19 с.
- Фещенко Ю.І., Журило О.А., Барбова А.І. та ін. Мікробіологічні основи проведення моніторингу за медикаментозною стійкістю штамів *M. tuberculosis* в Україні: метод. реком.— К., 2004.— 24 с.
- Euzebi J. List of Bacterial Names with Standing in Nomenclature: a folder available on the Internet // Int. J. Syst. Bacteriol.— 1997.— Vol. 47 (2).— P. 590—592. doi: 10.1099/00207713-47-2-590.
- Feyzioğlu B. Comparison of the performance of TK system with LJ and MGIT methods in the diagnosis of tuberculosis // Int. J. Clin. Exp. Med.— 2014.— Vol. 7, N 4.— P. 1084—1088.

12. Katoch V. Infections due to nontuberculous mycobacteria (NTM) // Indian J. Med. Res.— 2004.— Vol. 120.— P. 290–304.
13. Marras T.K., Daley C.L. Epidemiology of human pulmonary

infection with nontuberculous mycobacteria // Clin. Chest. Med.— 2002.— Vol. 23.— P. 553–567. doi: 10.1016/S0272-5231(02)00019-9.

А.І. Барбова, О.А. Журило, П.С. Трофимова, С.В. Миронченко
 ГУ «Национальный институт фтизиатрии и пульмонологии имени Ф.Г. Яновского НАМН Украины», Киев

Опыт выделения, индикации и идентификации нетуберкулезных микобактерий, полученный в ходе I Национального исследования по изучению распространения химиорезистентного туберкулеза в Украине

Цель работы — изучение нетуберкулезных микобактерий в циркулирующей микобактериальной популяции больных туберкулезом легких, которые принимали участие в исследовании распространения химиорезистентного туберкулеза в Украине, выяснение этиологической роли нетуберкулезных микобактерий, их выделение и идентификация, исследование некоторых морфологических и биологических свойств.

Материалы и методы. Мазки мокроты пациентов исследованы на наличие кислотоустойчивых бактерий путем прямой микроскопии после окраски по методу Циля—Нильсена. Для всех образцов с позитивными результатами микроскопии выполнен весь спектр бактериологических исследований по диагностике туберкулеза, согласно алгоритму, утвержденному приказом МЗ Украины № 620. Проведены бактериологические исследования по идентификации клинических изолятов по стандартным методикам, изложенным в приказе МЗ Украины № 45. Видовая идентификация культур состояла из двух этапов: первичного и окончательного.

Для посева использованы такие среды: жидкая — бульон Middlebrook 7H9 и плотная яичная Левенштейна—Енсена. Предпосевную обработку клинического материала осуществляли с помощью 0,5% стерильного раствора N-ацетил-L-цистеина с 1,0% натрия гидроксида (BBL Mucorprep NALC-NAOH). Пробирки помещали в систему ВАСТЕС MGIT 960 и инкубировали. Посев осуществляли параллельно на плотную среду Левенштейна—Енсена.

Для идентификации штаммов использовали ID MTB MGIT тест и определяли способность роста клинических изолятов микобактерий на среде с салициловокислым натрием и паранитробензойной кислотой (для установления принадлежности микобактерий к туберкулезному комплексу).

Для окончательной идентификации микобактерий использовали систему GenoType® MTB DR (Hain, Laifsains), которая позволила определить вид нетуберкулезных микобактерий.

Результаты и обсуждение. Получено 1598 клинических изолятов микобактерий. Из них 48 (2,9%) клинических изолятов идентифицированы как нетуберкулезные микобактерии. Приведена схема первичной идентификации нетуберкулезных микобактерий.

В структуре нетуберкулезных микобактерий преобладали нефотохромогенные — 77,1%. Фотохромогенные микобактерии выделялись у 16,7% случаев, быстрорастущие — у 6,3%.

Для определения видовой принадлежности нетуберкулезных микобактерий использовали систему GenoType® MTB DR (Hain, Laifsains). Были выделены следующие нетуберкулезные микобактерии: *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. avium*, *M. fortuitum*. Из 48 штаммов 20 (41,7%) были чистыми культурами нетуберкулезных микобактерий, 28 (58,3%) — в микстах (*M. tuberculosis* + НТМБ). Чаще из мокроты больных выделяли *M. avium* в микстах с *M. tuberculosis* — 39,6%, в чистой культуре *M. avium* — в 20,8% случаев. Минимальным был удельный вес *M. fortuitum* — 6,25%. При этом была обнаружена достоверная разница между распространенностью *M. avium* и других нетуберкулезных микобактерий.

Выводы. В ходе I Национального исследования по изучению распространения химиорезистентного туберкулеза в Украине получено 48 (2,9%) штаммов микобактерий, которые идентифицированы как нетуберкулезные. При этом в 20 (1,2%) случаях обнаружены чистые культуры нетуберкулезных микобактерий. В 28 (1,7%) случаях выявлены в микстах, содержащих как *M. tuberculosis*, так и нетуберкулезные микобактерии. Авторы приводят схему первичной идентификации нетуберкулезных микобактерий. В структуре нетуберкулезных микобактерий

преобладали нефотохромогенные – 77,1%. Фотохромогенные микобактерии выделялись у 16,7% случаев, быстрорастущие – у 6,3%. Для определения видовой принадлежности нетуберкулезных микобактерий использовали систему GenoType® MTB DR (Hain, Laifsains). Были выделены следующие нетуберкулезные микобактерии: *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. avium*, *M. fortuitum*. Чаще из мокроты больных выделяли *M. avium* в микстах с *M. tuberculosis* – 39,6%, в чистой культуре – в 20,8%. Минимальным был удельный вес *M. fortuitum* – 6,25%. При этом была обнаружена достоверная разница между распространенностью выделенных штаммов *M. avium* и других штаммов нетуберкулезных микобактерий.

Ключевые слова: нетуберкулезные микобактерии, распространение, выделение, идентификация.

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

SI «National Institute of Phthisiology and Pulmonology named after F.G. Yanovsky of NAMS of Ukraine», Kyiv, Ukraine

Experience of selection, indication and identification of non-tuberculous mycobacteria, got during I National research on study of distribution of drugresistant of tuberculosis in Ukraine

Objective – a study of presence of non-tuberculosis mycobacterium in a circulatory mycobacterial population among patients by a white plague in Ukraine, finding out of etiologic role of non-tuberculosis mycobacterium, their selection and identification, study of some morphological and biological properties.

Materials and methods. The strokes of sputum were investigational in the presence of acid proof bacteria by a direct microscopy after coloring on the method of Ziehl-Neelsen. For all standards with the positive results of microscopy all spectrum of bacteriologic examinations was executed on diagnostics of tuberculosis, according to the algorithm ratified by the order of MH of Ukraine N 620. Bacteriological studies were undertaken on identification of clinical isolates on standard methodologies that is expounded in the order of MH of Ukraine N 45. Specific identification of the got cultures consisted of two stages: primary and final.

In-process for sowing environments were used: liquid – broth of Middlebrook 7H9 and dense egg Lowenstein-Jensen medium. Pressed treatment of clinical material was carried out by means of a 0,5% sterile solution of N-acetyl L-of cystein from 1.0% gidroxid of natrium (BBL Mycoprep NALC-NAOH). Test tubes placed in the system BACTEC MGIT 960 and did incubation. Sowing was carried out in parallel on the dense environment of Lowenstein-Jensen medium. For identification of the distinguished strains ID MTB MGIT test used and determination of ability of height of clinical isolates of mycobacterium on an environment with a salicylic sour natrium and p-nitrodracylic acid with the purpose of determination of belonging of distinguished mycobacterium to the tuberculosis complex.

For realization of final identification of mycobacterium used the system GenoType® MTB DR (Hain, Laifsains), that allowed to define the type of non-tuberculosis mycobacterium.

Results and discussion. During I-st of National research on the study of distribution of drug resistant of tuberculosis 1598 clinical isolates of mycobacterium were got in Ukraine. The analysis of results of bacteriologic examination educed, that 48 (2.9%) clinical isolates had been identified as non-tuberculosis mycobacterium. A chart over of primary authentication of non-tuberculosis mycobacterium is brought.

Nonphotochromogen mycobacterium prevailed in the structure of distinguished non-tuberculosis mycobacterium – 77.1%. Photochromogen mycobacterium distinguished at level – 16.7%, fast-growing mycobacterium was made the least – 6.3%.

For determination of specific belonging of non-tuberculosis mycobacterium used the system GenoType® MTB DR (Hain, Laifsains). Next non-tuberculosis mycobacterium were distinguished: *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. avium*, *M. fortuitum*. From 48 distinguished strains 20 strains were the clean cultures of non-tuberculosis mycobacterium (41.7%), 28 strains (58.3%) were in mix (*M. tuberculosis* + non-tuberculosis mycobacterium). The results of researches showed that more often from the sputum of patients *M. avium* was distinguished in mix with *M. tuberculosis* – 39.6%, in the clean culture of *M. avium* was distinguished in 20.8% cases. Minimum was specific gravity of selection of *M. fortuitum* – 6.25%. Here found out reliable difference was between prevalence of the distinguished strains of *M. avium* and other strains of non-tuberculosis mycobacterium.

Conclusions. During I-st of National research on study of distribution of drug resistant of tuberculosis 48 strains of mycobacterium (2.9 %) that were identified as non-tuberculosis mycobacterium were got in Ukraine. Thus in 20 cases (1.2 %) were found out the clean cultures of non-tuberculosis mycobacterium. In 28 (1.7 %) cases were discovered in mix, that contained as *M. tuberculosis*, so non-tuberculosis mycobacterium. Authors are bringing a chart over of primary identification of non-tuberculosis mycobacterium. Nonphotochromogen mycobacterium prevailed in the structure of non-tuberculosis mycobacterium – 77.1 %. Photochromogen mycobacterium distinguished at level – 16.7 %, fast-growing mycobacterium was made the least – 6.3 %. For determination of specific belonging of non-tuberculosis mycobacterium used the system GenoType® MTB DR (Hain, Laifsains). Next non-tuberculosis mycobacterium were distinguished: *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. avium*, *M. fortuitum*. The results of researches showed that more often from the patient's sputum *M. avium* was distinguished. In mix with *M. tuberculosis* – 39.6 %, in the clean culture of *M. avium* was distinguished in 20.8 % cases. Minimum was specific gravity of selection of *M. fortuitum* – 6.25 %. Here found out a reliable difference was between prevalence of the distinguished strains of *M. avium* and other strains of non-tuberculosis mycobacterium.

Key words: non-tuberculosis mycobacterium, distribution, selection, identification.

Контактна інформація:

Барбова Анна Іванівна, к. мед. н., ст. наук. співр. лабораторії мікробіології та біохімії туберкульозу
03038, м. Київ, вул. М. Амосова, 10
Тел. (044) 275-54-30
E-mail: anna99987@gmail.com

Стаття надійшла до редакції 21 травня 2019 р.