

Современные методы идентификации нетуберкулёзных микобактерий

Г. Н. ГЕНАТУЛЛИНА, *А. Л. ЯСЕНЯВСКАЯ, М. А. САМОТРУЕВА

Астраханский государственный медицинский университет, Астрахань, Россия

Резюме

В последнее время отмечается активный рост заболеваемости нетуберкулёжными микобактериозами, что определено не только совершенствованием методов обнаружения нетуберкулёзных микобактерий, но и с достаточно высокой осведомлённостью медицинского персонала. Выбор наиболее точного метода идентификации является крайне важным в определении тактики лечения пациентов, так как у различных по темпам роста микобактерий имеются выраженные различия в устойчивости к антимикробным препаратам. Появление молекулярно-генетических методов исследования позволяет идентифицировать и типировать большинство известных в настоящее время нетуберкулёзных микобактерий, а также определять их лекарственную чувствительность. Распространённость микобактериозов, представляющих на сегодняшний день серьёзную проблему как для врачей-клиницистов, так и для специалистов лабораторной службы, требует разработки новой стратегии их микробиологической диагностики.

Ключевые слова: нетуберкулёзные микобактерии; микобактериозы; идентификация; молекулярно-генетические методы

Для цитирования: Генатуллина Г.Н., Ясенявская А.Л., Самотруева М.А. Современные методы идентификации нетуберкулёзных микобактерий. *Антибиотики и химиотер.* 2024; 69 (9–10): 86–90. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-9-10-86-90>. EDN: MYZIBA.

Modern Methods of Identification of Non-Tuberculous Mycobacteria

GUZEL N. GENATULLINA, *ANNA L. YASENYAVSKAYA, MARINA A. SAMOTRUEVA

Astrakhan State Medical University, Astrakhan, Russia

Abstract

Recently, an active increase in the incidence of non-tuberculous mycobacteriosis has been registered, which is determined not only by the improvement of methods for detecting non-tuberculous mycobacteria, but also by a fairly high level of awareness of medical personnel. The choice of the most accurate identification method is extremely important in determining the treatment tactics, since mycobacteria with different growth rates have pronounced differences in resistance to antimicrobial drugs. The emergence of molecular genetic research methods makes it possible to identify and type most of the currently known non-tuberculous mycobacteria, as well as determine their drug sensitivity. The prevalence of mycobacteriosis, which today represents a serious problem for both clinicians and laboratory specialists, requires the development of a new strategy for its microbiological diagnostics.

Keywords: non-tuberculous mycobacteria; mycobacteriosis; identification; molecular genetic methods

For citation: Genatullina G. N., Yasyenyavskaya A. L., Samotrueva M. A. Modern methods of identification of non-tuberculous mycobacteria. *Antibiotiki i Khimioter = Antibiotics and Chemotherapy.* 2024; 69 (9–10): 86–90. doi: <https://doi.org/10.37489/0235-2990-2024-69-9-10-86-90>. EDN: MYZIBA.

В настоящее время активно растёт число пациентов, страдающих от инфекций, вызываемых нетуберкулёжными микобактериями, что обусловлено увеличением доли иммунокомпрометированных пациентов и наличием у них различных коморбидных состояний, а также значительным

усовершенствованием и активным внедрением в практику методов идентификации микобактерий. Термин «нетуберкулёзные микобактерии» (НТМБ) объединяет в себе сапрофитные и потенциально патогенные микобактерии, представленные грамположительными кислотоустойчивыми неспоро-

*Адрес для корреспонденции:
E-mail: yasen_9@mail.ru



*Correspondence to:
E-mail: yasen_9@mail.ru



EDN: MYZIBA

образующими бактериям рода *Mycobacterium*, постоянно обитающие в окружающей среде и насчитывающие более 200 видов [1, 2]. В настоящее время известно более 150 видов НТМБ, многие из которых могут вызывать микобактериозы у человека. Заболевания, вызываемые разными видами НТМБ, характеризует сходная с туберкулёзом клинико-рентгенологическая картина поражения лёгких, однако схема химиотерапии микобактериозов отличается от таковой при туберкулёзе вследствие естественной резистентности НТМБ к противотуберкулёзным препаратам [3].

Впервые информация об атипичных микобактериях, впоследствии получивших название нетуберкулёзные, появилась ориентировочно в начале XX в. Интерес к данной группе микроорганизмов среди микробиологов был ограничен, с одной стороны, из-за трудностей с их выделением и идентификацией, с другой стороны, из-за отсутствия данных об их клиническом значении на фоне высокого роста заболеваемости туберкулёзом. На сегодняшний день достаточный объём данных о патогенетическом действии НТМБ определяет актуальность проблемы своевременной и качественной диагностики микобактериозов [2].

При использовании только классических микробиологических методов возникает ряд проблем, связанных с выделением и идентификацией НТМБ. Так, выявление и идентификация возбудителя до вида в рамках микробиологического исследования длительна и осуществляется с помощью набора малодоступных и недостаточно специфичных биохимических тестов, что в сочетании с высокой естественной резистентностью возбудителя приводит к развитию хронических деструктивных поражений лёгких. Отсутствие простых чувствительных методов микробиологической диагностики ограничивает возможности эпидемиологического мониторинга микобактериозов, что, в очередной раз, подчёркивает острую необходимость использования современных эффективных молекулярно-генетических методов исследования для выявления, видовой идентификации и типирования микроорганизмов [4].

На сегодняшний день идентификация НТМБ, проводимая в лабораториях различных стран, вышла на качественно новый уровень в связи с появлением новейших высокоспецифичных и высокоточных методов диагностики, среди которых важное место занимают молекулярно-генетические методы [2, 5].

Одними из наиболее распространённых среди лабораторных исследований являются методы линейного анализа с использованием фрагментов ДНК, меченных тем или иным образом, предназначенные для проведения амплификации ДНК и последующей гибридизацией на нейлоновых мем-

бранах, так называемых ДНК-стрипах с маркерными олигонуклеотидными зондами. Данные ДНК-зонды позволяют определять комплементарные ему нуклеотидные последовательности [2, 6]. Одна из первых диагностических тест-систем с применением клонированных нуклеотидных последовательностей в качестве молекулярных зондов, позволяющая выявлять микобактерии в клиническом материале, разработана И.Г. Мальковым. Видовую принадлежность синтезированного фрагмента устанавливали, применяя олигонуклеотидные зонды, избирательно гибридизующиеся с ДНК *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. paratuberculosis* или *M. fortuitum*. В 1992 г. опубликованы результаты по идентификации, выделению, клонированию и характеристике фрагментов ДНК *M. tuberculosis*, которые могут быть использованы в качестве зондов для идентификации *M. tuberculosis* [6]. Метод линейного анализа с использованием фрагментов ДНК позволяет идентифицировать часто встречающиеся и клинически значимые виды НТМБ, исследуя культуру, выросшую как на плотной, так и жидкой питательных средах, максимальное время получения результата — от нескольких часов до 2 дней. В более специализированных лабораториях используется молекулярно-генетическая идентификация микобактерий по гену *16S* рРНК, который обладает высокой консервативностью: отличия в последовательности даже на 1% (и более) обычно позволяют говорить о видовом различии образцов [2, 7, 8].

Данные, полученные в ходе секвенирования последовательности *16S* рРНК для каждого вида микобактерий, были депонированы в общедоступных базах данных, чтобы помочь как в идентификации известных НТМБ, так и в регистрации новых видов. Наряду с этим для идентификации видов используется анализ двух гипервариабельных последовательностей в гене *16S* рРНК (так называемые области А и В). Секвенирование области А обычно достаточно для видовой идентификации большинства НТМБ, в то время как секвенирование области В используется, когда описывается новый вид или вид, который невозможно отличить только на основании области А. Например, при идентификации *M. chelonae* и *M. abscessus* было определено, что данные представители микобактерий отличаются только 4 п. н., что затрудняет их дифференциацию данным методом. Некоторые виды с недавней дивергенцией могут содержать весьма сходные последовательности гена *16S* рРНК (например, разница между *M. szulgai* и *M. malmoeense* составляет два нуклеотида) [9].

Наряду с вышеописанными методиками в решении проблемы видовой дифференциации микобактерий нашло применение мультилокусное секвенирование, позволяющее различать штаммы

одного микроорганизма. Данный анализ заключается в секвенировании определённого набора генов [10]. Данный метод позволяет установить у каждого штамма специфический «аллельный профиль» или сиквенс-тип по выбранным локусам. Наряду с преимуществом данного метода по идентификации бактерии до подвида, следует отметить, достаточно сложное внедрение в рутинную лабораторную диагностику из-за трудоёмкости и высокой стоимости [2].

В последнее время активно находит отклик использование методов, связанных с анализом полиморфизма длины рестрикционных фрагментов (PRA method) последовательности гена, кодирующего белок теплового шока 65 кДа (Hsp65). Данная методика хоть и является относительно быстрой и позволяет определять многие виды НТМБ, которые не идентифицируются фенотипическими методами, однако, также как и MLST, не является актуальной в рутинной практике медицинских лабораторий [2].

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, представленной в виде метода матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации — времяпролётной масс-спектрометрии, позволяющей ионизировать биологические макромолекулы (ДНК, белки, пептиды, олигонуклеотиды, липополисахариды и др.) в присутствии особого вещества — матрицы — под воздействием лазера.

Принцип данного метода основан на многократном воздействии импульсов лазера на бактериальную клетку, предварительно покрытую матрицей, представляющей собой вещество (α -циано-4-гидроксикоричная кислота), которое способно понижать деструктивные характеристики лазерного излучения и повышать последующую ионизацию анализируемого вещества. Полученные в ходе воздействия ионизированные белки движутся к детектору, который находится в анализаторе. Разделение полученных ионов во времяпролётном анализаторе осуществляется за счёт разной скорости перемещения и обратно пропорциональной массе иона.

Данные относительно пути перемещения иона от источника ионизации до детектора, а также времени, затраченного на перемещение, позволяют произвести вычисление скорости движения иона и отношение массы к заряду для каждого иона. Использование чистой культуры микроорганизма или его экстрактов в качестве исследуемого образца позволяет получить спектр характеристик, специфичный для узких таксоно-

мических групп — рода, вида или даже штамма. На основе характеристик полученного спектра при помощи программных биоинформатических инструментов осуществляется идентификация исследуемого микроорганизма в чистой культуре либо в смешанных культурах.

Процесс идентификации основан на сравнении полученных масс-спектров с референсными спектрами, присутствующими в базах данных. При достаточном количестве совпадений делается вывод о таксономической принадлежности исследуемых микроорганизмов к конкретной таксономической группе. Результаты идентификации микроорганизмов с применением настоящих практических рекомендаций не требуют дополнительного подтверждения классическими биохимическими тестами [11].

Важным преимуществом данного метода является то, что он обеспечивает высокую производительность, чувствительность и специфичность, а также скорость анализа, требующего меньше одной минуты. Однако следует отметить и тот факт, что качество диагностики зависит от наличия определённых баз данных, что, в свою очередь, оказывает влияние на стоимость идентификации. Также на идентификацию могут влиять условия культивирования микроорганизмов, методы подготовки проб и ряд других факторов [2].

Определение видовой идентификации играет особое значение при выборе клинической тактики, позволяя оценить не только НТМБ как этиологический фактор в развитии патологического процесса, но и сделать адекватный выбор антимикробной химиотерапии, в том числе с учётом резистентности к антимикробным препаратам. Несмотря на то, что НТМБ принадлежат к роду *Mycobacterium*, их отличительной особенностью от микобактерий туберкулёзного комплекса является чувствительность к антимикробным препаратам. Большинство видов НТМБ имеют природную устойчивость как к противотуберкулёзным препаратам, так и к препаратам других групп.

На данный момент существует несколько методов определения у микобактерий антибиотикорезистентности, большая часть из которых основана на культивировании микобактерий на плотных или жидких питательных средах с добавлением антимикробных препаратов разных концентраций с применением прямого и непрямого посева. При первом варианте используют две питательные среды для посева, и клинический материал, подготовленный соответствующим образом, засевают на среды как содержащие определённые концентрации антибактериальных препаратов, так и без содержания антибактериальных препаратов. При непрямом методе на питательные среды, которые содержат и не содержат

определённые концентрации лекарственных препаратов, засеваются суспензия чистой культуры микобактерий, выращенной на искусственных средах. В международной практике также отмечается использование и других методов определения чувствительности к антимикробным препаратам: метод пропорций на среде Миддлбука 7H10 или Левенштейна–Йенсена; метод коэффициента резистентности; метод абсолютных концентраций на плотной яичной среде Левенштейна–Йенсена; радиометрический метод Bactec R460 и др. [2, 12]. Одним из наиболее перспективных на сегодняшний день методов является метод, основанный на двойных серийных микроразведениях препаратов различных групп для определения минимальных подавляющих концентраций с использованием тест-систем для медленнорастущих и быстрорастущих НТМБ [2].

Заключение

Рост пациентов, страдающих от инфекций, вызываемых нетуберкулёзными микобактериями и отсутствие простых чувствительных методов микробиологической диагностики ограничивают

возможности эпидемиологического мониторинга микобактериозов. Данный факт подчёркивает необходимость использования современных эффективных молекулярно-генетических методов исследования для выявления, видовой идентификации и типирования микобактерий. Распространённость микобактериозов, представляющих на сегодняшний день серьёзную проблему как для врачей-клиницистов, так и для специалистов лабораторной службы, требует разработки новой стратегии их микробиологической диагностики, позволяющей быстро детектировать лекарственную устойчивость к ним, выявлять НТМБ и назначать адекватный режим химиотерапии повышая эффективность лечения и предотвращая распространение лекарственно-устойчивых штаммов микобактерий.

Дополнительная информация

Финансирование. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства здравоохранения РФ в части проведения НИР по теме «Разработка тест-систем для скрининговой ПЦР-диагностики, мониторинга течения микобактериозов и видовой ПЦР-идентификации микобактерий».

Литература/References

1. Daley C. L., Griffith D. E. Pulmonary non-tuberculous mycobacterial infections. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.* 2010; 14 (6): 665–671.
2. Лямин А. В., Жестков А. В., Исмагуллин Д. Д., Ковалев А. М. Лабораторная диагностика микобактериозов. *Вестник современной клинической медицины.* 2017; 10 (1): 29–35. doi: [https://doi.org/10.20969/VSKM.2017.10\(1\).29-35](https://doi.org/10.20969/VSKM.2017.10(1).29-35). [Lyamin A. V., Zhestkov A. V., Ismatullin D. D., Kovalev A. M. Laboratornaya diagnostika mikobakteriozov. *Vestnik Sovremennoj Klinicheskoy Meditsiny.* 2017; 10 (1): 29–35. doi: [https://doi.org/10.20969/VSKM.2017.10\(1\).29-35](https://doi.org/10.20969/VSKM.2017.10(1).29-35). (in Russian)]
3. Макарова М. В., Гунтупова Л. Д. Нетуберкулёзные микобактерии. БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. 2020; 20 (2): 97–102. doi: <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-97-102> [Makarova M. V., Guntupova L. D. Netuberkuleznye mikobakterii. *BIOPreparaty. Profilaktika, Diagnostika, Lechenie.* 2020; 20(2): 97–102. doi: <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2020-20-2-97-102> (in Russian)]
4. Бузова П. О. Современные методы диагностики микобактериозов. FORCIPE. 2019; Приложение, 595–596. [Burova, P. O. Sovremennyye metody diagnostiki mikobakteriozov. *FORCIPE.* 2019; Prilozhenie, 595–596. (in Russian)]
5. Лабинская А. С., Костюкова Н. Н. Оппортунистические инфекции: возбудители и этиологическая диагностика. М.: Изд-во «Бином» 2013; 752. [Labinskaya A. S., Kostyukova N. N. *Opportunistic infections: возбудители i etiologicheskaya diagnostika.* Moscow: Izd-vo «Binom» 2013; 752. (in Russian)]
6. Зубаирова П. Ю., Исламов И. М. Детекции бактериальных инфекций с помощью ДНК-зондов. Известия Дагестанского государственного педагогического университета. Естественные и точные науки. 2016; 10 (2): 34–40 [Zubairova P. Yu., Islamov I. M. Detekcii bakterial'nyh infekcij s pomoshch'yu DNK-zondov. *Izvestiya Dagestanskogo Gosudarstvennogo Pedagogicheskogo Universiteta. Estestvennye i Tochnye Nauki.* 2016; 10 (2): 34–40 (in Russian)]
7. McNabb A., Eisler D., Adie K., Amos M., Rodrigues M., Stephens G., Black W. A., Isaac-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. doi: [10.1128/JCM.42.7.3000-3011.2004](https://doi.org/10.1128/JCM.42.7.3000-3011.2004).
8. Tortoli E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990's. *J Clin Microbiol. Rev.* 2003; 2: 319–354. doi: [10.1128/CMR.16.2.319-354.2003](https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.319-354.2003).
9. Hall L., Doerr K. A., Wohlfel 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; 41: 1447–1453. doi: [10.1128/JCM.41.4.1447-1453.2003](https://doi.org/10.1128/JCM.41.4.1447-1453.2003).
10. Воронина О. Л., Кунда М. С., Лунин В. Г., Гинцбург А. Л. Мультилокусное секвенирование — информативный подход молекулярной экологии. *Вестник Московского университета. Серия 16. Биология.* 2010; 4: 7–10 [Voronina O. L., Kunda M. S., Lunin V. G., Gincburg A. L. *Mul'tilokusnoe sekvenirovanie — informativnyj podhod molekulyarnoj ekologii.* *Vestnik Moskovskogo Universiteta. Seriya 16. Biologiya.* 2010; 4: 7–10. (in Russian)]
11. Чеботарь И. В., Поликарпова С. В., Бочарова Ю. А., Маянский Н. А. Использование времяпролетной масс-спектрометрии с матрично-активированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-TOF MS) для идентификации бактериальных и грибковых возбудителей III–IV групп патогенности. *Лабораторная служба.* 2018; 7 (2): 78–86. doi: <https://doi.org/10.17116/labs20187278-86> [Chebotar' I. V., Polikarpova S. V., Bocharova Yu. A., Mayanskij N. A. *Ispol'zovanie vremyaproletoj mass-spektrometrii s matrichno-aktivirovannoju lazernoju desorbciej/ionizaciej (MALDI-TOF MS) dlya identifikacii bakterial'nyh i gribkovyh vozbuditelej III–IV grupp patogennosti.* *Laboratornaya Sluzhba.* 2018; 7 (2): 78–86. doi: <https://doi.org/10.17116/labs20187278-86> (in Russian)]
12. Huit G. A., Daley C. L. Nontuberculous mycobacteria. *Clin Chest Med.* 2015; 36 (1): xi–xii. doi: [10.1016/j.ccm.2014.11.006](https://doi.org/10.1016/j.ccm.2014.11.006).

Поступила / Received 25.09.2024

Принята в печать / Accepted 08.10.2024

Информация об авторах

Генатуллина Гузель Наилевна — к. б. н., заместитель руководителя Научно-исследовательского центра, доцент кафедры фармакогнозии, фармацевтической технологии и биотехнологии, ФГБОУ ВО Астраханский ГМУ Минздрава России, Астрахань, Россия. ORCID ID: 0000-0001-5417-4477

Ясенявская Анна Леонидовна — к. м. н., доцент, руководитель Научно-исследовательского центра, доцент кафедры фармакогнозии, фармацевтической технологии и биотехнологии, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Астрахань, Россия. ORCID ID: 0000-0003-2998-2864

Самотруева Марина Александровна — д. м. н., профессор, заведующая кафедрой фармакогнозии, фармацевтической технологии и биотехнологии, ФГБОУ ВО «Астраханский государственный медицинский университет» Минздрава России, Астрахань, Россия. ORCID ID: 0000-0001-5336-4455

About the authors

Guzel N. Genatullina — Ph. D. in Biology, Deputy Head of the Research Center, Associate Professor of the Department of Pharmacognosy, Pharmaceutical Technology, and Biotechnology, Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Astrakhan, Russia. ORCID ID: 0000-0001-5417-4477

Anna L. Yasyavskaya — Ph. D. in Medicine, Associate Professor, Head of the Research Center, Associate Professor of the Department of Pharmacognosy, Pharmaceutical Technology, and Biotechnology, Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Astrakhan, Russia. ORCID ID: 0000-0003-2998-2864

Marina A. Samotrueva — D. Sc. in Medicine, Professor, Head of the Department of Pharmacognosy, Pharmaceutical Technology, and Biotechnology, Astrakhan State Medical University of the Ministry of Health of the Russian Federation, Astrakhan, Russia. ORCID ID: 0000-0001-5336-4455