ФГБОУ ВО «Самарский государственный
медицинский университет» Минздрава России
Научно-образовательный профессиональный центр
генетических и лабораторных технологий

Исматуллин Д.Д., Лямин А.В.

НЕТУБЕРКУЛЁЗНЫЕ МИКОБАКТЕРИИ У ПАЦИЕНТОВ С МУКОВИСЦИДОЗОМ: КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ И ОСОБЕННОСТИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научно образовательный профессиональный центр генетических и лабораторных технологий

Д.Д. Исматуллин, А.В. Лямин

НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫЕ МИКОБАКТЕРИИ У ПАЦИЕНТОВ С МУКОВИСЦИДОЗОМ: КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ И ОСОБЕННОСТИ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ

Самара 2023

УДК 616.233-0.72.1: 615.03
ББК 54.12: 52.81
И87

Рецензенты:
Е.И. Кондратьева – руководитель научно-клинического отдела муковисцидоза, заведующая кафедрой генетики болезней дыхательной системы Института высшего и дополнительного профессионального образования ФГБНУ "МГНЦ", доктор медицинских наук, профессор.
М.Ю. Чернуха – заведующий лабораторией молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекций ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России, доктор медицинских наук

Авторы:
Исматуллин Данир Дамирович – заведующий лабораторией культуромных и протеомных исследований в микробиологии Научно-образовательного профессионального центра генетических и лабораторных технологий, врач-бактериолог, кандидат медицинских наук ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России;

Лямин Артем Викторович – директор Научно-образовательного профессионального центра генетических и лабораторных технологий, врач-бактериолог, доктор медицинских наук, доцент ФГБОУ ВО СамГМУ Минздрава России;

Нетуберкулезные микобактерии у пациентов с муковисцидозом: клиническое значение и особенности микробиологической диагностики: монография / Д.Д. Исматуллин, А.В. Лямин. Самара: Издательство ИП Алексеев Андрей Павлович, 2023. 104 с.

ISBN 978-5-6045179-7-0

Монография посвящена общей характеристике и современной классификации нетуберкулезных микобактерий, в ней отражены современные данные об их эпидемиологических особенностях и распространенности среди пациентов, отражено клиническое значение и этиологическая роль при муковисцидозе. Отдельное внимание уделено описанию результатов собственных исследований в области оценки видового разнообразия нетуберкулезных микобактерий у пациентов с муковисцидозом в РФ. Оценена возможность идентификации нетуберкулезных микобактерий с использованием MALDI-ToF масс-спектрометрии представителей, выращенных на различных питательных средах. Изложенные в монографии сведения представляют научный и практический интерес для врачей-бактериологов, микробиологов, пульмонологов, инфекционистов, фтизиатров, а также могут быть полезны преподавателям медицинских вузов и студентам

УДК 616.233-0.72.1: 615.03
ББК 54.12: 52.81

© Исматуллин Д.Д., Лямин А.В.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение		**5**
Глава 1	Общая характеристика нетуберкулезных микобактерий, их распространенность, клиническое значение и этиологическая роль при муковисцидозе	**7**
Глава 2	Особенности культивирования и идентификации нетуберкулезных микобактерий у пациентов с муковисцидозом	**15**
Глава 3	MALDI-ToF масс-спектрометрия в идентификации нетуберкулезных микобактерий и ее дополнительные возможности	**20**
Глава 4	Анализ распространенности *Mycobacterium abscessus* complex у пациентов с муковисцидозом в российской федерации, выделенных из клинического материала в период с 2017 по 2020 годы	**22**
Глава 5	Распространенность *Mycobacterium abscessus* complex, выделенных из клинического материала в период с 2017 по 2020 годы	**23**
Глава 6	Видовое разнообразие микроорганизмов, выделенных из клинического материала у пациентов с муковисцидозом совместно с представителями *Mycobacterium abscessus* complex	**29**
Глава 7	Характеристика нетуберкулезных микобактерий от пациентов, обследованных при подозрении на туберкулез легких	**33**
Глава 8	Определение оптимальных сроков культивирования необходимых для выделения представителей *Mycobacterium abscessus* complex изолированных от пациентов с муковисцидозом	**35**
Глава 9	Оценка культуральных свойств представителей *Mycobacterium abscessus* complex выделенных на плотных питательных средах	**42**
Глава 10	Влияние органической соли железа на продуктивность питательных сред для выделения *Mycobacterium abscessus* complex	**45**
Глава 11	Оценка возможностей идентификации представителей *Mycobacterium abscessus* complex с использованием различных питательных сред	**48**

Глава 12	Сравнение масс-спектров, полученных при идентификации MALDI-ToF масс-спектрометрией представителей *Mycobacterium abscessus* complex, выращенных на различных питательных средах	**50**
Глава 13	Сравнительный анализ характеристик масс-спектров представителей *Mycobacterium abscessus* complex, выращенных на различных питательных средах	**55**
Глава 14	Возможности использования MALDI-ToF масс-спектрометрии для проведения типирования представителей *Mycobacterium abscessus* complex и сравнение с результатами секвенирования ДНК	**58**
Глава 15	Анализ масс-спектров штаммов представителей *Mycobacterium abscessus* complex, выделенных от пациентов с муковисцидозом при хроническом инфицировании	**61**
Глава 16	Анализ значений составного индекса корреляции у пациентов с повторными высевами *Mycobacterium abscessus* complex	**62**
Глава 17	Оценка диагностической значимости показателей составного индекса корреляции для двух последовательно выделенных штаммов *Mycobacterium abscessus* complex при прогнозировании риска развития микобактериоза у пациентов с муковисцидозом	**69**
Заключение		**72**
Список сокращений		**81**
Список литературы		**82**
Приложение		**96**

ВВЕДЕНИЕ

Нетуберкулезные микобактерии (НТМ) представляют собой распространенную в окружающей среде группу микроорганизмов (МО), которая зачастую может стать причиной хронического инфицирования у пациентов с сопутствующими структурными изменениями дыхательных путей, такими как, например, при муковисцидозе (МВ). Поражение легких, вызванное НТМ, может представлять серьезную проблему, определяющую течение и исход основного заболевания у пациентов с МВ, с точки зрения развития инфекционных осложнений [52, 72, 115].

В настоящее время в мире во многих профильных центрах, занимающихся диагностикой и лечением пациентов с МВ, специалисты сталкиваются с самой распространенной группой быстрорастущих НТМ, встречающейся у пациентов с МВ, – представителями *Mycobacterium abscessus* complex (MABSc). В связи с морфологическими особенностями MABSc, обеспечивающими их устойчивость ко многим дезинфектантам, существует определенный риск распространения данной группы МО среди госпитализированных и амбулаторных пациентов, а экологические особенности этой группы микроорганизмов играют особую роль в проведении эпидемиологических исследований [77, 157].

Инфицирование МО часто связано с возрастом пациентов с МВ: по данным литературы, чем старше пациент, тем больше вероятность выделения у него НТМ из клинического материала. У 10-летних детей НТМ встречаются в 10% случаев, а у взрослых пациентов старше 40 лет – в более чем 30% случаев. У более 50% пациентов, у которых МВ был диагностирован во взрослом возрасте, НТМ колонизируют дыхательные пути. Наблюдается тенденция преобладания того или иного вида НТМ в зависимости от возраста пациента с МВ: *Mycobacterium avium* complex чаще выделяется от пациентов старше 25 лет, в то время как инфицирование бактериями MABSc характерно почти для всех возрастных групп [8, 41, 100].

Также стоит отметить, что согласно данным некоторых исследований, весомое количество случаев инфицирования микобактериями приходится на пациентов, которые находятся в возрасте 11-15 лет. У таких пациентов заболевание протекает тяжелее, а смертность выше, чем у инфицированных представителей более старшей возрастной группы, что связано с прогрессирующими темпами снижения функциональности легких [8].

За последние 40 лет было зафиксировано увеличение частоты распространения MABSc, выделенных из мокроты пациентов с МВ. Кроме того, относительная частота обнаружения бактерий MABSc в клиническом материале, собранном от пациентов с МВ, за последнее время значительно возросла как в США, так и в Европе, что скорее говорит о реальном изменении уровня инфицированности НТМ [85, 106].

НТМ могут вызвать прогрессирующее воспалительное поражение легких – заболевание, которое называется микобактериозом и характеризуется наличием специфических микробиологических, клинических и рентгенологических

признаков. В свою очередь, в последнее время было доказано, что НТМ могут присутствовать в легких пациента с МВ временно, нерегулярно или постоянно, не вызывая при этом развитие микобактериоза и представляя собой бессимптомную инфекцию, обнаружение и диагностика которой в этом случае сопряжена со значительными трудностями. В связи с этим совершенствование и оптимизация микробиологической диагностики инфекционных осложнений, вызванных НТМ у пациентов с МВ, играет важную роль в постановке диагноза микобактериоза, что ведет к определенной тактике антимикробной химиотерапии этой инфекции, а также к возможному уменьшению вероятности ее распространения [45, 57].

ГЛАВА 1. Общая характеристика нетуберкулезных микобактерий, их распространенность, клиническое значение и этиологическая роль при муковисцидозе

Микобактерии являются грамположительными, неподвижными, не образующими спор, строго аэробными бактериями палочковидной формы. Некоторые представители рода склонны к определенному полиморфизму с образованием структур нитевидной формы с элементами ветвления, схожими по внешнему виду с мицелием грибов. Большое количество миколовых кислот, свободных липидов и фосфолипидов, входящих в состав клеточной стенки, обеспечивают кислотоустойчивость микобактерий. Бактерии рода *Mycobacterium* относятся к семейству *Mycobacteriaceae* порядка *Actinomycetales* [1]. В связи с особенностями инфекционного процесса, развитием клинических проявлений и эпидемиологическим разнообразием, микобактерии разделены на группы: микобактерии туберкулезного комплекса (МТС) – возбудители туберкулеза, *M. leprae* – лепры, *M. ulcerans* – язвы Брули, нетуберкулезные (атипичные) микобактерии (НТМ) – возбудители микобактериозов. Среди них самое широкое внимание уделяется МТС, однако в связи с увеличением случаев инфекций, связанных с НТМ, данная группа МО в последнее время вызывает повышенный интерес [139].

В соответствии с особенностями пигментообразования и скоростью роста в 1959 году была предложена классификация, согласно которой НТМ разделены на 4 группы: фотохромогенные, скотохромогенные, нефотохромогенные, быстрорастущие микобактерии. Быстрорастущие микобактерии (БРМ) обычно характеризуются ростом на питательных средах в течение 7 суток культивирования. Среди всех видов НТМ к быстрорастущим относят около 70 видов из более 190 известных [152]. Большая часть микобактерий описана еще в конце 20 века, однако в последние годы этот список пополняют новые виды, так в 2000-е годы список НТМ был пополнен *M. litorale, M. bacteremicum, M. iranicum, M. bourgelatii, M. celeriflavum, M. crocinum, M. franklinii, M. monacense* и др. [109, 110, 111, 112, 113, 114].

В настоящее время согласно одной из классификаций, БРМ разделены на 6 основных групп, которые представлены в таблице 1. Основными критериями разделения являлись генетическое сходство и особенности пигментации НТМ.

Таблица 1 – Классификация быстрорастущих нетуберкулезных микобактерий

Группа	**Виды НТМ**
M. fortuitum group	*M. fortuitum, M. peregrinum, M. senegalense, M. setense, M. septicum, M. porcinum, M. houstonense, M. boenickei, M. brisbanense, M. neworleansense*
M.chelonae/M.abscessus group	*M. chelonae, M. immunogenum, M. abscessus subsp. abscessus* (ранее известный как *M. abscessus*), *M. abscessus subsp. bolletii* (ранее известный как *M. massiliense* и *M. bolletii*), *M. salmoniphilum, M. franklinii*
M.mucogenicum group	*M. mucogenicum, M. aubagnense, M. phocaicum*
M.smegmatis group	*M. smegmatis* (ранее известный как *M. smegmatis sensustricto*), *M. goodii*
Пигментированные виды БРМ	*M. neoaurum, M. canariasense, M. cosmeticum, M. monacense, M. bacteremicum*
M.mageritense/M.wolinskyi group	*M. mageritense, M. wolinskyi*

Однако в последнее время данная классификация во многом пересматривается и дополняется на основании результатов, полученных с использованием технологий полногеномного секвениривания.

Сравнительно недавно была предложена классификация, согласно которой род *Mycobacterium* необходимо разделить на роды – *Mycolicibacter*, *Mycolicibacillus* и *Mycobacteroides* и на 5 клад – *Abscessus-Chelonae*, *Fortuitum-Vaccae*, *Terrae*, *Triviale*, *Tuberculosis-Simiae*. Типовым видом клады *Abscessus-Chelonae,* который дает рост при культивировании на питательной среде меньше 7 суток, носит название *Mycobacteroides abscessu*s. Основанием для этого явилось обнаружение определенных молекулярных маркеров, из которых следует разделение на группы родственных таксонов [75]. Предложенные новые данные систематики в настоящее время не пользуется широким применением в медицинской микробиологии при классификации микобактерий. И в нашей работе мы использовали классическую классификацию НТМ.

НТМ принято считать сапрофитными бактериями, естественным резервуаром которых считается окружающая среда, при этом наиболее часто они встречаются в воде и почве. Благодаря структурным особенностям НТМ способны к выживанию и сохранению витальных свойств в жестких условиях дефицита питательных веществ. Описаны работы, в которых были представлены случаи сохранения НТМ в хлорированной воде центрального водоснабжения [50]. Данные свойства обеспечивают длительное сохранение и значительное преимущество в конкурентной борьбе с другими бактериями, которые находятся в местах их совместного обитания, что позволяет микобактериям занимать определенную экологическую нишу. НТМ длительно выживают в антропогенной

среде, особенно в объектах водоснабжения в лечебных учреждениях, в жилых домах людей (раковины, насадки для душа) и плавательных бассейнах [5, 143]. При этом наиболее вероятным фактором передачи при легочных инфекциях, вызванных НТМ, считаются насадки для душа, при использовании которых увеличивается риск образования аэрозоля, потенциально содержащего патогенные НТМ. В 2009 году было проведено исследование, демонстрирующее, что в насадках для душа было обнаружено намного больше НТМ, чем в обычной проточной воде. Не исключено также наличие НТМ на раковинах, в сливах для душа, кранах, диспенсерах для воды [123].

За счет наличия гидрофобной и богатой липидами клеточной стенки и способности к образованию биопленок НТМ имеют возможность к длительному сохранению в окружающей среде. Данный факт необходимо учитывать при применении различных органических и неорганических дезинфицирующих веществ, антимикробных химиопрепаратов, которые используются в качестве средств для борьбы с МО в медицинских учреждениях [108].

Предполагается, что передача НТМ от пациента к пациенту сомнительна и инфицирование, скорее всего, происходит после контакта с окружающей средой. В настоящее время активно ведутся исследования, направленные на установление вероятных источников инфицирования пациентов в стационаре, и в последнее время появляются публикации, в которых описываются случаи возможной передачи НТМ между людьми. В научных работах приводится информация о возможной передаче от пациента к пациенту представителей MABSc. На данный момент эти связи чаще всего устанавливаются путем использования технологий полногеномного секвенирования [159].

Распространенность инфекций бронхолегочной системы, вызванных НТМ, значительно увеличилась за последние тридцать лет. Основными причинами увеличения заболеваемости инфекциями, вызванными НТМ, в большей степени обусловлено повышением качества диагностики и идентификации микобактерий благодаря внедрению в лабораториях новых современных и высокоточных методов. По этой причине данные о заболеваемости намного шире представлены в развивающихся или развитых странах мира. При этом отмечено преобладание конкретных видов НТМ в различных регионах, что может быть связано с определенными географическими и климатическими условиями в данных государствах [97, 137, 159].

Увеличение распространенности заболеваний, вызванных НТМ, указано в исследовании, проведенном канадскими учеными в Онтарио: с 1998 по 2002 и с 2006 по 2010 годы заболеваемость при поражении легких увеличилась с 29,3 до 41,3 на 100 тыс. населения, в материале от пациентов преимущественно были выделены представители *M. avium* complex, *M. gordonae, M. fortuitum, M. abscessus* [132]. В США, согласно одной из публикаций, заболеваемость в нескольких штатах колеблется от 1,4 до 13,9 на 100 тыс. населения, с высокими показателями на Гавайях до 44,0 на 100 тыс. населения [64].

В Англии заболеваемость выросла с 0,9 на 100 тыс. населения в 1995 до 2,9 в 2006 году [16, 82]. В Германии с 2009 по 2014 заболеваемость увеличилась с 2,3

до 3,3 на 100 тыс. населения [127]. В Нидерландах в исследовании, охватывающем период с 2012 по 2019 годы, заболеваемость составила от 2,3 до 5,9 пациентов на 100 тыс. населения [148]. В Дании, согласно данным Международной справочной микобактериологии (IRLM), с 1991 по 2015 год было проведено 524 119 посевов, среди которых НТМ были выделены от 3642 человек, а годовые показатели заболеваемости составили 2,14 на 100 тыс. населения [117]. В Сербии с 2010 по 2015 год микобактерии были выделены от 565 пациентов, годовые показатели увеличились с 0,9 до 1,6 тыс. населения. Наиболее часто выделялись *M. xenopi* (28,6%) и БРМ (27,8%), из которых в 73% случаев выделены *M. abscessus* [131]. В Греции по данным литературы в настоящее время отсутствует информация о показателях заболеваемости. Судить о ней можно лишь по крупным локальным исследованиям в этой стране. Такое исследование было проведено в Афинах в одном из местных стационаров, где с 2007 по 2013 год НТМ были обнаружены в клиническом материале от 120 пациентов среди 138 951 стационарных и 492 845 амбулаторных пациентов с преобладанием *M. avium* (13%) и *M. gordonae* (14%), таким образом, заболеваемость составила 18,9 и 8,8 на 100 тыс. среди обследованных пациентов [149].

В Китае с 2008 по 2012 годы доля пациентов, у которых были выделены, НТМ увеличилась с 3,0 % до 8,5 %, из которых 14,9% составили *M. chelonae*/*abscessus* [141]. В другом исследовании китайских ученых, проведенном в одном из стационаров Гуанчжоу с 2013 по 2016 годы выявлено 607 пациентов, у которых были выделены НТМ, чаще остальных были выделены представители *M. avium* complex и *M. abscessus* complex [65]. В Южной Корее результаты одного из исследований показали, что с 2003 по 2016 НТМ были выявлены у 46 194 пациентов, при этом их распространенность составила 33,3 на 100 тыс. населения [128]. Заболеваемость в Уругвае увеличилась с 0,33 до 1,57 на 100 тыс. населения с 2006 по 2018 год [145].

Рост заболеваемости НТМ, возможно, связан с увеличением количества пациентов с иммуносупрессией различного генеза, подъемом заболеваемости ВИЧ-инфекцией, туберкулезом, увеличением количества пациентов с первичными иммунодефицитами, неинфекционными состояниями, обусловленными цитостатической терапией у пациентов после трансплантации органов, лечения ревматоидного артрита, аспергиллеза легких, которые сопровождаются назначением системной глюкокортикостероидной терапии, что также повышает риски развития микобактериоза легких [116].

Известен довольно широкий спектр факторов риска, способствующих инфицированию НТМ, условно их можно разделить на 3 группы. Первая группа — пациенты с анатомическими отклонениями различной этиологии, без генетических изменений. Например, пациенты с пневмокониозами, эмфиземой, бронхоэктазами. Вторая группа включает в себя пациентов с различными аномалиями бронхолегочной системы неясной этиологии. И, наконец, третья группа, в которую входят пациенты с генетической и иммунной патологией, с высокими рисками развития инфекционного процесса в легких различной этиологии (МВ, первичная цилиарная дискинезия, дефицит альфа-1-

антитрипсина, альвеолярный протеиноз, иммунодефициты различной этиологии) [9].

В целом при поражении бронхолегочной системы НТМ преимущественно развиваются две формы клинических проявлений: фиброзно-полостная форма верхней доли и узловая бронхоэктатическая форма. Первая характеризуется рубцовыми и полостными изменениями чаще в верхних долях легкого, схожими с поражениями при туберкулезе с повреждением дыхательных путей, которые довольно быстро приводят к деструкции легких и дыхательной недостаточности [86, 99]. Вторая форма проявляется в узловато-бронхоэктатической форме, характеризующейся расширением и образованием рубцов и инфильтратов в средней доле правого легкого и язычке левого легкого, склонностью к замедленному прогрессированию [86]. Клиническая симптоматика при микобактериозах в которую входит кашель, одышка, кровохарканье, повышенная продукция мокроты, лихорадка, потеря аппетита и потеря веса во многом неспецифична и не отличается от проявлений таковой при развитии туберкулеза и других респираторных инфекций [153].

Группой пациентов, среди которых довольно высоко распространены НТМ являются пациенты с МВ. Данная патология является одной из самых широко распространенных генетических заболеваний, характеризующихся аутосомно-рецессивным типом наследования. В первую очередь при МВ происходят изменения в бронхолегочной системе из-за нарушений мукоцилиарного клиренса, в органах желудочно-кишечного тракта, гепатобилиарной системе и, вдобавок, у мужчин возникают нарушения в репродуктивной системе [7].

По данным «Регистра больных муковисцидозом Российской Федерации. 2019 год» в нашей стране зарегистрировано 3169 пациентов с МВ. Частота заболеваемости составляет 2,5 на 100 тыс. населения [33]. В связи со структурными и патофизиологическими особенностями течение основного заболевания сопровождается колонизацией дыхательных путей различными МО и возможным развитием в них хронического инфицирования.

С момента рождения верхние и нижние дыхательные пути пациентов с МВ колонизируются в первую очередь грамположительной флорой, в дальнейшем в процессе взросления дыхательные пути колонизируются грамотрицательной флорой, среди которой доминируют неферментирующие грамотрицательные бактерии (НФГОБ) и энтеробактериями, а также не стоит исключать возможное инфицирование дрожжевыми и мицелиальными грибами [51].

Длительное время показатели средней продолжительности жизни пациентов с МВ составляли низкие значения, однако в последние десятилетия во всем мире, в том числе и в России, ситуация меняется в лучшую сторону и наблюдается определенная тенденция к увеличению среднего возраста – по некоторым данным до 40 лет [33]. Это связано со многими причинами. Значительный вклад вносит оптимизация диагностики и выявления среди населения пациентов с МВ, благодаря введению неонатального скрининга, накоплению определенного опыта ведения пациентов с МВ, улучшению качества диагностики в первую очередь бактериальных инфекций, как наиболее распространенной причины осложнений

и, безусловно, появлению новых препаратов, применяемых для лечения у пациентов с МВ, особенно для таргетной терапии [35].

Доминирующими МО, выявляемыми при инфекциях дыхательных путей у пациентов с МВ, являются *Staphylococcus aureus*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa*, BCC, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans* [51]. В связи с тем, что произошло увеличение среднего возраста пациентов с МВ, риски развития микобактериозаов различной этиологии значительно возросли [70]. Среди около 70 потенциально значимых НТМ, имеющих возможное клиническое значение и принимающих участие в патологическом процессе при развитии микобактериозов, у пациентов с МВ лидирующее положение занимают медленнорастущие микобактерии *Mycobacterium avium* complex (*M. intracellulare* и четыре подвида *M. avium*) и быстрорастущие MABSc, значительно реже встречаются виды *M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. gordonae* [90]. При этом заболеваемость микобактериозами значительно варьирует в зависимости от географического положения.

Так, в одном из исследований проведенном в США, из 16 153 пациентов с МВ у 3211 (20%) были выделены НТМ в период с 2010 по 2014 год, из них MAC (61%) и MABSc (39%) [40]. Во Франции среди обследованных 1582 больных с МВ были выявлены НТМ у 104 (6,6%) пациентов, из них представителей MABSc (48%) и MAC (22%) [97]. В Великобритании в период с 2010 по 2015 год было обследовано 5333 пациента с МВ с увеличением заболеваемости с 1,3% до 5,4%, при этом в 2014 и 2015 годах лидирующие позиции занимали представители MABSc (51,45% и 35,3%) и MAC (11,4% и 8,3%) [63]. В целом по всему миру среди центров, в которых наблюдаются пациенты с МВ, имеются данные от том, что значения распространенности варьируют от 5% до 20% [96, 100, 118, 119, 120, 130].

В Российской Федерации в настоящее время отсутствуют официальные данные о распространенности НТМ среди пациентов. Однако в отечественной литературе за последние 20 лет все чаще стали появляться публикации, в которых приводятся данные по распространенности заболеваний, вызванных НТМ [14, 17, 36, 38]. Так, согласно Регистру больных муковисцидозом Российской Федерации за 2019 год, доля инфицированных НТМ пациентов с МВ составила всего 1,0 %.

Таким образом, исходя из того, что во многих зарубежных странах у пациентов с МВ наблюдается тенденция к увеличению распространенности НТМ, которая во многих случаях превышает 1%, на наш взгляд, данные, которые представлены в РФ, требуют дополнений, и необходимо проведение исследований, направленных на уточнение заболеваемости и инфицированности данным видом НТМ среди пациентов. При этом стоит отметить, что лидирующие позиции среди инфицированных НТМ пациентов с МВ занимают представители MABSc [18].

M. abscessus впервые была изолирована в 1952 году М. Мур и Дж. Б. Фрерихс из биологического материала при развитии абсцесса коленного сустава, после чего микроорганизм приобрел свое название [95]. На тот момент патоген считали обладателем низкой вирулентности благодаря способности вызывать

исключительно подкожные абсцессы и другие кожные инфекции различной локализации [107]. Длительный период роль и возможное участие этого МО при развитии нарушений функций бронхолегочной системы оставались малоизученными. И только после нескольких десятилетий стали появляться научные работы, в которых были описаны случаи легочных инфекций, связанных с данным патогеном [73, 144].

В процессе изучения таксономическое положение *M. abscessus* довольно часто пересматривалось. Долгое время *M. abscessus* считался идентичным еще одному представителю быстрорастущих НТМ возбудителя инфекций у рыб и земноводных *M. chelonae,* их считали одним видом «*M.chelonei*» или «*M.chelonae*». После этого, в 1972 году, несколько ученых в попытках изменений классификации микобактерий организовали неофициальную группу – «Международную рабочую группу по таксономии микобактерий» (IWGMT), одними из основных целей которой являлись систематизация и более подробное изучение микобактерий. В результате их работы *M. abscessus* получил статус подвида *M. chelonei subsp. abscessus* [43, 101, 102].

По прошествии двадцати лет, в 1992 году, С. Кусуноки и Т. Эзаки используя метод ДНК-гибридизации, обнаружили, что сопоставимость ДНК *M. chelonae* subsp. *chelonae* и *M. chelonae* subsp. *abscessus* составляет всего 35%, и соответственно по этой причине *M. chelonei* subsp. *abscessus* должен быть повышен до статуса вида *M. abscessus* [84]. Через несколько лет, в 2004 году, группа ученых Швейцарии и Франции не смогла точно идентифицировать вид МО, выделенный от пациента с пневмонией. Используя анализ генов *rpoB,* они сделали заключение, что этот изолят является новым видом, схожим с *M. abscessus,* впоследствии получившим название *Mycobacterium massiliense* [42].

В 2006 году, используя секвенирование гена *rpoB* 59 культур БРМ, было обнаружено, что около 15% выделенных изолятов являются новыми видами, одним из которых был *Mycobacterium bolletii*. Он имел 100% сходство гена 16S и 95,6% сходства последовательности гена *rpoB* с *M. abscessus* [138]. Согласно последним данным, по той причине, что все вышеперечисленные виды *M. massiliense, M. bolletii* и *M. abscessus* имеют родство, они были определены как подвиды, объединенные в комплекс MABSc: *M. abscessus* subsp. *abscessus, M. abscessus* subsp. *bolletii, M. abscessus* subsp. *massiliense* [154].

В последующем таксономия MABSc снова подвергалась некоторым сомнениям из-за генетического сходства его представителей, однако ввиду фенотипических особенностей, клинических проявлений и результатов проведения полногеномного секвенирования все же был достигнут консенсус и три предложенных подвида были признаны полностью соответствующими критериям, которые позволили им считаться подвидами [105].

Несмотря на то, что инфекции дыхательных путей являются наиболее частыми проявлениями, вызванными MABSc, также известны случаи возникновения патологических изменений другой локализации. Описаны случаи инфекции кожи и мягких тканей после травматических повреждений или проведения хирургических манипуляций, которые проявляются в форме

абсцессов [89]. Указаны случаи остеомиелитов, мастоидитов, эндокардитов, эндофтальмитов, кератитов, катетер-ассоциированных инфекций, инфекций центральной нервной системы и диссеминированных инфекций, вызванных MABSc [47, 62, 83, 98, 104, 136]. Эти сведения позволяют считать представителей MABSc важными патогенами, которые могут стать причиной инфекций различной локализации.

Таким образом, НТМ являются сложной и довольно разнообразной группой МО, которые могут стать причиной инфекции различной локализации. Повсеместный рост распространенности микобактериозов в различных странах говорит о том, что данной группе бактерий со временем будет уделяться больше внимания со стороны врачей различных специальностей. МВ является одним из факторов развития микобактериозов, однако в РФ на данный момент отсутствуют схемы выявления и идентификации НТМ. Данные о распространенности НТМ у пациентов с МВ, отраженные в Регистре с 2015 по 2019 год, свидетельствует о том, что их распространенность варьирует от 0,7% до 1%. Если сравнивать эти показатели с зарубежными данными возникает закономерный вопрос: действительно ли в России такая низкая распространенность НТМ среди пациентов с МВ или все же эти данные требуют корректировки и дополнений на основании микробиологических исследований [29, 33].

ГЛАВА 2. Особенности культивирования и идентификации нетуберкулезных микобактерий у пациентов с муковисцидозом

Одной из возможных причин увеличения показателей заболеваемости и инфицированности НТМ пациентов является определение оптимальных параметров их выделения и последующей идентификации. Представители MABSc, как уже было указано, являются одними из самых частых возбудителей микобактериозов среди БРМ. MABSc, как и все НТМ, являются строгими аэробами, которые при посеве на искусственные питательные среды дают видимый рост в течение 7 суток после инокуляции при оптимальной температуре от 28 до 37 °С. В качестве сред для культивирования используются традиционные плотные питательные среды Левенштейна-Йенсена и Финна-II, а для ускоренного выделения представителей MABSc в настоящее время также используются жидкие питательные среды Миддлбрука [150].

Диагностика бактериальных инфекций при МВ в первую очередь связана с выделением и идентификацией наиболее патогенных и связанных с возникновением инфекционных осложнений МО. Основными клинически значимыми МО у пациентов с МВ принято считать *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Achromobacter xylosoxidans*, *Stenotrophomonas maltophilia*, BCC, *Haemophilus influenzae*. Из-за наличия перечисленных бактерий в исследуемом материале довольно часто процессы выделения и идентификации НТМ значительно усложняются. Эти МО благодаря своей высокой метаболической активности могут подавлять рост НТМ на питательных средах при культивировании [160].

Для уменьшения их количества и возможного влияния на рост НТМ используют методы деконтаминации клинического материала различными ингибиторами активности посторонней микрофлоры. К стандартным методам разжижения и деконтаминации мокроты, рекомендованным Приказом МЗ РФ «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации» № 109 относят: обработку 10% раствором трехзамещенного фосфорнокислого натрия, 3% серной кислотой, 4% раствором едкого натра. Также возможно использование N-ацетил-L-цистеина, гидроксида натрия или 5% щавелевой кислоты, которая имеет высокую эффективность в случае высокой обсемененности мокроты НФГОБ [28]. Дополнительно не исключено влияние на НТМ контаминирующей микрофлоры, представленной кислотоустойчивыми аэробными актиномицетами, среди которых весомую роль играют представители родов *Nocardia* spp., *Gordonia* spp., *Rhodococcus* spp., *Streptomyces* spp. Помимо того, что перечисленные патогены могут подавлять рост НТМ при культивировании на питательных средах, стоит учитывать их потенциальное участие в инфекционном процессе, в том числе и у пациентов с МВ [6].

При использовании средств деконтаминации для устранения «балластной» флоры не стоит исключать влияние агрессивных химических веществ на ростовые свойства НТМ. По этой причине в последнее время в научной литературе описываются случаи выделения НТМ и, в частности, представителей MABSc на

средах для селективного выделения представителей *Burkholderia cepacia* complex (*BCC*). Так как МО из этого комплекса имеют важное значение при выделении от пациентов с МВ, коммерческий рынок предоставляет достаточно широкий ассортимент питательных сред для их культивирования. В него входят: селективный агар BCSA (BioMérieux, Франция), среда BD Cepacia и среда BD OFPBL (окисление/ферментация-полимиксин-бацитрацин-лактоза) Oxoid Ltd. (Basingstoke, Великобритания) [27]. При этом увеличение вероятности обнаружения представителей MABS происходит при увеличении сроков культивирования более 7 суток [56, 68]. Однако в случае наличия в исследуемом материале представителей BCC нужно учитывать возможное подавление ими роста представителей MABSc.

Помимо этого, использование селективных сред описаны работы, в которых для выделения НТМ используются универсальные хромогенные среды, изначально предназначенные для выделения конкретных родов МО. Исключительной особенностью таких сред является наличие в составе хромогенных субстратов, которые при расщеплении бактериями придают им определенный цвет, что значительно упрощает микробиологическую диагностику. Существуют хромогенные среды для выделения *E.coli*, бактерий родов *Pseudomonas, Vibrio, Listeria, Staphylococcus*, а также различные универсальные хромогенные среды. Тот факт, что на таких средах возможно культивирование НТМ, является довольно интересным с точки зрения их использования в непрофильных лабораториях, не занимающихся диагностикой туберкулеза. Данные обстоятельства позволят увеличить возможности обнаружения НТМ в клиническом материале при различных нозологиях, помимо МВ. В научной литературе отмечено, что НТМ могут давать рост на мясопептонном, шоколадном и кровяном агарах и на среде Сабуро, используемых в обычных микробиологических лабораториях [46, 48, 58, 61]. Также возможно выделение НТМ в непрофильных лабораториях при исследовании материала, который заведомо в норме должен быть стерильным. Речь идет об исследовании спинномозговой, синовиальной, серозной, плевральной жидкостей, лимфы и крови.

Не менее интересным фактом метаболической активности, который можно использовать при культивировании микобактерий, является участие железа как одного из основных незаменимых микроэлементов необходимых для роста и размножения бактериальных клеток. По причине того, что микобактерии являются облигатными аэробами, железо обеспечивает нормальное функционирование цитохромов и образование энергии при непосредственном участии кислорода. Для получения железа микобактерии способны синтезировать специфичные молекулы переносчики – сидерофоры, участвующие в переносе атомов железа с внеклеточной среды непосредственно в цитоплазму бактерий. Активность железа в жизнедеятельности бактерии делает его незаменимым с точки зрения развития клетки, при этом его количество должно быть в определенной концентрации, так как избыток данного элемента в среде при культивировании может катализировать реакцию Фентона, приводящую к

образованию кислородных радикалов, токсичных для микобактерий [13, 34]. Дефицит же железа, с которым микобактерии могут сталкиваться при попадании в макроорганизм может привести к бактериостатическому эффекту на них [3].

Таким образом, поиск оптимальной концентрации железа при приготовлении питательных сред носит довольно важный характер с точки зрения использования при культивировании и поиске путей оптимизации микробиологического метода при диагностике туберкулеза и микобактериозов различной локализации.

Известно, что при культивировании на плотных питательных средах представители MABSc растут в виде гладких (S – smooth) или шероховатых (R – rough) колоний. Такие различия связаны с наличием в S форме гликопептидолипидов клеточной поверхности, участвующих в образовании биопленок, которые отсутствуют у шероховатых R колоний. Стандартные плотные среды Левенштейна-Йенсена, Финн-2 и жидкие среды Миддлбрука используемые при работе с микобактериями во многом не позволяют выявить их гетерогенность при посевах. При этом отмечено, что большинство клинических изолятов от пациентов с хроническим инфицированием легких связано с выделением колоний MABSc в R форме, тогда как изоляты, выделенные из окружающей среды или недавно инфицированных локусов, демонстрируют рост в гладкой S форме [93].

В десятилетнем исследовании, в котором проводилось изучение изолятов MABSc, выделенных от 10 пациентов с МВ и 3 пациентов без МВ, было показано что переход от гладкого морфотипа колоний к грубому, который наблюдался у 6 пациентов с хроническим инфицированием, был связан с усилением выраженности клинических проявлений. Аналогичные наблюдения были описаны французскими учеными у пациента с МВ [94]. Таким образом существует теория о том, что первоначально пациенты с МВ инфицируются MABSc, которые дают рост на питательных средах в S форме, после этого происходят изменения, формирующие переход MABSc в R форму, в том числе за счет потери гликопептидолипидов клеточной поверхности, которая считается более вирулентной и участвующей в воспалительных реакциях в легких [103, 147].

Видовая идентификация различных микобактерий в связи с генетическими, метаболическими и структурными особенностями имеет определенные ограничения, и НТМ в этом плане не являются исключением. Для определения видовой принадлежности бактерий этой группы МО в настоящее время используются биологические, биохимические, молекулярно-генетические методы и методы протеомного анализа.

Благодаря своей простоте и относительной дешевизне при реализации, наиболее распространенными и широко используемыми методами выделения и последующей идентификации являются методы, направленные на оценку культуральных свойств и определения биохимической активности микобактерий. Возможными причинами такой ситуации являются относительно высокая стоимость, трудо- и времязатратность процессов при внедрении и реализации идентификации современными методами. По этой причине во многих

развивающихся странах, в том числе и в России, диагностика микобактериозов сталкивается с определенными сложностями, что зачастую приводит к низкой выявляемости микобактериозов среди населения [37, 150].

Одним из примеров использования методов, основанных на биохимической активности представителей MABSc, является трехдневный тест на арилсульфатазу, отрицательный тест на нитратредуктазу, низкое поглощения железа и устойчивость к полимиксину B [43]. При этом стоит уточнить, что данные методы используются в большей степени в профильных лабораториях, занимающихся диагностикой инфекций, вызываемых микобактериями. Описано, что при использовании биохимического метода возможно определение около 45 видов НТМ, однако время и пробоподготовка значительно ограничивают его использование при диагностике [11, 20, 21]

В настоящее время для идентификации НТМ широко применяются молекулярно-генетические методы, рекомендованные Всемирной организацией здравоохранения, которые позволяют в определенной мере снизить время, необходимое на исследование клинического материала с возможным нахождением в нем микобактерий. Одним из направлений молекулярно-генетических методов, используемых для идентификации НТМ, являются методы гибридизации. Методика, предложенная Hain Lifescience, основанная на технологии обратной гибридизации продукта ПЦР с видоспецифичными зондами, иммобилизованными на ДНК-стрипах с двумя наборами для ступенчатой идентификации, позволяет определять 28 видов НТМ из культур, выросших на плотных и жидких питательных средах. Учитывая, что среди всех НТМ этиологически значимых насчитывается более 50, применение данной системы весьма ограничено при диагностике микобактериозов [54].

Весомый вклад в работу с НТМ с точки зрения ускорения оптимизации диагностики микобактериозов внесли методы, основанные на секвенировании консервативных генов *hsp65*, *rpoB* [125]. При использовании данных методов качество идентификации во многом зависит от используемых баз данных [53]. Использование таких технологий позволило открыть новые виды НТМ и внести соответствующие изменения в формирование классификаций НТМ. Также к методам с высокой точностью идентификации относят метод секвенирования 16S рРНК, содержащей 1500 пар оснований, который является часто используемым методом и во многом считается эталонным при идентификации НТМ [155]. Данный метод позволяет проводить идентификацию практически всех известных видов НТМ, однако весьма ограничен при применении в профильных и непрофильных лабораториях, занимающихся диагностикой инфекций, вызванных микобактериями, из-за своей высокой стоимости.

За последние десятилетия помимо молекулярно-генетических методов глобальное распространение и внедрение в практику лабораторной диагностики бактериальных инфекций получили методы, основанные на протеомном анализе. Во многих лабораториях применяется хроматографическая идентификации бактерий. Для НТМ наиболее часто используются методы высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЖЭХ) миколовых кислот. Данный метод, обладая

достаточно высокой чувствительностью и специфичностью, позволяет проводить идентификацию более 75 видов НТМ. Как и многие современные методы идентификации бактерий, ВЖЭХ имеет свои недостатки, связанные с особенностями пробоподготовки и необходимости в закупке дорогостоящего оборудования, труднодоступного для обычных микробиологических лабораторий [8, 9, 19].

Таким образом, микробиологическая диагностика НТМ у пациентов с МВ имеет ряд важных особенностей. Для качественной диагностики необходимо проводить подбор питательных сред, позволяющий избежать роста «посторонней» флоры, являющейся неотъемлемой частью мокроты и отделяемого из других локусов, из которых возможно выделение НТМ (мазки из носа, с задней стенки глотки), и своим составом не влияющих на жизненные свойства НТМ или даже позволяющтх ускорить их выделение и последующую их идентификацию. Дополнительно нужно помнить, о том, что представители MABSc могут расти только на плотных питательных средах в R или S форме и эти фенотипические данные можно использовать с точки зрения возможного прогнозирования течения хронической инфекции.

ГЛАВА 3. MALDI-ToF масс-спектрометрия в идентификации нетуберкулезных микобактерий и ее дополнительные возможности

Инновационным направлением в протеомном анализе является метод идентификации МО с использованием времяпролетной матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации масс-спектрометрии (MALDI-ToF). Этот метод позволил значительно расширить границы и снизить ограничения в возможностях видовой идентификации МО, в том числе и микобактерий. Идентификация основывается на получении общего масс-спектра белков исследуемого МО в виде пиков с определением отношения массы к заряду (m/z) и последующего биоинформационного сравнения полученного спектра с базой данных референсных спектров, которые содержатся в базе библиотек конкретного прибора. Так, одна из основных библиотек масс-спектрометра Microflex LT (Bruker Daltonik GmbH, Германия) в версии 2019 года содержит 75 спектров микобактерий. И именно наличие их в библиотеке, количество и определенные параметры масс-спектров, полученных при их создании, влияют на точность видовой идентификации НТМ [19, 37].

В последней версии платформы Bruker IVD-CE MALDI Biotyper® (Bruker Daltonik GmbH, Германия) содержатся данные масс-спектров 182 видов НТМ, известных в настоящее время. Данный факт дает технологии масс-спектрометрии существенное преимущество в сравнении с другими методами идентификации НТМ. Интересной особенностью является то, что при использовании различных питательных сред для культивирования НТМ снятые спектры могут отличаться между собой по интенсивности и количеству полученных пиков [49, 151]. Поэтому стоит учитывать этот факт при создании новых библиотек, содержащих масс-спектры НТМ, используемых для их идентификации.

Среди функций MALDI-ToF масс-спектрометрии помимо определения вида бактерий необходимо отметить возможность проведения более детального исследования МО. Дополнительное программное обеспечение позволяет определить биомаркеры, с помощью которых возможно проведение субтипирования, установление принадлежности к генотипу или серотипу [87, 134, 133, 135]. Данные исследования возможно проводить и в отношении НТМ, в том числе представителей MABSc [87, 88].

Однако при идентификации МО с использованием данного метода врачи-бактериологи могут столкнуться со сложностями идентификации, связанными с особенностями строения определенных бактерий и грибов, в том числе и НТМ. Решением этих проблем является использование не только стандартных протоколов пробоподготовки методом прямого нанесения, но и использование дополнительных протоколов, в которые входят методы расширенного прямого нанесения и методы экстракции белков муравьиной кислотой. Перечисленные методы могут повысить качество и вероятность получения пиков, необходимых для видовой идентификации [35, 44, 67, 79]. По этой причине многие ученые находятся в поиске способов имеющихся дополнительных протоколов

идентификации МО для повышения надежности использования масс-спектрометрии [4, 80].

Помимо определения видовой принадлежности возбудителей бактериальных инфекций технологии MALDI-ToF масс-спектрометрии позволяют проводить более глубокую и детальную обработку параметров, исследуемых МО. При идентификации того или иного МО формируется масс-спектр, индивидуальный для конкретного выделенного штамма. При этом при выполнении эпидемиологического анализа или установления связей между выделенными МО полученные в результате идентификации масс-спектры можно подвергнуть биоинформационному анализу. В случае небольшой выборки штаммов визуальный анализ не вызовет каких-либо сложностей при сравнении и выявлении отличий: в этом случае масс-спектры с помощью определенного программного обеспечения можно сравнить их путем наложения друг на друга. Однако в случае анализа массива данных и масс-спектров, полученных от большого количества выделенных штаммов, визуальное сравнение каждого масс-спектра будет крайне затруднительным [12, 66, 78].

Одним из способов решения проблем сравнения большого количества масс-спектров является использование программного обеспечения MALDI Biotyper 3.0 Offline Classification (Bruker Daltonik GmbH, Германия). Для анализируемых штаммов возможно получение изображений в «псевдогеле». Формируемая картина похожа на результаты одномерного электрофореза белков в полиакриламидном геле GelView, что в определенной степени упрощает работу с анализом масс-спектров. Другим способом визуализации и последующего анализа является построение MSP-дендрограмм (MSP от англ. mass-specter) – иерархическая структура масс-спектров, в которой положение конкретного штамма и связи между всеми исследуемыми штаммами формируются на основании характеристик пиков масс-спектров каждого штамма. Еще одним способом визуального отображения масс-спектров является построение матриц коэффициента корреляции (matrix of compose correlation index, CCI-matrix) – в ней происходит попарное сравнение каждого анализируемого масс-спектра путем расчета коэффициента корреляции (Пирсона). При этом значения коэффициента отображаются в виде цветовой гаммы шкалы тепловизора, в каждой ячейке отражается пара сходных масс-спектров разных штаммов и степень их сродства визуализируется окрашиванием ячейки диапазоном цветов от синего (при абсолютных различиях) до красного (при близком родстве анализируемых штаммов) [66, 78].

Таким образом, технологии MALDI-ToF масс-спектрометрии позволяют проводить не только определение видовой и подвидовой принадлежности бактерий, но и определять с помощью протеомного анализа и соответствующего программного обеспечения степень родства анализируемых штаммов, что позволяет в определенной мере использовать масс-спектрометрию в эпидемиологических исследованиях и в исследованиях штаммов, выделенных от пациентов, с хроническим инфицированием каким-либо МО.

ГЛАВА 4. Анализ распространенности *Mycobacterium abscessus* complex у пациентов с муковисцидозов в российской федерации, выделенных из клинического материала в период с 2017 по 2020 годы.

В период с 2017 по 2020 год было исследовано 5547 образцов клинического материала, полученного от 1148 пациентов с МВ из различных субъектов РФ. За начальный анализируемый период в 2017 году было обследовано 260 пациентов, в 2018 году количество обследуемых увеличилось почти в два раза и составило 467 пациентов, в 2019 году также сохранялся рост числа обследуемых и общее их количество составило 742 пациента. В 2020 году количество больных, от которых был получен биологический материал для микробиологического исследования, несколько снизилось и составило 694 пациента. Образцы были представлены свободно отделяемой мокротой (52,1%), мазками со слизистой оболочки задней стенки глотки (МЗСГ) (30,0%) и отделяемым со слизистой оболочки носа (17,9%).

По данным литературы у пациентов с МВ свободно отделяемая мокрота, является наиболее оптимальным образцом биологического материала для бактериологического исследования респираторных инфекций. Так как получение свободно отделяемой мокроты во многих случаях у больных МВ затруднено или по каким-то определённым причинам пациент не может откашливать мокроту, то рекомендуется использовать для микробиологического исследования мазки со слизистой оболочки глубоких отделов задней стенки глотки после откашливания с целью увеличения вероятности обнаружения патогенных МО. Несмотря на то, что отделяемое со слизистых оболочек носа в настоящее время не является обязательным для исследования у пациентов с МВ, в последние годы в научной литературе все чаще появляется информация о возможном значении анализа отделяемого со слизистой оболочки носа и ЖНЛ, в частности для диагностики возможной сино-назальной колонизации и оценки риска эндогенного инфицирования легочной ткани [25, 35].

ГЛАВА 5. Распространенность *Mycobacterium abscessus* complex, выделенных из клинического материала в период с 2017 по 2020 годы.

Анализируя данные по количеству образцов за период исследования по видам клинического материала можно отметить следующие особенности. В скобках представлены данные в процентах от общего количества исследуемого биоматериала за анализируемый период (мокрота, МЗСГ, отделяемое со слизистой оболочки носа). В 2017 году было проведено микробиологическое исследование 317 образцов (11,0%) мокроты, 93 образцов (5,6%) МЗСГ и 5 образцов (0,5%) со слизистой оболочки носа. Всего было собрано 415 образцов различного биоматериала от пациентов с МВ, что составило 7,5% от общего количества образцов клинического материала. За этот период MABSc был впервые выделен в исследовании из мокроты одного из обследуемых пациентов с МВ.

За 2018 год количество исследованного биоматериала от пациентов с МВ увеличилось почти в три раза и составило 1213 образцов (21,9%) от общего количества материала. За этот период была проанализировано 767 образцов (26,5%) мокроты, исследование образцов МЗСГ увеличилось и составило в 2018 году 256 образцов (15,4%); 190 образцов (19,2%) со слизистой оболочки носа. В первую очередь такое заметное увеличение количества образцов материла со слизистых оболочек носа произошло по причине разработки патента способа забора и первичного посева жидкости назального лаважа от пациентов с МВ для микробиологического исследования (Патент РФ № 2659155) и внедрением его в практику микробиологического исследования [24].

При анализе количества полученных образцов сохранялась тенденция к увеличению их общего количества, что составило в 2019 году всего 2087 образцов (37,6%) от общего количества образцов биоматериала. За этот год было исследовано максимальное количество образцов мокроты – 1141 образец (39,4%), а также за аналогичный период произошло увеличение образцов МЗСГ и составило 527 (31,7%). Почти вдвое увеличилось количество образцов со слизистых оболочек носа 419 (42,3%) и составило почти половину общего количества собранных из этого локуса.

В 2020 году в 1,7 раза уменьшилось количество образцов мокроты 670 (23,1%). Возможно, одной из причин снижения явилось затруднение транспортировки биологического материала в результате пандемии, связанной с распространением коронавирусной инфекции COVID-19, вызванной вирусом SARS-CoV-2. При этом произошло увеличение количества образцов представленных МЗСГ и составило почти половину за весь анализируемый период – 786 образцов (47,3%). Также сопоставимым оказалось по сравнению с 2019 годом количество образцов со слизистых оболочек носа 376 (38,0 %), результаты анализа количества и вида материала отмечены на рисунке 1.

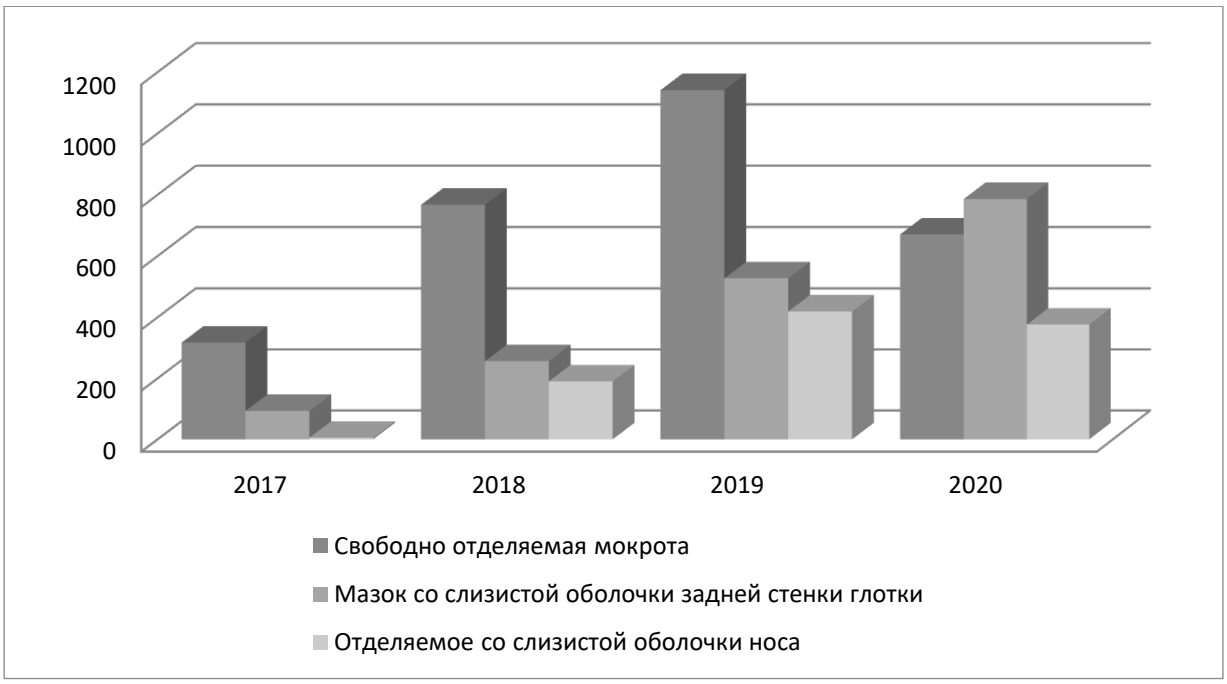


Рисунок 1 – Виды и количество клинического материала в зависимости от периода наблюдения

В связи с тем, что в 2017 году в одном из образцов мокроты был изолирован и идентифицирован патоген, относящийся к группе MABSc, все дальнейшие исследования были направлены на повышение качества выделения и видовой идентификации именно этой группы МО как одной из самой распространенной среди быстрорастущих НТМ, вызывающих инфекционные осложнения у пациентов с МВ. Для достижения этой цели использовалось пролонгированное культивирование и применение селективных питательных сред [26].

Пролонгированное культивирование использовалось для увеличения вероятности обнаружения MABSc, так как большинство обследуемых пациентов, от которых направляют материал для микробиологической диагностики, зачастую находятся на длительной антимикробной химиотерапии препаратами, подавляющими рост НТМ. Именно по этой причине культивирование продолжалось до 28 суток. Помимо этого, дыхательные пути пациентов с МВ в связи с генетическими, физиологическими и анатомическими изменениями подвержены хроническому инфицированию, вызванному грамположительными, грамотрицательными бактериями и другими быстрорастущими МО. Использование селективных питательных сред для подавления их роста также позволило увеличить частоту обнаружения MABSc у пациентов с МВ.

Таким образом, за анализируемый период было выделено 56 штаммов представителей MABSc от 21 пациента с МВ из различных регионов РФ. Необходимо уточнить, что некоторое количество пациентов, от которых были выделены MABSc, повторно обследовались в разные периоды времени. Первый случай выделения был зарегистрирован в 2017 году у пациента из Ростовской области. В дальнейшем количество выделенных штаммов увеличилось в несколько раз и составило 25 штаммов от 12 пациентов за 2018 год.

В 2019 году, несмотря на сохранение роста количества исследуемого клинического материала, число пациентов осталось сопоставимым. Представители MABSc в количестве 24 штаммов были выделены в разные периоды года от 10 пациентов. Стоит отметить, что чаще всего представители MABSc выделялись из мокроты, возможно именно из-за сокращения количества образцов мокроты в 2020 году снизилось и количество выделенных штаммов MABSc (6 штаммов, выделенных от 5 пациентов).

Анализируя весь период проводимого исследования с 2017 по 2020 годы, материалом, из которого были выделены представители MABSc, в подавляющем большинстве оказалась мокрота – 52 образца (93,0%), также MABSc были обнаружены в 3 образцах (5,3%) МЗСГ и в одном образце (1,7%) материала, отделяемого со слизистой оболочки носовой полости. Количество и вид материала из которого были выделены MABSc, представлены на рисунке 2.

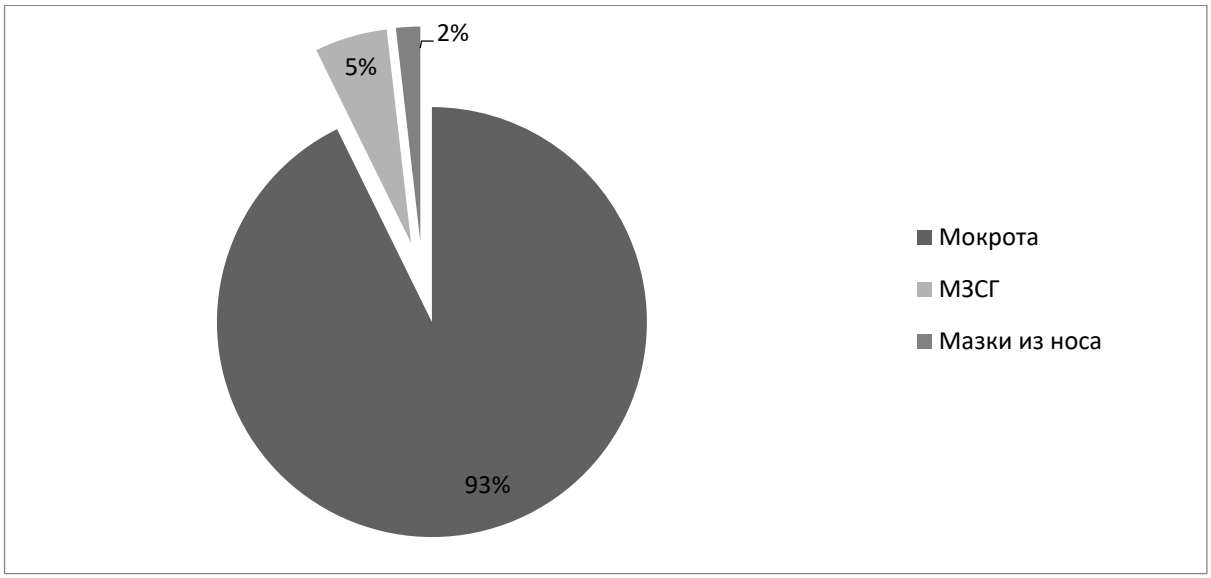


Рисунок 2 – Вид клинического материала, из которого были выделены MABSc

Помимо этого, результаты анализа показали закономерное увеличение числа обследованных пациентов с МВ. Особенно важно отметить, увеличение количества материала, представленного мазками с верхних дыхательных путей. Данный вид материала не исследуются в лабораториях противотуберкулезной службы, а дети в когорте пациентов с МВ является доминирующей группой, сбор мокроты у которой представляет определенные трудности. Несмотря на то, что частота обнаружения MABSc с верхних дыхательных путей была низкой, определенные изменения и оптимизация методов микробиологической диагностики, возможно, смогут повысить вероятность обнаружения MABSc с этих локусов.

Необходимо отметить, что микобактериозы зачастую имеют определенные региональные особенности по распространению в зависимости от географической местности и природных условий. В связи со значительным разнообразием

климатических зон в РФ было принято решение проанализировать региональные особенности распространенности MABSc у пациентов с МВ.

Следует отметить, что за обозначенный период исследования при скрининговом обследовании пациентов с МВ на предмет инфицирования или колонизации дыхательных путей было выявлено 56 штаммов MABSc от 21 пациента из 13 различных субъектов РФ представленных, на рисунке 4. Наибольшее количество больных, у которых в клиническом материале были выделены штаммы MABSc: 4 пациента из Ростовской области, 3 пациента из Тюменской области, по 2 пациента из Республики Татарстан, Московской и Самарской областей; также по одному пациенту из Республик Крым, Башкортостан, Марий Эл и Свердловской, Волгоградской, Липецкой, Воронежской областей, Пермского края.

Средний возраст 21 пациента, у которых были зарегистрированы случаи выделения MABSc, составил 14,42 лет, из них 12 представителей женского пола и 9 мужского пола.

В настоящее время в РФ, согласно официальным данным, образовано восемь Федеральных округов (ФО): Центральный, Северо-Западный, Южный, Северо-Кавказский, Приволжский, Уральский, Сибирский, Дальневосточный. В наше исследование был включен и проанализирован клинический материал из субъектов РФ, представляющих все вышеперечисленные ФО. Однако не во всех регионах были выявлены случаи высева представителей MABSc из биологического материала. MABSc были изолированы и идентифицированы из посевов биоматериала от пациентов из 4 ФО: из Центрального ФО (ЦФО) были выявлены 4 пациента с высевами представителей MABSc, из Южного ФО (ЮФО) – 6 из Приволжского ФО (ПФО) – 7 из Уральского ФО (УФО) – 4 пациента.

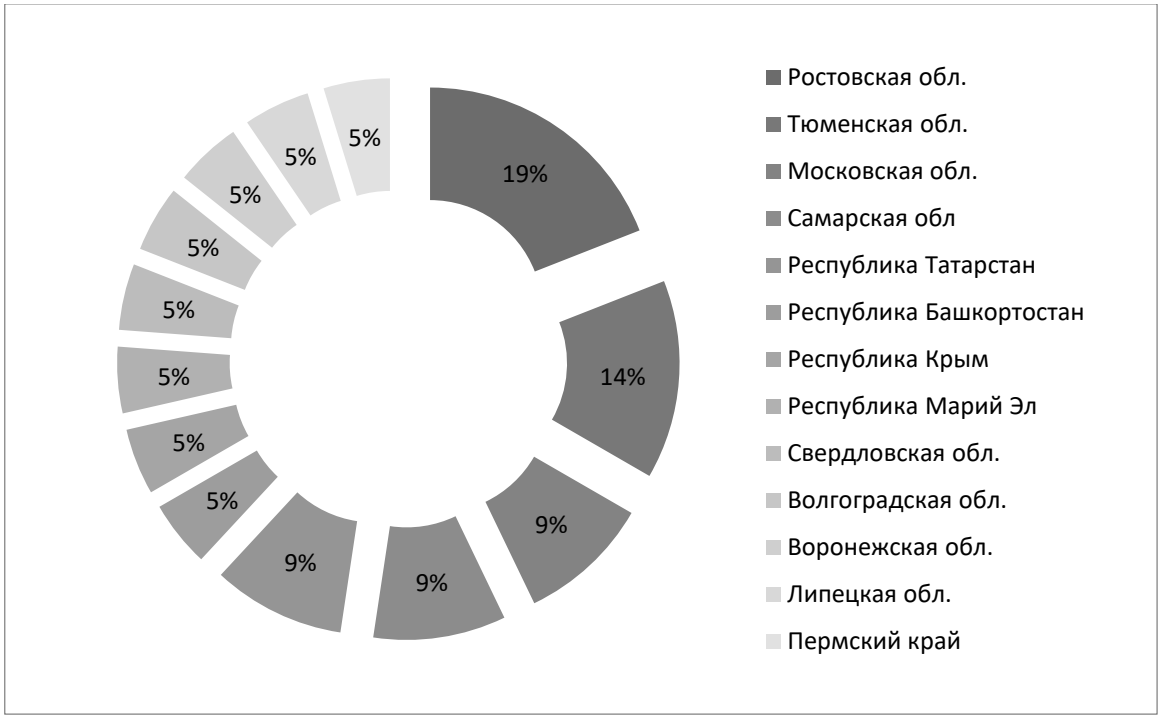


Рисунок 3 – Субъекты РФ, в которых зарегистрированы пациенты с высевами MABSc

Больше всего исследуемого материала поступало от пациентов, которые находятся в ПФО, что позволило выделить MABSc из биологического материала в максимальном количестве именно в этом ФО. В состав ПФО в настоящее время входят 6 республик, 7 областей и Пермский край.

Таким образом, всего за весь анализируемый период был исследован клинический материал от 353 пациентов из всех 14 субъектов, которые входят в состав ПФО. Всего по данным «Регистра больных муковисцидозом Российской Федерации. 2018 год» в ПФО находилось 675 пациентов с МВ, число обследуемых нами пациентов составило 52,2% от общего количества зарегистрированных пациентов. Так как из ПФО у 7 пациентов были выделены MABSc, доля инфицированных за анализируемый период, согласно нашим данным, составила 2,0%.

На втором месте по числу обследованных пациентов находится ЦФО с 2017 по 2020 годы: нами был исследован материал от 141 пациента (14,5% от общего количества зарегистрированных в этом субъекте). Всего по данным «Регистра больных муковисцидозом Российской Федерации. 2018 год» в ЦФО зарегистрировано 966 пациентов. Доля инфицированных в ЦФО, согласно нашим данным и согласно числу исследуемого материала от 141 пациента, составила 2,8%.

Следующим по числу обследуемых пациентов ФО, у которых были выделены MABSc, был ЮФО (173 пациента), что составило 58,0% из всех зарегистрированных пациентов. Согласно данным «Регистра больных муковисцидозом Российской Федерации. 2018 год» в ЮФО зарегистрировано 298 пациентов. Таким образом, согласно расчетам, доля инфицированных в ЮФО составила 3,5%.

Заключительное место по числу пациентов занимает УФО: всего 96 пациентов (36,6%) из 262 зарегистрированных. Доля инфицированных MABSc в УФО составила 4,1 % – это максимальное значение среди всех ФО РФ.

Дополнительно проведен анализ заболеваемости по областям. Наибольшее количество пациентов, от которых были выделены MABSc, зарегистрированы в Ростовской области. В ней всего зарегистрированы 96 больных, в нашем исследовании было проведено микробиологическое исследование материала от 64 пациентов (66,6%). Из биоматериала от 4 пациентов были выделены MABSc, доля инфицированных в Ростовской области составила 6,3 %.

Следующую позицию по числу пациентов, от которых были выделены MABSc занимает Тюменская область. В её состав входят два субъекта Российской Федерации: Ханты-Мансийский — Югра и Ямало-Ненецкий автономные округа. В общей сложности в ней зарегистрированы 107 пациентов с МВ, нами были обследованы 60 пациентов, что составило 56,0%. Таким образом, доля инфицированных в Тюменской области составила 3,7%.

По 2 пациента с высевом MABSc были зарегистрированы в Самарской, Московской областях и Республике Татарстан. В них всего зарегистрированы 104, 398 и 118 пациентов, соответственно. Нами было обследовано 80 (76,9%), 21 (5,2%) и 58 (49,1%) пациентов. Из этого следует, что доля инфицированных

составила в Самарской области – 2,5%, в Московской – 9,5% и в Республике Татарстан – 3,4%.

Субъекты РФ, в которых зарегистрированы случаи выделения MABSc, представлены в таблице 2.

Таблица – 2 Субъекты РФ с зарегистрированными случаями выделения MABSc от одного пациента

Наименование субъекта	Число зарегистрированных пациентов (n)	Число обследованных пациентов (n)	Доля обследованных пациентов, от общего числа зарегистрированных пациентов (%)	Инфицированность (%)
Республика Крым и г. Севастополь	66	46	69,7	2,1
Республика Башкортостан	74	59	79,7	1,7
Республика Марий Эл	5	8	100,0*	12,5
Волгоградская	13	29	100,0*	3,4
Воронежская	65	36	55,4	2,7
Липецкая	13	14	100,0*	7,1
Свердловская	93	5	5,3	20
Пермский край	54	19	35,2	5,2
Примечание: *Количество зарегистрированных пациентов по данным регистра 2018 года может быть меньше действительного количества в связи с более поздними сроками проведения исследования				

В них было зарегистрировано по одному пациенту, в материале от которых были обнаружены MABSc.

ГЛАВА 6. Видовое разнообразие микроорганизмов, выделенных из клинического материала у пациентов с муковисцидозом совместно с представителями *Mycobacterium abscessus* complex

Практически во всех клинических образцах, исследованных культуральным способом совместно с MABSc, был получен рост сопутствующей микрофлоры. Наиболее часто рост MABSc был выявлен в ассоциации с 2 микроорганизмами – 16 случаев, с 3 МО – в 14 случаях, с 4 МО – 9 случаев, по два случая с 1 и 5 МО и по одному случаю выделения с 6 и 7 МО. И лишь в одном случае MABSc находился в клиническом материале в монокультуре. Количество МО, выделенных совместно с MABSc, представлено на рисунке 4.

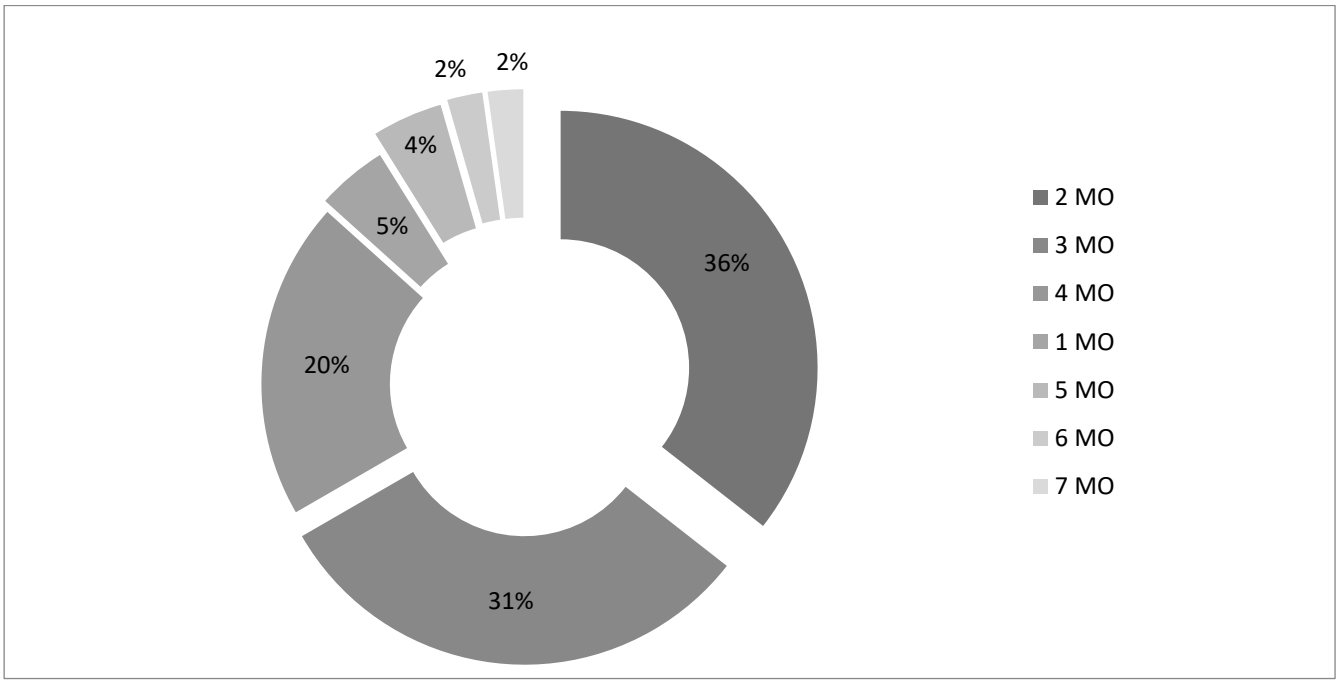


Рисунок 4 – Количество выделенных в посевах микроорганизмов совместно с MABSc

При оценке видового состава МО оценивались бактерии, которые были выделены совместно с MABSc. С 2017 по 2020 год идентифицировано 223 штамма различных МО, выделенных от пациентов с зарегистрированными высевами MABSc. Большинство из этих МО являются клинически значимыми и принимают участие в развитии инфекционного процесса у пациентов с МВ. Чаще всего были выделены грамположительные МО, следующую позицию занимают НФГОБ и дрожжеподобные грибы. Наиболее частым патогеном, с которым выделялись MABSc, оказался *Staphylococcus aureus*, он был выделен в 29 случаях, в 24 случаях были выделены представители *Candida spp*, которые не имеют в большинстве случаев клинического значения, однако могут повлиять на ростовые свойства MABSc.

На третьем месте оказался представитель «типичной» для пациентов с МВ флоры – *Pseudomonas aeruginosa*, который находился в клиническом материале в

13 случаях. Также совместно с представителями MABSc были выделены представители BCC в 2 случаях, в 11 случаях выделялась *Stenotrophomonas maltophilia*, в 6 случаях рост MABSc сопровождался ростом *E.coli*, отмечены 3 случая выделения *Streptococcus pneumoniae* и 7 случаев выделения *Enterococcus faecalis*. Данные о структуре сопутствующей микрофлоры, выделенной совместно с MABSc, представлены на рисунке 5.

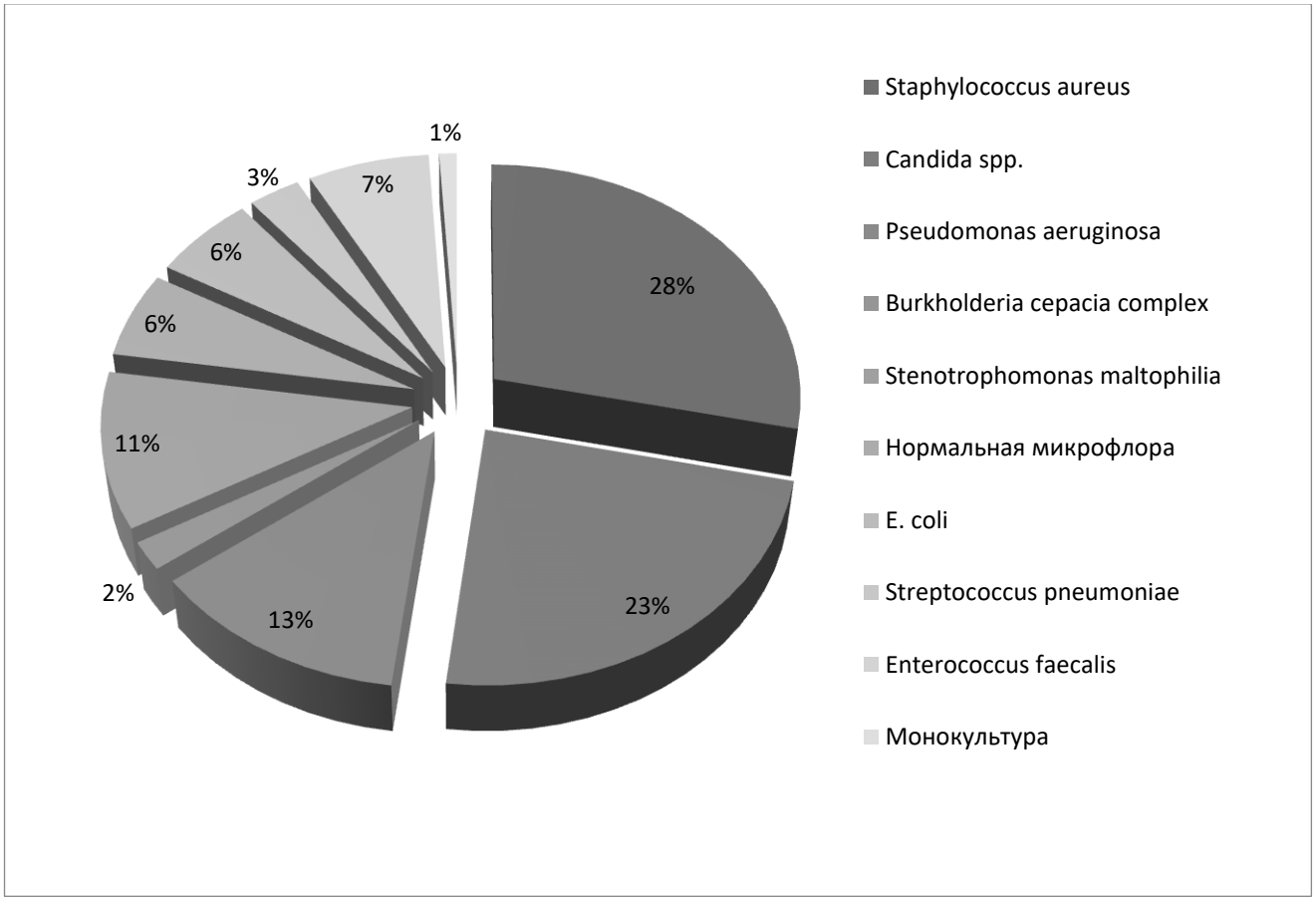


Рисунок 5 – Сопутствующая микрофлора, выделенная с MABSc

Также более подробно проанализирована структура МО, выделенных с первой группой клинически значимых МО, у пациентов с МВ и проведена их количественная оценка, которая представлена в таблице 3. Наиболее часто *Staphylococcus aureus* выделялся с *Pseudomonas aeruginosa* и *Candida* spp., а также с нормальной микрофлорой верхних дыхательных путей и в одном случае только с MABSc. *Pseudomonas aeruginosa* в свою очередь наиболее часто выделялась с *Staphylococcus aureus*, в 2 случаях – *Candida* spp. и в 1 случае – BCC. Рост *Stenotrophomonas maltophilia* на питательных средах в 11 случаях наблюдался совместно с *Candida* spp, в 5 случаях – *Enterococcus faecalis* и в 1 случае – BCC.

Таблица 3 – Сопутствующая микрофлора, выделенная с MABSc

	Всего штаммов	Вид МО	n	Вид сопутствующей флоры	n
MABSc	56	*Staphylococcus aureus*	29	**Энтеробактерии**	
				Enterobacter cloacae	1
				Escherichia coli	2
				Pantoea agglomerans	1
				Грамположительные	
				Enterococcus faecalis	1
				Streptococcus pneumoniae	2
				НФГОБ	
				Pseudomonas aeruginosa	9
				Дрожжеподобные грибы	
				Candida spp.	9
				Только с нормальной флорой	8
				Только *Staphylococcus aureus*	1
		Pseudomonas aeruginosa	13	**Энтеробактерии**	
				Enterobacter cloacae	1
				Escherichia coli	1
				Грамположительные	
				Enterococcus faecalis	1
				Staphylococcus aureus	9
				НФГОБ	
				Burkholderia cenocepacia	1
				Дрожжеподобные грибы	
				Candida spp.	2
				Только с нормальной флорой	-
				Только *Pseudomonas aeruginosa*	-
		Stenotrophomonas maltophilia	11	**Энтеробактерии**	
				Escherichia coli	1
				Грамположительные	
				Streptococcus anginosus	1
				Staphylococcus epidermidis	1
				Enterococcus faecalis	5
				НФГОБ	
				Burkholderia cepacia group	1
				Дрожжеподобные грибы	
				Candida spp.	11
				Только с нормальной флорой	-
				Только *Stenotrophomonas maltophilia*	-

Полученные данные необходимо принимать во внимание при культивировании MABSc на питательных средах. В целом среди всех результатов

микробиологического исследования в 82,1% случаев MABSc были выделены с клинически значимой для пациентов с МВ микрофлорой.

Таким образом, исходя из того, что рост MABSc в доминирующем большинстве регистрировался с другими МО, необходимо учитывать определенные сложности при культивировании и идентификации MABSc. Зачастую сопутствующая микрофлора может усложнить процедуры выделения MABSc в связи с определенными физиологическими и культуральными особенностями данной группы МО. Особенно это актуально с точки зрения использования и выбора оптимальных селективных питательных сред для выделения MABSc, потому что довольно часто грамположительные, НФГОБ, дрожжеподобные грибы и различные представители орофарингеальной микрофлоры могут ингибировать рост MABSc, что в результате влияет на диагностику микобактериозов и определение тактики антимикробной химиотерапии у пациентов с МВ.

Кроме MABSc за время исследования у пациентов с МВ были выделены другие представители НТМ: *M. marinum* и *M. fortuitum*. Независимо от того, что MABSc являются одними из самых часто выделяемых НТМ у пациентов с МВ, нельзя исключать и непосредственно необходимо учитывать появление в посевах и НТМ из других групп.

Помимо НТМ в нашем исследовании был получен рост других представителей группы кислотоустойчивых МО из порядка *Actinomycetales* таких как *Nocardia farcinica, Rhodococcus fascians, Rhodococcus equi, Rhodococcus globerulus, Cellulosimicrobium cellulans, Gordonia rubriperctincta, Brevibacterium casei*, что является важным с точки зрения дифференциальной диагностики при постановке диагноза у пациентов с МВ.

Кислотоустойчивые МО из порядка *Actinomycetales* были выделены из различного биологического материала: в 3 случаях из мокроты, из 4 образцов материала со слизистой оболочки носа и из 2 образцов МЗСГ (всего от 8 пациентов с МВ). *Nocardia farcinica* была выделена совместно с *Pseudomonas aeruginosa, Stenotrophomonas maltophilia, Acinetobacter calcoaceticus, Candida dubliniensis, Candida albicans.*

Представители рода *Rhodococcus* выделялись только с одним МО: *Rhodococcus fascians* и *Candida albicans, Rhodococcus globerulus* и *Staphylococcus epidermidis, Rhodococcus equi* и *Staphylococcus aureus. Cellulosimicrobium cellulans* был выделен совместно с *Candida albicans; Gordonia rubripertincta* совместно с *Enterococcus faecalis, Streptococcus vestibularis, Candida albicans. Brevibacterium casei* совместно с *Staphylococcus aureus, Streptococcus oralis, Corynebacterium propinquum*. Все случаи выделения регистрировались однократно, однако, у одного из пациентов *Nocardia farcinica* была выделена из двух локусов одновременно с задней стенки глотки и со слизистой оболочки носовой полости. Эти данные также показывают необходимость разработки алгоритмов деконтаминации клинического материала для повышения качества микробиологической диагностики данной группы МО.

ГЛАВА 7. Характеристика нетуберкулезных микобактерий от пациентов, обследованных при подозрении на туберкулез легких

За период с 2017 по 2020 годы были обследованы пациенты с подозрением на туберкулез легких. Всего был проанализирован материал и собрана мокрота для микробиологического исследования от 1707 пациентов, из них 1207 мужчин и 500 женщин.

В 515 образцах клинического материала от 404 пациентов была обнаружена атипичная микрофлора, не похожая на микобактерии туберкулезного комплекса, но схожая с НТМ. В 15 образцах мокроты, собранных от 13 пациентов, при микробиологическом исследовании получен рост НТМ по культуральным свойствам схожим с представителями MABSc. Из них 8 женщин и 5 мужчин со средним возрастом 50,93 лет.

При дальнейшем изучении удалось идентифицировать методом ДНК-гибридизации 14 культур как *M. abscessus*, при этом в одном случае был получен рост *M. abscessus* и *M. avium* в одном образце, и один образец идентифицировать данным методом не удалось. Дополнительно эти же культуры были идентифицированы методом MALDI-ToF масс-спектрометрии. После проведения идентификации 10 штаммов были определены как *M. abscessus*, в 3 случаях был выявлен рост микроорганизмов, не относящихся к группе НТМ, а именно бактерии следующих родов: *Tsukamurella,* и *Corynebacterium* и один представитель царства грибов *Rhodotorula*. В одном случае рост *M. abscessus* сопровождался ростом *M. chelonae*, в остальных случаях *M. abscessus* был идентифицирован в монокультуре. И в одном образце клинического материала также, как и методом ДНК-гибридизации, не удалось идентифицировать один штамм МО. Необходимо отметить, что в одном образце среди атипичных микобактерий, был один образец мокроты в котором был выявлен рост и идентифицирована обоими методами культура *M. chelonae* у женщины в возрасте 60 лет.

Среди всей контаминирующей флоры от 1303 пациентов лишь в одном случая был получен рост *M. abscessus* у 39 летней женщины. Таким образом, доля инфицированных среди этой группы обследованных составила 0,07%. В материале от 3 пациентов были идентифицированы *M.chelonae*, в этом случае доля инфицированных составила 0,23%. Эти данные позволяют нам сделать заключение, что среди пациентов с бронхолегочной патологией без МВ доля инфицированных составляет низкие показатели, если сравнивать с группами, пациентов, которые находятся в группе риска по возможному инфицированию представителями MABSc. Это особенно важно при микробиологическом исследовании материала, полученного от пациентов с МВ и другими бронхолегочными заболеваниями.

Актуальность и значимость микробиологической диагностики клинического материала, выделенного от пациентов с МВ, в настоящее время безусловно, не вызывает никаких сомнений. Несмотря на то, что большая часть МО, имеющих доказанное клиническое значение при развитии инфекционных осложнений,

достаточно хорошо изучена, с каждым годом появляется новые патогены участие, которых в развитии патологического процесса на данный момент остается неясным.

Быстрорастущие НТМ и другие кислотоустойчивые МО занимают отдельную нишу среди «типичных» представителей различных семейств бактерий, которые колонизируют дыхательные пути пациентов с МВ. В первую очередь это связано с тем, что для выделения НТМ из биологического материала необходимо соблюдать определенные этапы микробиологической диагностики и в отношении представителей MABSc на сегодняшний день не разработаны алгоритмы, в которые входит подбор оптимальных плотных или жидких питательных сред, а также не стандартизированы сроки культивирования материала, которые повысят вероятность обнаружения НТМ.

На наш взгляд, именно по этой причине в Российской Федерации согласно одному из немногих документов, в котором отражены официальные данные, частота выявления инфицированных пациентов НТМ составляет на 2017 год 0,7 % и 0,9 % в 2018 году [31, 32]. По результатам наших исследований, в которых было проведено микробиологическое исследование 1148 пациентов с МВ (из них у 21 пациента был зарегистрирован высев представителей MABSc) доля пациентов, от которых были выделены MABSc составила 1,8%. Несмотря на то, что доля инфицированных составила не такой высокий показатель, внедрение способов и алгоритмов по предварительной деконтаминации, подбору оптимальных питательных сред, сроков культивирования и последующего их внедрения в работу микробиологических лабораторий, которые занимаются исследованиями материала от пациентов, позволит повысить вероятность обнаружения MABSc и других НТМ у больных МВ. В дальнейшем это позволит корректировать назначения антимикробной терапии и, возможно, снизить вероятность развития осложнений у пациентов этой группы.

ГЛАВА 8. Определение оптимальных сроков культивирования необходимых для выделения представителей *Mycobacterium abscessus* complex изолированных от пациентов с муковисцидозом

Современные варианты классификационного разделения НТМ на группы и клады не получили широкого распространения в медицинской микробиологии в связи с тем, что для их практического применения необходимо дорогостоящее оборудование и трудозатратные технологии. Именно по этой причине сохраняет свою актуальность классификация НТМ, основанная на различиях в скорости роста и по способности к пигментообразованию при культивировании на плотных питательных средах. Согласно этой классификации НТМ разделены на фотохромогенные, скотохромогенные, нефотохромогенные и быстрорастущие виды [126].

Однако в непрофильных по работе с МТС лабораториях имеется возможность осуществить выделение представителей MABSc не только из клинического материала от пациентов с МВ, но и от пациентов с другими нозологиями, находящихся на стационарном лечении в отделениях хирургии, дерматовенерологии, косметологии, трансплантологии и пульмонологии. Используя селективные среды, действуя согласно алгоритмам пролонгированных сроков культивирования и соблюдая определенные критерии температурного режима при культивировании в лабораториях, не занимающихся целенаправленным выделением микобактерий, существует определенная вероятность выделения представителей быстрорастущих НТМ с идентификацией их до рода и последующей видовой идентификацией в референсных лабораториях.

Согласно данным литературы, при посеве на искусственные питательные среды видимый рост MABSc, как правило, наиболее часто появляется в течение 7 суток после проведения инокуляции [101]. Оптимальный температурный режим при этом весьма обширен и варьируется в диапазоне от 2 до 45°С. Для культивирования используются среды для селективного выделения микобактерий: Левенштейн-Йенсена, Финн-II. Для ускорения выявления и регистрации роста используются жидкие питательные среды, чаще всего – Миддлбрук 7H11 [124].

В связи с особенностями микробного разнообразия в клиническом материале от пациентов с МВ, в случае инфицирования или транзиторного носительства, выделение представителей MABSc довольно часто регистрируется совместно с другими быстрорастущими микроорганизмами, видимый рост, которых происходит в течение суток, что сильно затрудняет выявление НТМ из биологического материала.

Данный факт весьма актуален для пациентов с МВ в связи с тем, что наиболее часто у данных пациентов выделяются такие МО, как *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Achromobacter xylosoxidans* и представители порядка *Enterobacterales*, которые могут существенно повлиять на рост и выделение НТМ на плотных элективных средах. Помимо использования

селективных сред для повышения частоты выделения *M.abscessus* могут быть использованы методы деконтаминации клинического материала N-ацетил-L-цистеином, гидроксидом натрия или щавелевой кислотой. Хотя имеются данные о возможном негативном влиянии способов деконтаминации на ростовые особенности и жизнеспособность быстрорастущих НТМ, именно по этой причине обсуждаются вопросы о необходимости разработки менее агрессивных методов выделения быстрорастущих микобактерий из клинического материала без предварительной обработки и использованием только селективных питательных сред [55].

Для анализа возможного использования культуральных особенностей представителей MABSc, полученных при выделении из клинического материала от пациентов с МВ, нами было проведено исследование, направленное на оценку культуральных свойств микобактерий и определение сроков культивирования при первичном посеве. С целью реализации поставленной задачи были использованы следующие плотные питательные среды: универсальная хромогенная среда содержащая триптофан и хромогены для выявления глюкуронидаз и галактозидаз; селективная среда для выделения BCC.

После проведения культивирования на плотных питательных средах в большинстве случаев регистрировался рост представителей MABSc в виде гладких (S-smooth) или шероховатых (R-rough) колоний. В научной литературе отмечено, что синтез гликопептидолипида микобактериями, участвующего в образовании биопленок, дает возможность расти штаммам MABSc в S-форме. При его отсутствии колонии растут в R-форме [147]. Часть исследуемых штаммов давала рост в мукоидной форме, необходимо уточнить, что данная особенность в отношении НТМ в настоящее время еще недостаточно изучена.

Как отмечалось в предыдущих главах, в период с 2017 по 2020 год было собрано 56 штаммов представителей MABSc, выделенных из клинического материала 21 пациента с МВ из различных регионов России. В соответствии с критериями Европейского общества кистозного фиброза по лечению микобактериоза у пациентов с кистозным фиброзом (2016) и рекомендациями, подготовленными специалистами ATS/ERS/ESCMID/IDSA (2020), описано что для верификации диагноза «микобактериоз» один и тот же вид НТМ должен быть выделен в ≥ 2 образцах при культуральном исследовании мокроты, собранной с интервалом в 1 неделю или более [156].

Среди обследуемых пациентов за анализируемый период у 7 пациентов зарегистрированы высевы представителей MABSc из клинического материала более одного раза 37 (72,5%) штаммов и 14 (27,5%) штаммов представителей MABSc от 14 пациентов были выделены однократно.

Данные по регулярности и промежуткам между высевами представителей MABSc, количеству в КОЕ и суткам регистрации появления видимого роста отражены в таблице 4. В таблице представлены данные о проводимых первичных посевах клинического материала на селективную среду для выделения BCC.

Таблица 4 – Пациенты, из клинического материала которых были выделены представители MABSc более одного раза

Пациент	Промежуток между посевами (месяцы)	Сутки появления видимого роста	КОЕ
№1	1-й высев	7	10^4
	1	**22**	10^4
	11	**20**	10^3
ИТОГО	**3 дня (3 штамма)**		
№2	1-й высев	12	10^2
	5	10	10^4
	3	**21**	10^3
	3	6	10^4
	4	6	10^4
	3	**20**	10^4
	11	5	10^4
ИТОГО	**7 дней (7 штаммов)**		
№3	1-й высев	5	10^2
	2	4	10^3
	1	5	10^4
	0,25	5	10^4
ИТОГО	**4 дня (6 штаммов)**		
№4	1-й высев	8	10^5
	1	8	10^5
	0,5	8	10^5
	8	**18**	10^4
	3	6	10^2
	3	7	10^4
	5	5	10^5
ИТОГО	**7 дней (7 штаммов)**		
№5	1-й высев	6	10^3
	5	4	10^5
	8	5	10^4
	3	5	10^5
	4	**24**	10^2
	3	14	10^4
	7	**23**	10^4
	3	4	10^4
	3	5	10^3
	1	5	10^4
	12	**18**	10^4
ИТОГО	**11 дней (13 штаммов)**		
№6	1-й высев	10	10^3
	3	10	10^3
	5	14	10^2
ИТОГО	**3 дня (4 штамма)**		

№7	1-й высев	14	10^4
	0,5	14	10^3
ИТОГО	**2 дня (2 штамма)**		
ВСЕГО	**37 высевов (42 штамма)**		

Также был рассчитан средний показатель между посевами клинического материала от этих больных: у пациента №1 разница между посевами в среднем составила 6 месяцев и выделено 3 штамма; у пациента №2 – 4,8 месяца, всего 7 штаммов; у пациента №3 – 1 месяц, всего 6 штаммов; у пациента №4 – 3,4 месяца и выделено 7 штаммов; у пациента №5 этот показатель составил 4,9 месяца, всего было выделено штаммов – 13; у пациента №6 – 4 месяца и зарегистрирован высев 4 штаммов, у пациента №7 разница между первым и последним исследованием составила 0,5 месяца и выделено 2 штамма. Эти данные показывают значимость регулярного микробиологического обследования у пациентов с МВ не реже 1 раза в 3 месяца, что отражено в национальных и международных рекомендациях [30, 76].

Следует уточнить, что от некоторых пациентов поступало одновременно несколько образцов клинического материала, собранных в разное время суток и после проведения процедур кинезитерапии. Эти действия были необходимы для увеличения вероятности обнаружения НТМ в биоматериале. В случае выделения МО в один день данные штаммы не были включены в исследовании особенностей длительности и сроков культивирования MABSc.

Для штаммов, выделенных от данной группы пациентов, была рассчитана медиана выявления сроков появления роста, которая составила 8 суток. Результаты описательной статистики представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Результаты описательной статистики сроков выявления роста представители MABSc выделенных более одного раза

Показатель	Me	$Q_1 – Q_3$	n	min	max
сутки	8	5 – 14	37	4	24
Me – медианное значение суток; Q_1 – Q_3 – 25 квантиль и 75 квантиль; n – количество штаммов; min, max – минимальное и максимальное количество колоний соответственно					

Сроки культивирования для выявления роста представителей MABSc у данной группы пациентов составили минимально 4 суток, максимально 24 суток. В связи с тем, что пациенты с МВ получают регулярные курсы антибактериальных препаратов, в том числе азитромицин, которые могут оказывать бактериостатическое действие на представителей MABSc, возможно, что удлиненные сроки выделения при хроническом высеве обусловлены данным фактом. По этой причине нами были проанализированы сроки выделения представителей MABSc от пациентов с однократным высевом, представленные в таблице 6.

Таблица 6 – Сроки выявления роста у пациентов с однократным высевом представителей MABSc

Пациент №	*Сутки появления видимого роста*	*КОЕ*
8	12	10^5
9	**21**	10^3
10	**20**	10^3
11	**21**	10^2
12	7	10^4
13	4	10^5
14	5	10^3
15	**28**	10^4
16	6	10^3
17	4	10^3
18	9	10^4
19	**20**	10^2
20	4	10^3
21	5	10^3

Результаты описательной статистики для сроков роста представителей MABSc, выделенных от пациентов однократно, представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Результаты описательной статистики сроков культивирования у пациентов с однократным высевом представителей MABSc

Показатель	Me	$Q_1 – Q_3$	n	min	max
сутки	8	5 – 20	14	4	28
Me – медианное значение суток; Q_1 – Q_3 – 25 квантиль и 75 квантиль; n – количество штаммов; min, max – минимальное и максимальное количество колоний соответственно					

Таким образом, по результатам проведенного анализа, мы выявили, что медиана сроков культивирования для выделения представителей MABSc у пациентов с однократным высевом также составила 8 суток, что соответствует критериям появления роста быстрорастущих НТМ [126]. Среди пациентов с хроническим инфицированием/колонизацией MABSc доля высевов, в которых микобактерии были выделены более чем через 8 суток, составила 43,2%, среди пациентов с однократным высевом – 50,0%.

Дополнительно для сравнения со сроками культивирования биологического материала от пациентов с МВ было принято решение проанализировать сроки выявления роста представителей MABSc выделенных от пациентов, обследуемых при подозрении на туберкулез. После проведения вычислений сроки

культивирования в этой группе пациентов составили 5±1 суток. Полученные данные, как отмечалось выше, свидетельствуют о том, что возможно по причине того, что пациенты с МВ довольно часто получают длительную антимикробную химиотерапию мы наблюдаем увеличение сроков выявления роста представителей MABSc. В том числе при сравнении с группой пациентов, обследованных при подозрении на туберкулез. Количественная оценка представлена в таблице 8.

Таблица 8 – Описательная статистика сроков выделения представителей MABSc выделенных от пациентов, обследуемых при подозрении на туберкулез

Показатель	M ± SD	95% ДИ	n	min	max
Сутки	5 ± 1	4 – 6	8	3	7
M – средняя арифметическая величина; SD – стандартное отклонение; ДИ – доверительный интервал границ 95%; min, max – минимальное и максимальное количество колоний соответственно					

В руководстве по микробиологической диагностике инфекций дыхательных путей у пациентов с МВ отмечена возможность выявления роста представителей MABSc при продленной инкубации до 14 суток [35]. В нашем исследовании среди 56 штаммов (42 штамма у пациентов с 2 и более высевами и 14 штаммов выделенных однократно), изолированных от больных МВ рост 43 (76,8%) штаммов выявлен в период до 14 суток и рост 13 (23,2%) штаммов регистрировался после 14 суток.

При проведении сравнительной статистики (используемый метод: Точный критерий Фишера) группы пациентов с 2 и более высевами с группой больных с однократным высевом не было получено статистически значимых данных (p = 0,274). Результаты представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Результаты сравнительной статистики анализа сроков культивирования в зависимости от количества высевов

Показатель	Категории	количество высевов		p
		Более 2 высевов	Однократный	
Срок культивирования	До 14 суток	34 (81,0)	9 (64,3)	0,274
	15 и более суток	8 (19,0)	5 (35,7)	
*различия статистически значимы при значении p <0,05				

Анализируя полученные данные, можно сделать заключение о том, что вне зависимости от информации из анамнеза о предыдущих высевах НТМ культивирование посевов на селективной среде для выделения ВСС от пациентов с МВ целесообразно проводить до 28 суток. Но зачастую при соблюдении данных сроков возможно формирование определенных рисков развития дегидратации питательной среды в чашке Петри. По этой причине в целях снижения этих рисков необходимо создавать условия, препятствующие дегидратации среды, к которым в том числе можно отнести модифицированную лабораторную посуду, которую мы использовали в исследовании [22, 23].

ГЛАВА 9. Оценка культуральных свойств представителей *Mycobacterium abscessus* complex выделенных на плотных питательных средах

Параллельно с исследованием по установлению оптимальных сроков выделения представителей MABSc на агаризованных питательных средах была проведена оценка культуральных свойств анализируемых микобактерий. Было проведено культивирование 56 штаммов от пациентов с МВ и 8 штаммов от пациентов, обследованных при подозрении на туберкулез, на среде для выделения BCC и хромогенной среде.

На среде для выделения BCC, также выявлены различные вариации морфотипов колоний микобактерий: 31 штамм (48,5%) давал рост в форме S колоний; 16 штаммов (25%) росли в R форме колоний; 17 штаммов (26,5%) при культивировании давали рост как в S, так и в R форме колоний (гетерогенная популяция). При культивировании на хромогенной среде были выявлены следующие морфотипы микобактерий: 30 штаммов (46,9%) росли в форме S колоний; 11 штаммов (17,2%) давали рост в R форме колоний; 23 штамма (35,9%) при культивировании давали рост как в S, так и в R форме колоний (гетерогенная популяция). Культуральные свойства микобактерий, выращенных на среде для выделения BCC и хромогенной среде представлены Приложении 1.

Согласно научным публикациям известно, что синтез гликопептидолипида микобактериями дает возможность представителям MABSc расти на питательных средах в S форме, тогда как его отсутствие позволяет расти микобактериям в R форме [93]. Кроме того, отмечено что, переход от S варианта к R варианту колоний возможно связан с развитием тяжелых инфекций, в том числе и у пациентов с МВ [39]. Для сравнения и определения возможного влияния на развитие заболевания наличия R или S колоний в посеве все высевы MABSc были разделены на 4 группы в зависимости от формы инфекционного процесса: 1 группа (8 штаммов) – штаммы MABSc, выделенные от пациентов обследуемых при подозрении на туберкулез, 2 группа (28 штаммов) – от больных с хроническим инфицированием до клинических проявлений, 3 группа (14 штаммов) – от хронически инфицированных пациентов с клиническими проявлениями микобактериоза, 4 группа (14 штаммов) – от пациентов с однократным высевом. При оценке типа колоний в зависимости от показателя формы инфекционного процесса на среде для выделения BCC не были получены статистически достоверные различия, результаты представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Анализ показателя формы колонии на среде для выделения ВСС в зависимости от показателя формы инфекционного процесса

Показатель	Категории	Количество штаммов (%)				p
		1	2	3	4	
R или S тип колоний	S колонии	3 (37,5)	14 (50,0)	5 (35,7)	9 (64,3)	0,056
	R колонии	4 (50,0)	4 (14,3)	7 (50,0)	1 (7,1)	
	Гетерогенная популяция	1 (12,5)	10 (35,7)	2 (14,3)	4 (28,6)	
различия статистически значимы при значении p <0,05 штаммы MABSc выделенные от: 1 – пациентов, обследуемых при подозрении на туберкулез; 2 – пациентов с хроническим инфицированием до клинических проявлений; 3 – хронически инфицированных пациентов с клиническими проявлениями; 4 – пациентов с однократным высевом						

Также был выполнен анализ зависимости формы колоний от формы инфекционного процесса на универсальной хромогенной среде. При оценке типа колоний в зависимости от показателя формы инфекционного процесса, были выявлены статистически значимые различия (p<0,001) (используемый метод: Хи-квадрат Пирсона). Результаты анализа представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Анализ показателя формы колонии на хромогенной среде в зависимости от показателя формы инфекционного процесса

Показатель	Категории	Количество штаммов (%)				p
		1	2	3	4	
R или S тип колоний	S колонии	2 (25,0)	21 (75,0)	2 (14,3)	5 (35,7)	<0,001* p_{2-3} = 0,003 p_{2-4} = 0,045 p_{3-4} = 0,045
	R колонии	2 (25,0)	2 (7,1)	7 (50,0)	0 (0,0)	
	Гетерогенная популяция	4 (50,0)	5 (17,9)	5 (35,7)	9 (64,3)	
* различия показателей статистически значимы (p<0,05) штаммы MABSc выделенные от: 1 – пациентов, обследуемых при подозрении на туберкулез; 2 – пациентов с хроническим инфицированием до клинических проявлений; 3 – хронически инфицированных пациентов с клиническими проявлениями; 4 – пациентов с однократным высевом						

Количество штаммов в S форме, выделенных на универсальной хромогенной среде от пациентов с хроническим инфицированием до клинических проявлений, достоверно выше, чем от хронически инфицированных пациентов с клиническими проявлениями и от больных с однократным высевом. Тогда как при хроническом инфицировании с клиническими проявлениями на универсальной хромогенной среде было обнаружено достоверно больше штаммов, которые растут в R форме. При этом у пациентов, обследованных однократно, не зарегистрирован рост колоний в R форме, все штаммы давали рост в виде либо S колоний, либо в S и R форме одновременно.

ГЛАВА 10. Влияние органической соли железа на продуктивность питательных сред для выделения *Mycobacterium abscessus* complex

Из литературных данных известно, что для культивирования НТМ возможно использование универсальных хромогенных сред, обладающих довольно высокой продуктивностью [10]. Однако благодаря своей универсальности на этих средах растут многие быстрорастущие бактерии. Пациенты с МВ являются уникальной группой с точки зрения наличия микробного разнообразия в верхних и нижних дыхательных путях. По этой причине использование универсальных хромогенных сред для микробиологической диагностики у этой когорты пациентов весьма ограничено, часть быстрорастущей флоры может подавлять рост других потенциально клинически значимых МО.

По этой причине для микробиологической диагностики необходимо использование селективных питательных сред. Одним из примеров таких сред является среда для выделения BCC (HiMedia, Индия), однако в отношении НТМ на них не всегда удается получить рост этой группы бактерий. Отчасти это связано с тем, что НТМ являются довольно прихотливыми МО, требующими наличия в составе питательных сред специальных дополнительных компонентов, например, железа.

Известно, что железо является эссенциальным фактором необходимым для роста микобактерий и является обязательным микроэлементом для их метаболизма как строгих аэробов. По этой причине нами была поставлена задача разработки питательной среды с добавлением соли железа, основой которой является среда для выделения BCC, при этом имеются определенные сложности с подбором концентрации, так как возможно ингибирование роста высокими концентрациями.

Для установления необходимой концентрации с целью повышения вероятности выделения представителей MABSc нами было проведено исследование, направленное на разработку питательной среды с добавлением различных концентраций железа в виде органической соли. Оценка эффективности среды осуществлялась согласно результатам продуктивности предлагаемой среды в сравнении со средами с содержанием других концентраций железа (III) гидроксида полимальтозата.

Продуктивность – количество клеток, давших видимый рост, выраженный в процентах по трем показателям: менее 50%, 50-69%, 70% и более от количества клеток в инокулюме. Для оценки продуктивности проведено сравнение роста 64 штаммов представителей MABSc. Из них выделено 56 штаммов (от пациентов с МВ) и 8 штаммов (от пациентов, обследованных при подозрении на туберкулез), рост которых получен на питательных средах с добавлением железа (III) гидроксида полимальтозата в концентрациях, соответствующих 80 мг, 160 мг, 240 мг, 320 мг и 400 мг. В качестве контрольной среды использовался агар для селективного выделения BCC без добавления железа (III) гидроксида полимальтозата и универсальная хромогенная среда.

После культивирования статистически достоверные различия (p<0,001, при расчете критерия используемый метод: Хи-квадрат Пирсона) были получены для штаммов, выросших на среде для выделения ВСС с концентрацией соли железа 240 мг по отношению к средам с концентрациями 80, 160, 320, 400 мг. Также были получены сопоставимые результаты для среды с концентрацией 240 мг и универсальной хромогенной среды и достоверные различия для варианта сравнения 240 мг – среда для выделения ВСС без добавления соли железа (p <0,001), результаты анализа представлены на рисунке 6.

На данных средах при исследовании выявлена максимальная продуктивность ≥70%, что позволяет использовать среду с концентрацией 240 мг соли железа для улучшения микробиологической диагностики инфицирования быстрорастущими видами НТМ у пациентов с МВ.

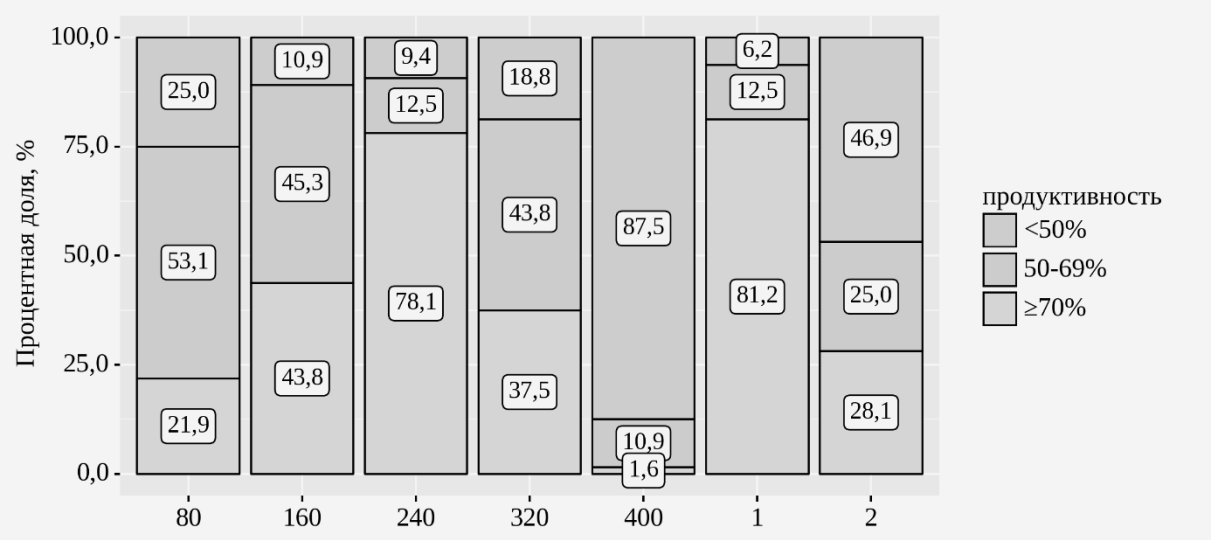


Рисунок 6 – Анализ продуктивности в зависимости от среды; при анализе показателя «продуктивность» в зависимости от показателя «среда/концентрация соли железа», были установлены статистически значимые различия (p<0,001) (используемый метод: Хи-квадрат Пирсона). 1 – универсальная хромогенная среда без добавления соли железа, 2 – среда для выделения ВСС без добавления соли железа; 80, 160, 240, 320, 400 – концентрация соли железа в питательной среде для выделения ВСС

Дополнительно получены достоверные различие между концентрациями 80 мг – 400 мг (p<0,001); 80 мг – универсальная хромогенная среда без добавления соли железа (p<0,001); 80 мг – среда для выделения ВСС без добавления соли железа (p= 0,018); 160 мг – 240 мг (p<0,001); 160 мг – 400 мг (p<0,001); 160 мг – универсальная хромогенная среда без добавления соли железа (p<0,001); 160 мг – среда для выделения ВСС без добавления соли железа (p<0,001); 320 мг – 400 мг (p<0,001); 320 мг – универсальная хромогенная среда без добавления соли железа (p<0,001), 320 мг – среда для выделения ВСС без добавления соли железа (p=0,016); 400 мг – универсальная хромогенная среда без добавления соли железа (p<0,001); 400 мг – среда для выделения ВСС без добавления соли железа

(p<0,001); универсальная хромогенная среда без добавления соли железа – среда для выделения ВСС без добавления соли железа (p<0,001).

Известно, что при микробиологической диагностике инфекционных осложнений у пациентов с МВ вызванных НТМ сроки инкубирования составляют от 7 до 14 суток. В нашем исследовании среди 56 штаммов, изолированных от пациентов с МВ рост 43 (76,8%) штаммов был выявлен в период до 14 суток что соответствует заявленным срокам, однако рост 13 (23,2%) штаммов регистрировался после 14 суток. Увеличение сроков выявления роста связано со многими причинами, в том числе это доступ и состав компонентов в питательной среде, а также применение антимикробной химиотерапии у пациентов, инфицированных представителями MABSc. Данный факт необходимо учитывать при микробиологической диагностике с целью повышения вероятности обнаружения MABSc в клиническом материале.

Дополнительно после проведении процедуры пересева выделенных микобактерий со среды для выделения ВСС на универсальную хромогенную среду возможно выявление диссоциации по культуральным свойствам MABSc на R и S формы колоний, что статистически достоверно коррелирует с формой инфекционного процесса. Переход от S варианта к R варианту колоний связан с развитием тяжелых инфекций, в том числе и у пациентов с МВ. При этом стоит отметить, что данная корреляция не выявлена при использовании среды для выделения ВСС.

Оптимизация лабораторной диагностики микобактериозов у пациентов с МВ возможна в том числе благодаря разработке и внедрению новых питательных сред в микробиологическую диагностику. В нашем исследовании отмечено, что добавление такого необходимого элемента для метаболизма микобактерий как железо в виде органической соли в определенных концентрациях позволило существенно повысить продуктивность среды для выделения ВСС. Возможно, данный факт позволит внедрить разработанную нами среду в регулярную микробиологическую диагностику биологического материала от пациентов с МВ. При этом не исключено вероятное влияние используемой среды на ключевой момент микробиологической диагностики – идентификацию выделенных МО.

ГЛАВА 11. Оценка возможностей идентификации представителей *Mycobacterium abscessus* complex с использованием различных питательных сред

Согласно Руководству по микробиологической диагностике инфекций дыхательных путей у пациентов с МВ описан перечень питательных сред, рекомендованных для выделения этиологически значимых МО, участвующих в развитии инфекционного процесса и респираторных осложнений [35]. Основными питательными средами, на которых возможно получение роста НТМ, согласно этому перечню, являются: кровяной агар с 5% дефибринированной кровью животных, шоколадный агар или кровяной агар с налидиксовой кислотой, а также селективные среды для выделения ВСС.

В зарубежной литературе также описаны варианты возможного выделения быстрорастущих НТМ при культивировании на селективной среде для выделения ВСС, которые используются при работе с материалом от пациентов с МВ [56]. В отечественной литературе имеются публикации, посвященные оценке возможности культивирования на агаризованных средах, включая универсальные хромогенные среды. По результатам этих работ применение универсальных хромогенных сред возможно для использования с целью выделения быстрорастущих НТМ [10].

В связи с этим было принято решение проанализировать и сравнить масс-спектры представителей MABSc, полученные при идентификации культур с использованием MALDI-ToF масс-спектрометрии. Данные процедуры проводились для штаммов, выращенных на универсальной хромогенной среде, содержащей триптофан и хромогены для выявления глюкуронидаз и галактозидаз и на селективной среде для выделения ВСС. Дополнительно проводилась оценка степени достоверности идентификации НТМ с перечисленных питательных сред. Эти результаты позволят оценить возможное использование хромогенной среды и среды для выделения ВСС с целью идентификации представителей MABSc методом MALDI-ToF масс-спектрометрии.

В библиотеке спектров НТМ для масс-спектрометров (Bruker Daltonik GmbH, Германия) представлены спектры, снятые со сред Левенштейна-Йенсена и Миддлбрука. При этом для получения качественных спектров необходимо подвергнуть имеющиеся культуры НТМ определенным процедурам пробоподготовки. Они реализуются с помощью двух стандартных протоколов: метода расширенного прямого нанесения и метода экстракции муравьиной кислотой. Однако ввиду того, что протокол с использованием метода экстракции муравьиной кислотой требует пролонгированного этапа пробоподготовки, в нашей работе идентификация и снятие спектров проводились с использованием метода расширенного прямого нанесения, так как этот метод является наиболее оптимальным с точки зрения времени и трудозатрат, необходимых для видовой идентификации представителей MABSc.

Стоит отметить, что в научных работах, посвященных идентификации НТМ, имеются данные о том, что определение видовой принадлежности представителей

MABSc проводится с использованием метода экстракции культур, выращенных на среде Левенштейна-Йенсена, но возможно и использование метода расширенного прямого нанесения микобактерий, рост которых был получен на универсальной хромогенной среде. Так, в некоторых, работах, посвященных оптимизации идентификации НТМ, выделенных из клинического материала было отмечено, что при идентификации *M.abscessus,* выращенных на среде Левенштейна-Йенсена и универсальной хромогенной среде степень достоверности идентификации является сопоставимой [10]. Однако в этих работах не описаны данные по проведению сравнения универсальной хромогенной среды с селективной средой необходимой для выделения ВСС, используемых при микробиологической диагностике у пациентов с МВ.

ГЛАВА 12. Сравнение масс-спектров, полученных при идентификации MALDI-ToF масс-спектрометрией представителей *Mycobacterium abscessus* complex, выращенных на различных питательных средах

Всего в исследовании были получены спектры, снятые с 64 штаммов представителей MABSc, из которых 8 штаммов получены от пациентов с легочной патологией, не связанной с МВ. Все штаммы были выращены на хромогенной среде и селективной среде для выделения ВСС. Посевы инкубировались в течение 24 часов при температуре 37°С, после этого при 28°С в последующие дни культивирования до появления видимого роста, необходимого и достаточного для проведения идентификации.

При этом следует отметить, что все штаммы, полученные от пациентов с МВ, были выделены при первичном посеве и пролонгированном культивировании до 28 суток на среде для выделения ВСС; штаммы, полученные от пациентов с легочной патологией, не связанной с МВ, первично были выделены на среде Левенштейна-Йенсена.

Дополнительно был проведен анализ сравнения результатов идентификации MABSc с использованием основной библиотеки спектров, в которой находятся спектры 2 штаммов *M. abscessus,* с библиотекой дополнительных спектров НТМ (Mycobacteria Library версия 4.0, Bruker Daltonik GmbH, Германия) в которой содержатся 880 спектров микобактерий, из которых 36 принадлежат *M. abscessus*. Анализ полученных масс-спектров проводился с использованием программного обеспечения масс-спектрометра Microflex LT (Bruker Daltonik GmbH, Германия).

В начале нашего исследования были получены спектры штаммов *MABSc,* выращенных на среде для выделения ВСС. При использовании основной библиотеки в 9 (14%) случаях не удалось провести определение видовой и родовой принадлежности бактерий. Были ориентировочно идентифицированы штаммы с низкими значениями коэффициента совпадения Score МО, не относящиеся к НТМ. Среди возможных вариантов результата идентификации были представители родов *Streptomyces, Pseudarthrobacter, Lactobacillus.* Данный факт подтверждает необходимость точной видовой идентификации, микроорганизмов, выросших на ВСС от пациентов с МВ, в частности использование дополнительных приемов подготовки выросших культур для идентификации методом MALDI-ToF масс-спектрометрии, а также другие варианты определения таксономической принадлежности, однако это не всегда возможно с точки зрения технического оснащения лаборатории.

Для оценки возможности получения более приемлемых результатов идентификации культур MABSc, выросших на ВСС, была использована специализированная библиотека (Mycobacteria Library версия 4.0), в которой внесены спектры НТМ. С целью оценки статистической значимости влияния среды для выделения ВСС на показатели Score в зависимости от выбранной библиотеки был проведен расчет p-value для критерия Манна-Уитни, результаты которого приведены в таблице 12.

Таблица 12 – Результаты сравнения значений уровня коэффициента совпадения Score между библиотеками со спектрами MABSc, выращенных на среде для выделения BCC

Библиотека	Me	$Q_1 – Q_3$	n	min	max	p
Основная библиотека	1,676	1,474 – 1,791	64	1,250	2,036	0,016*
Mycobacteria Library версия 4.0	1,765	1,592 – 1,883	64	1,247	2,202	
* – различия показателей статистически значимы $p<0,05$ Me – медианное значение количества колоний; $Q_1 – Q_3$ – 25 квантиль и 75 квантиль; n – количество штаммов; min, max – минимальное и максимальное количество колоний соответственно						

Согласно полученным результатам при сравнении показателя уровня коэффициента совпадения Score в зависимости от выбранной библиотеки были выявлены статистически достоверные различия. При использовании библиотеки Mycobacteria Library версия 4.0 идентификация прошла достоверно лучше, чем с основной библиотекой. Несмотря на полученные данные, следует отметить, что даже при использовании дополнительной библиотеки масс-спектров для штаммов MABSc, выросших на селективной среде для BCC, достоверность видовой идентификации была низкой.

Дополнительно было проведено разделение идентифицируемых штаммов на группы по уровням достоверности идентификации, которые представлены в таблице 13. В случае идентификации с использованием основной библиотеки высокодостоверная идентификация до рода (Score 1,700-1,999) была выявлена в 42,1% случаев по сравнению с 57,8% случаев при идентификации с использованием библиотеки, содержащей дополнительные штаммы НТМ.

Таблица 13 – Сравнение значений уровня коэффициента совпадения Score между библиотеками со спектрами MABSc выращенных на среде для выделения BCC

Уровень коэффициента (Score)	Основная библиотека	Mycobacteria Library версия 4.0
0,000-1,699	35	25
1,700-1,999	27	37
2,000-2,999	2	2

В научных работах были описаны данные о том, что хромогенные среды можно использовать для получения большего количества пиков в масс-спектрах, и соответственно, проводить сопоставимую идентификацию с культурами,

выросшими на среде Левенштейна-Йенсена. По этой причине мы решили сравнить насколько достоверна идентификация представителей MABSc со среды для выделения ВСС с универсальной хромогенной средой.

На первом этапе для реализации этой цели после проведения идентификации штаммов, выращенных на селективной среде для ВСС, была проведена оценка идентификации с использованием двух библиотек культур, выросших на хромогенной среде. Для оценки статистической значимости влияния хромогенной среды на показатели Score в зависимости от используемой библиотеки масс-спектров был проведен расчет p-value для критерия Манна-Уитни, результаты расчета которого приведены в таблице 14.

Таблица 14 – Результаты сравнения значений коэффициента совпадения Score между библиотеками со спектрами, идентифицированных представителей MABSc с хромогенной среды

Библиотека	Me	$Q_1 – Q_3$	n	min	max	p
Основная библиотека	1,942	1,878 – 2,012	64	1,531	2,098	<0,001*
Mycobacteria Library версия 4.0	2,018	1,938 – 2,098	64	1,632	2,463	
* – различия показателей статистически значимы p<0,05 n – количество штаммов; Me – медианное значение количества колоний; $Q_1 – Q_3$ – 25 квантиль и 75 квантиль; min, max – минимальное и максимальное количество колоний, соответственно						

В соответствии с представленной таблицей при сравнении показателя уровня коэффициента совпадения Score в зависимости от используемой библиотеки нами были выявлены статистически значимые различия, подтверждающие факт того, что идентификация с использованием библиотеки Mycobacteria Library версия 4.0 была достоверно лучше в сравнении с основной библиотекой.

Дополнительно было проведено разделение на группы по уровням достоверности идентификации штаммов, выращенных на хромогенной среде, результаты представлены в таблице 15. В случае идентификации с использованием основной библиотеки идентификация до рода – (Score 1,700-1,999) была выявлена в 64,0% случаев по сравнению с 39,0% случаев идентификации с использованием библиотеки содержащей дополнительные штаммы НТМ. При этом идентификация до вида – (Score 2,000-2,999) выявлена в 29,7% случаев и в 59,4% случаев идентификации с использованием основной библиотеки и библиотеки Mycobacteria Library версия 4.0, соответственно.

Таблица 15 – Сравнение значений уровня коэффициента совпадения Score между библиотеками со спектрами MABSc выращенных на хромогенной среде

Уровень коэффициента (Score)	Основная библиотека	Mycobacteria Library версия 4.0
0,000-1,699	4	1
1,700-1,999	41	25
2,000-2,999	19	38

На втором этапе после проведения статистического анализа результатов идентификации представителей MABSc отдельно на среде для выделения BCC и отдельно на хромогенной среде мы провели сравнение результатов идентификации с использованием основной библиотеки, а в дальнейшем сравнение результатов идентификации и при использовании дополнительной библиотеки Mycobacteria Library версия 4.0. Для оценки статистической значимости влияния используемых сред на показатели Score при работе с основной библиотекой был проведен расчет p-value для критерия Манна-Уитни, результаты вычислений приведены на рисунке 7.

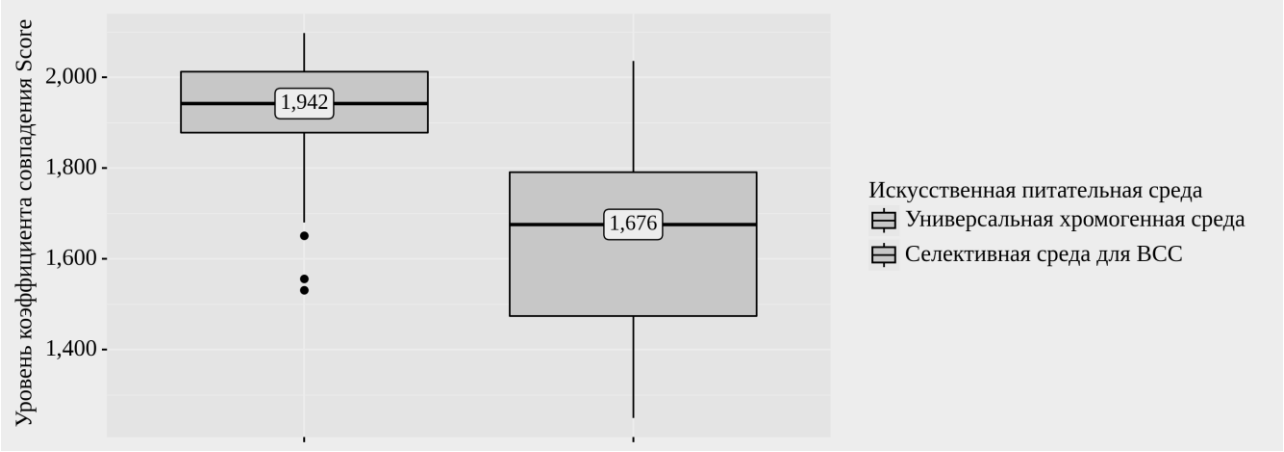


Рисунок 7 – Анализ показателя уровня коэффициента совпадения Score в зависимости от показателя используемые питательные среды; различия показателей статистически значимы (p<0,05)

В соответствии с полученными данными при анализе показателя уровня коэффициента совпадения Score в зависимости от используемой среды, были установлены существенные различия (p<0,001) (используемый метод: U-критерий Манна-Уитни). Использование хромогенной среды для идентификации показали

результаты достоверно выше в сравнении с результатами идентификации со среды для выделения ВСС при работе с основной библиотекой.

Далее для определения статистической значимости влияния используемых сред на показатели Score с использованием библиотеки Mycobacteria Library версия 4.0, был проведен расчет p-value для критерия Манна-Уитни, результаты приведены на рисунке 8.

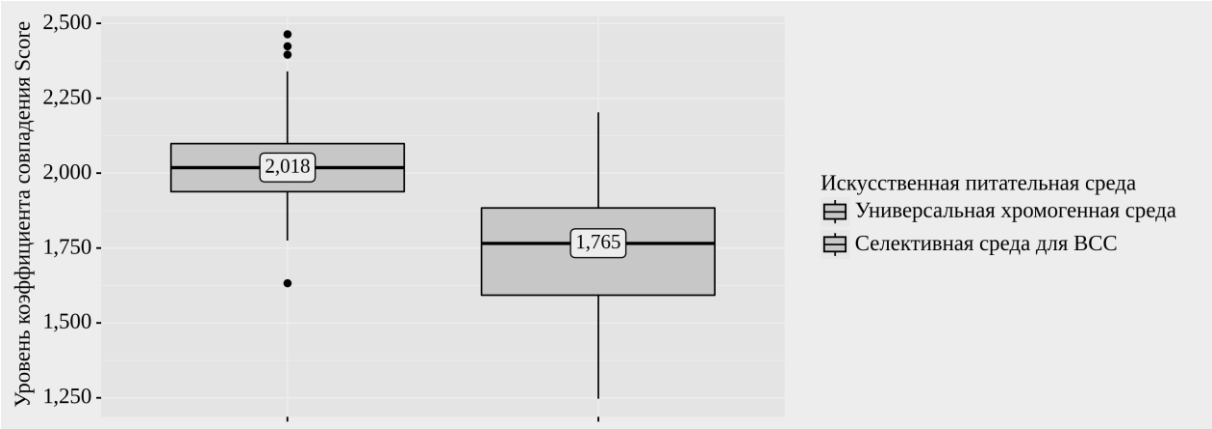


Рисунок 8 – Результат сравнительного анализа показателя уровня коэффициента совпадения Score в зависимости от показателя используемых питательных сред при идентификации с использованием библиотеки Mycobacteria Library версия 4.0; различия показателей статистически значимы (p<0,05)

Таким образом, согласно проведенному анализу при оценке показателя Score в зависимости питательной среды и идентификации с использованием библиотеки с дополнительными спектрами нами были установлены статистически значимые различия (p<0,001) (используемый метод: U-критерий Манна-Уитни). Идентификация с применением библиотеки Mycobacteria Library версия 4.0 штаммов, выращенных на хромогенной среде, оказалась достоверно выше в сравнении с идентификацией, проведенной на среде для выделения ВСС.

ГЛАВА 13. Сравнительный анализ характеристик масс-спектров представителей *Mycobacterium abscessus* complex, выращенных на различных питательных средах

На сегодняшний день известно, что идентификация микроорганизмов методом MALDI-ToF масс-спектрометрии заключается в сравнении масс-спектров исследуемого образца с эталонными спектрами, которые находятся в базе данных (библиотеке) того или иного прибора [142]. Результаты идентификации, как уже описывалось ранее, следуют из определения уровня коэффициента совпадения Score. Наряду с этим качество идентификации косвенно зависит от количества пиков и их характеристик каждого анализируемого МО. В научных публикациях отмечено также, что количество пиков в масс-спетров исследуемых бактерий зависит от длительности культивирования и используемой при этом питательной среды. По это причине была поставлена задача проанализировать количество пиков с двух сред: универсальной хромогенной среды, содержащей триптофан и хромогены для выявления глюкуронидаз и галактозидаз; и селективной среды для ВСС. Для реализации этой цели мы провели количественную оценку результатов получения пиков с двух питательных сред. Для оценки достоверности полученных различий между количеством пиков в масс-спектре, полученных со среды для выделения ВСС и хромогенной среды, был рассчитан критерий Манна-Уитни, результаты представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Результаты описательной статистики количества полученных пиков в зависимости от среды

Наименование среды	Me	$Q_1 – Q_3$	n	min	max	p
Среда для выделения ВСС	46	41 – 53	64	26	68	<0,001*
Хромогенная среда	63	56 – 68	64	33	89	

* – различия показателей статистически значимы p<0,05
Me – медианное значение количества пиков в масс-спектре; $Q_1 – Q_3$ – 25 квантиль и 75 квантиль; n – количество штаммов; min, max – минимальное и максимальное количество пиков в масс-спектре соответственно

Таким образом, согласно расчетам, при оценке показателя количества полученных пиков в зависимости от среды, были выявлены статистически значимые различия (p<0,001) (используемый метод: U–критерий Манна–Уитни). Для всех тестируемых штаммов количество пиков на хромогенной среде достоверно больше, чем на среде для выделения ВСС.

В связи с тем, что по результатам наших исследований по продуктивности питательных сред среда для выделения ВСС с железом оказалась достоверно выше, чем без добавления железа мы решили оценить возможность ее использования и влияние на идентификацию представителей MABSc. Для ее

реализации был проведен статистический анализ при сравнении 3 используемых нами сред: хромогенной среды, селективной среды для выделения ВСС и среды для выделения ВСС с железом. Результаты описательной статистики количества пиков для штаммов на среде с железосодержащей добавкой представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Результаты описательной статистики количества полученных пиков для штаммов на среде с железосодержащей добавкой

Показатели	Me	$Q_1 – Q_3$	n	min	max
селективная среда для ВСС с железом	54	46 – 60	64	33	71
Me – медианное значение количества пиков; $Q_1 – Q_3$ – 25 квантиль и 75 квантиль; n – количество штаммов; min, max – минимальное и максимальное количество пиков соответственно					

После этого была проведен сравнительный анализ используемой среды на пики, полученные при проведении идентификации, результаты которого представлены на рисунке 9.

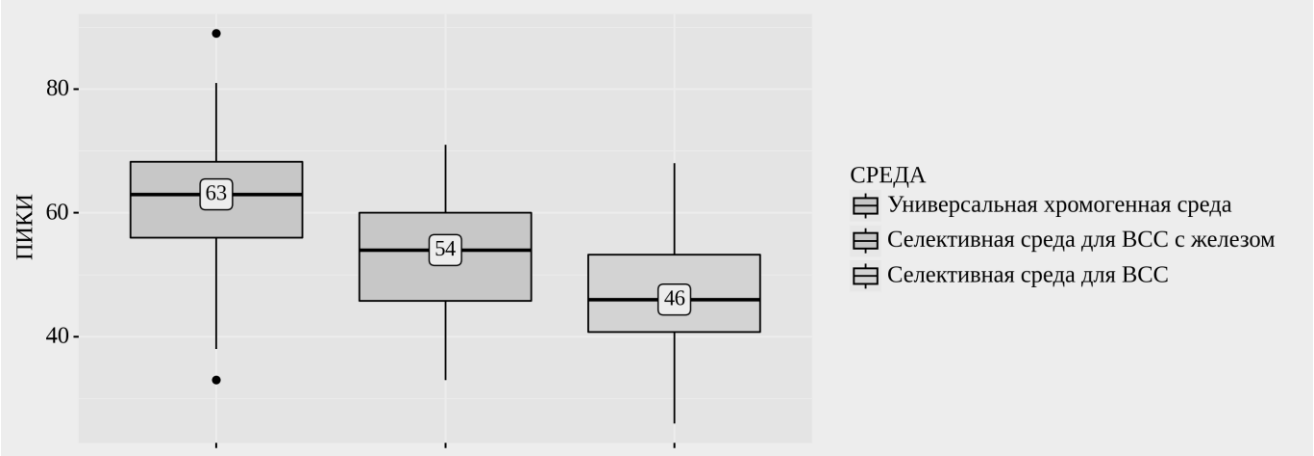


Рисунок 9 – Сравнительный анализ полученных пиков с различных питательных сред, были установлены статистически значимые различия (p<0,05) (используемый метод: Критерий Краскела–Уоллиса)

Согласно результатам сравнения полученных пиков при использовании различных питательных сред были установлены существенные различия: количество пиков снятых с селективной среды для ВСС с железом – универсальной хромогенной среды p<0,001, селективной среды для ВСС – универсальной хромогенной среды p<0,001, селективной среды для ВСС – селективной среды для ВСС с железом p=0,002. Эти данные свидетельствуют о том, количество пиков, полученных со среды для выделения ВСС с железом достоверное больше, чем со среды для выделения ВСС без добавления железа, однако меньше, чем с хромогенной среды.

Несмотря на то, что мы получили достоверные различия по количеству пиков и среда для ВСС с железом показала достоверно более высокие результаты по количеству пиков в сравнении со средой для выделения ВСС, возник закономерный вопрос о влиянии разработанной нами среды на значение Score. Результаты проведенного анализа отображены в таблице 18.

Таблица 18 – Результаты описательной статистики влияния питательной среды на значение Score

Показатели	Me	$Q_1 – Q_3$	n	min	max
Хромогенная среда	2,018	1,938 – 2,098	64	1,632	2,463
Среда для выделения ВСС с железом	1,830	1,680 – 1,896	64	1,311	2,436
Среда для выделения ВСС	1,765	1,592 – 1,883	64	1,247	2,202
Me – медианное значение количества пиков; Q1 – Q3 – 25 квантиль и 75 квантиль; n – количество штаммов; min, max – минимальное и максимальное количество пиков соответственно					

Для оценки достоверности различий, полученных данных, был рассчитан Критерий Краскела–Уоллиса, результаты которого отражены на рисунке 10.

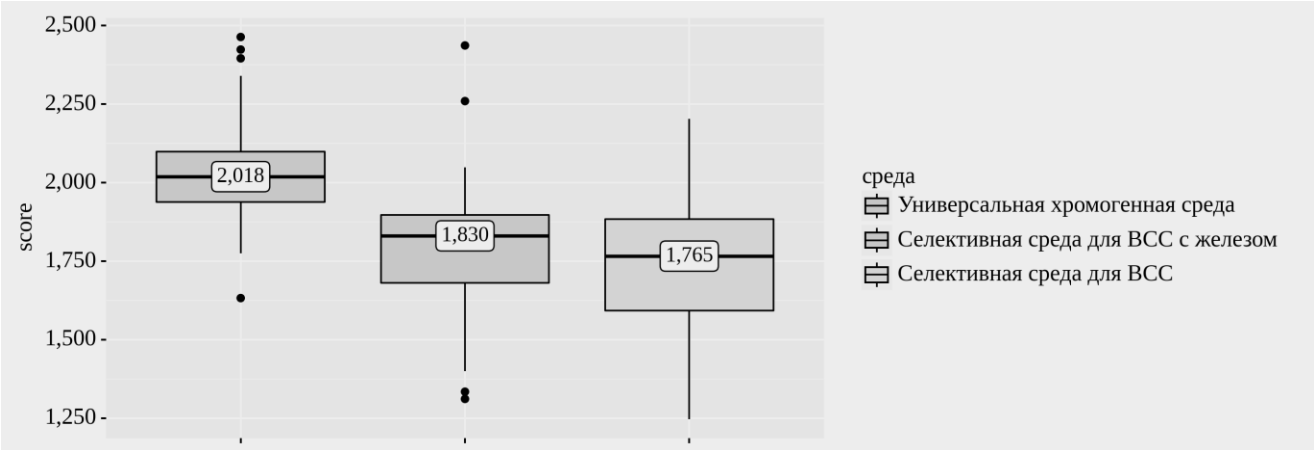


Рисунок 10 – Анализ значения Score в зависимости от питательной среды (различия показателей статистически значимы (p<0,05)) (используемый метод: Критерий Краскела–Уоллиса)

Согласно проведенным расчетам, достоверные различия были получены между: селективная среда для ВСС с железом – универсальная хромогенная среда p<0,001 и селективная среда для ВСС – универсальная хромогенная среда p<0,001. Несмотря на то, что со среды для выделения ВСС с железом было получено большее количество пиков, чем со среды без добавки, значения Score оказались сопоставимы и достоверных различий не выявлено.

ГЛАВА 14. Возможности использования MALDI-ToF масс-спектрометрии для проведения типирования представителей *Mycobacterium abscessus* complex и сравнение с результатами секвенирования ДНК

Дополнительно возможности технологии MALDI-ToF масс-спектрометрии позволяют проводить более глубокое изучение штаммов различных МО. Это возможно, при помощи программы MALDI Biotyper 3.0 Offline Classification, которая используется для дополнительного исследования масс-спектров. При работе с программой нами было выявлено наличие микстов представителей MABSc с другими НТМ в нескольких случаях. Штаммы MABSc в анализируемых образцах находились в миксте с *M. saopaulense* в 5 случаях и в 1 случае – совместно с *M. immunogenum*. Следует учитывать, что данный факт возможен в связи с тем, что идентифицированные МО схожи между собой и являются близкородственными с представителями MABSc [81, 129, 146]. Именно по этой причине данные результаты необходимо подтверждать дополнительными методами исследования, потому что имеется определенная вероятность наблюдать в этих случаях действительное наличие микстов с представителями MABSc. В этом случае при идентификации НТМ из abscessus-chelonae group следует использовать дополнительные методы микробиологических исследований; также именно представители MABSc имеют доказанное клиническое значение у пациентов с МВ в отличие от остальных представителей группы.

Следующим этапом нашего исследования было проведение дополнительной идентификации части выросших культур с использованием метода экстракции муравьиной кислотой с целью типирования представителей MABSc. Для части культур было проведено секвенирования для определения подвида представителей MABSc. Результаты данного исследования представлены в таблице 19.

Всего было выполнено секвенирование 25 штаммов представителей MABSc. Из них с использованием масс-спектрометрии не удалось провести определения подвида 6 штаммов (24,0%), выращенных на питательных средах. С хромогенной среды удалось определить подвид 15 штаммов (60,0%), со среды для выделения ВСС – у 13 штаммов (52,0%). Из них результаты определения подвида у штаммов, выращенных на хромогенной среде, совпали с результатами секвенирования у 13 (86,6%) штаммов из 15. Результаты определения подвида у штаммов, выращенных на среде для выделения ВСС, совпали у 10 (76,9%) из 13 штаммов. При этом статистически достоверных различий выявлено не было.

Таблица 19 – Сравнение результатов определения подвида представителей MABSc, выделенных на разных питательных средах с исползованием MALDI-ToF масс-спектрометрии и сравнение с результатами секвенирования

№ штамма	Наименование подвида *M. abscessus* subsp.		
	Универсальная хромогенная среда	Среда для выделения *BCC*	Секвенирования по Сэнгеру *rpoB+hsp65*
1	-	-	*abscessus*
2	*abscessus*	*abscessus*	***bolletii***
3	-	-	*abscessus*
4	-	-	*abscessus*
5	*abscessus*	*abscessus*	*abscessus*
6	-	*abscessus*	*abscessus*
7	*abscessus*	-	*abscessus*
8	*abscessus*	-	*abscessus*
9	-	*abscessus*	*abscessus*
10	*abscessus*	-	*abscessus*
11	***abscessus***	-	***massilense***
12	*abscessus*	*abscessus*	*abscessus*
13	*abscessus*	*abscessus*	*abscessus*
14	*abscessus*	-	*abscessus*
15	-	-	*abscessus*
16	-	*abscessus*	*abscessus*
17	*abscessus*	***bolletii***	*abscessus*
18	*abscessus*	*abscessus*	*abscessus*
19	-	*abscessus*	*abscessus*
20	*massilense*	-	*abscessus*
21	*abscessus*	*abscessus*	*abscessus*
22	*abscessus*	*abscessus*	*abscessus*
23	*abscessus*	***bolletii***	*abscessus*
24	-	-	*abscessus*
25	-	-	*abscessus*

Таким образом, было выявлено, что на результаты определения подвида представителей MABSc с использованием масс-спектрометрии влияет вид среды, на которой были выращены микобактерии. По этой причине необходима разработка протоколов культивирования для повышения подвидового определения у представителей MABSc. Использование MALDI-ToF масс-спектрометрии на данный момент не позволяет должным образом проводить подвидовую идентификацию представителей MABSc.

Технология MALDI-ToF масс-спектрометрии уже довольно длительный период находится на вооружении лабораторий микробиологического профиля и с

тех пор зарекомендовала себя как надежный инструмент для идентификации различных МО в том числе и микобактерий. Качество идентификации при использовании данного метода во многом зависит от состава микробной клетки и микобактерии в этом отношении являются довольно сложной группой патогенов. При этом особенности масс-спектров штамма отчасти зависит и от состава питательной среды, на которой происходит его культивирование. В нашем исследовании были проанализированы значения уровня коэффициента совпадения Score и количество пиков, полученных при идентификации представителей MABSc с универсальной хромогенной среды, среды для выделения BCC и со среды для выделения BCC с железом. В процессе изучения были получены достоверные различия между анализируемыми средами: хромогенная среда оказалась наиболее эффективной по количеству пиков и значениям Score полученным при идентификации представителей MABSc.

Однако благодаря своей универсальности с точки зрения наличия компонентов, необходимых для роста и размножения бактерий, ее использование при микробиологической диагностике материала, выделенного от пациентов с МВ весьма ограничено. Именно по этой причине довольно актуально применение селективных сред в том числе среды для выделения BCC. При этом добавление железа существенно повысило ее продуктивность, но оставалось неизвестным как это дополнение повлияет на качество идентификации. По результатам наших исследований стало понятно, что количество полученных пиков со среды с добавлением железа достоверно выше, чем без него, только на значении Score идентифицируемых МО это не отразилось.

Таким образом, согласно проведенным исследованиям разработанная нами среда для выделения представителей MABSc из клинического материала от пациентов с МВ показала более высокие показатели Score, полученные при идентификации с использованием библиотеки Mycobacteria Library версия 4.0 MALDI-ToF масс-спектрометра, что подтвержжает ее использование при диагностике микобактериозов у пациентов с МВ. При этом после первичного посева исследуемого материала и выделения на разработанной нами среде представителей MABSc с последующей их идентификацией, необходимо проводить пересев микобактерий на хромогенную среду для оценки культуральных свойств и повышения качества видовой идентфикации.

ГЛАВА 15. Анализ масс-спектров штаммов *Mycobacterium abscessus* complex, выделенных от пациентов с муковисцидозом при хроническом инфицировании

Довольно часто в случае выделения НТМ из клинического материала имеются трудности с верификацией диагноза. Это связано с тем, что НТМ являются естественными обитателями окружающей среды и поэтому необходимо дифференцировать транзиторную колонизацию от заболевания. Согласно критериям Европейского общества кистозного фиброза по лечению микобактериоза у пациентов с кистозным фиброзом (2016) и рекомендациям, подготовленным специалистами ATS/ERS/ESCMID/IDSA (2020), постановка диагноза микобактериоз проводится в случае соответствия клинической картины этого заболевания с лабораторными критериями, из которых наличие возбудителя в биологическом материале имеет ключевое значение. Для микробиологической верификации диагноза микобактериоза НТМ должны быть выделены в ≥ 2 образцах при культуральном исследовании мокроты, собранной с интервалом в 1 неделю или более [156].

Эти критерии были установлены именно в таком формате по причине того, что зачастую наличие НТМ в исследуемом материале не всегда свидетельствует о наличии заболевания. В случае выделения НТМ из в норме стерильных участков макроорганизма оценка их клинического значения и возможное участие в том или ином инфекционном процессе не вызывает сложностей. Довольно часто благодаря особенностям экологии данной группы микроорганизмов их присутствие в клиническом материале может свидетельствовать о наличии возможной контаминации или транзиторной колонизации, но не заболевания. Особенно это актуально в случае выделения из мокроты или из материала, полученного с верхних дыхательных путей. С другой стороны, остается открытым вопрос об оценке клинического значения выделения MABSc со слизистых оболочек верхних дыхательных путей у пациентов из групп риска по развитию микобактериозов, к которым, в частности, относится и МВ.

Известно, что для сохранения своей популяции бактерии, которые продолжительное время находятся в изменяющихся условиях окружающей среды, способны к формированию гетерогенных популяций. При этом значение фенотипической гетерогенности в популяции бактерий имеет одно из ключевых значений с точки зрения формирования механизмов приспособления к постоянно меняющимся условиям обитания, в том числе и в организме человека [2]. Организация таких условий возможна при определенных длительно текущих инфекционных процессах в макроорганизме, примером такого заболевания является МВ.

Технология MALDI-ToF масс-спектрометрии имеет довольно широкое применение в области микробиологии. Помимо проведения видовой идентификации, возможно проведение более глубокого анализа масс-спектров рибосомальных белков микроорганизмов с использованием соответствующего программного обеспечения. Данные приемы можно применять и для выявления гетерогенности МО с помощью протеомного анализа

ГЛАВА 16. Анализ значений составного индекса корреляции у пациентов с повторными высевами *Mycobacterium abscessus* complex

В нашем исследовании была проведен анализ масс-спектров штаммов представителей MABSc, выделенных от пациентов с хроническим инфицированием. Оценка полученных масс-спектров проводилась с использованием программ flexAnalysis 3.0 и MALDI Biotyper 3.0 Offline Classification (Bruker Daltonik GmbH, Германия).

В работе были исследованы штаммы, выделенные из клинического материала пациентов с МВ, у которых рост НТМ был получен более 2 раз с интервалом в 1 неделю и более. Всего в группу таких пациентов вошли 7 больных с МВ. Общее количество штаммов, выделенных от пациентов составило 42. При этом у пациентов № 3, 4, 5 и 6 имелись микробиологические, клинические и/или рентгенологические признаки микобактериоза легких, у остальных пациентов был отмечен только неоднократный высев представителей MABSc.

Для анализируемых штаммов было проведено определение однородности популяции по масс-спектрам MABSc, изолированных от одного пациента. Выполнялась оценка сродства штаммов MABSc, выделенных от пациентов с хроническим высевом. Проведен сравнительный анализ имеющихся масс-спектров с использованием статистических расчетов и визуального отображения в программе MALDI Biotyper 3.0 с помощью расчета составного индекса корреляции – Composite Correlation Index (CCI). При использовании данного метода возможно установление степени совпадения штаммов от полного – темно-красный цвет, до полного отсутствия совпадения – темно-синий цвет. Значение CCI Score 1 свидетельствует о полном соответствии между масс-спектрами, значение 0 – показывает полное различие анализируемых спектров.

Для каждого описываемого пациента с высевами штаммов MABSc были построены CCI матрицы и таблицы, в которых отражены соответствующие количественные значения CCI Score от 0 до 1.

Для анализа динамики изменений масс-спектров штаммы располагали в хронологическом порядке по оси ординат (вертикальной линии) снизу-вверх, по оси абсцисс (горизонтальной линии) слева направо. При построении CCI матриц использовали контрольный штамм, выделенный от пациента без бронхолегочной патологии и не имеющий сродства с анализируемыми штаммами. Пары штаммов с показателями CCI Score более 0,800 считали близкородственными по результатам анализа масс-спектров в соответствии с рекомендациями производителя программного обеспечения.

При визуальном анализе CCI матрица в виде «тепловой карты» для штаммов, выделенных от пациента №1, была выявлена гетерогенность масс-спектров. Числовые значения CCI Score представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Результаты построения CCI матрицы в числовых значениях пациента №1, К – контрольный штамм

0,387	0,449	0,550	1	**К**
0,710	0,796	1	0,550	**3**
0,764	1	0,796	0,449	**2**
1	0,764	0,710	0,387	**1**
1	**2**	**3**	**К**	

Анализ CCI матриц 3 штаммов MABSc, выделенных от пациента №1, полученных в период с 2017 по 2018 из мокроты и МЗСГ, представлен в Приложении 2.

При анализе динамических изменений штаммов от пациента №1 выявлено отсутствие однородности выделенных культур. CCI Score всех пар штаммов оказался меньше 0,800, при этом максимальные значения были выявлены между штаммами 2 и 3 (0,796). Значение CCI Score между первым и последним штаммом составляет 0,710. Важно отметить, что соответствующие данные о гетерогенности группы MABSc пациента №1 были выявлены и при оценке культуральных свойств. Анализ CCI матриц 7 штаммов MABSc, выделенных от пациента №2, полученных в период с 2018 по 2020 годы из мокроты представлен в Приложении 2.

При визуальном анализе CCI матрица в виде «тепловой карты» для штаммов, выделенных от пациента №2, гетерогенность масс-спектров менее выражена. Числовые значения CCI Score представлены в таблице 21.

Таблица 21 – Результаты построения CCI матрицы в числовых значениях пациента №2, К – контрольный штамм

0,446	0,015	0,477	0,592	0,500	0,611	0,581	1	**К**
0,696	0,709	**0,865**	0,549	**0,864**	0,504	1	0,581	**7**
0,712	0,641	0,454	**0,903**	0,495	1	0,504	0,611	**6**
0,752	0,755	**0,950**	0,560	1	0,495	**0,864**	0,500	**5**
0,778	0,695	0,539	1	0,560	**0,903**	0,549	0,592	**4**
0,705	0,725	1	0,539	**0,950**	0,454	**0,865**	0,477	**3**
0,851	1	0,725	0,695	0,755	0,641	0,709	0,015	**2**
1	**0,851**	0,705	0,778	0,752	0,712	0,696	0,446	**1**
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**К**	

При анализе динамических изменений изолированных штаммов от пациента №2 выявлено отсутствие безусловной однородности всей исследуемой популяции, однако для отдельных пар штаммов были выявлены высокие уровни значений CCI Score. CCI Score 1 и 2 штамма составил (0,851), это свидетельствует об их высоком сродстве, при этом близкими данные штаммы являются только по отношению к друг другу, но не к другим выделенным позднее штаммам. 3 штамм

является пограничным и отделяет все выделенные штаммы на 2 группы, возможно на этой стадии произошли изменения в масс-спектрах, и появилась вторая популяция НТМ. CCI Score пары 3 штамма с 7 штаммом составил (0,865) и с 5 штаммом (0,950), что свидетельствует о практически полном совпадении масс-спектров. CCI Score пары 4 и 6 штамма (0,903); 5 штамм помимо совпадения с 3 штаммом является близкородственным с 7 штаммом (0,864).

Проводя исследования CCI матрица в виде «тепловой карты» для штаммов, выделенных от пациента №3, отмечена гетерогенность масс-спектров штаммов. Числовые значения CCI Score представлены в таблице 22.

Таблица 22 – Результаты построения CCI матрицы в числовых значениях пациента №3, К – контрольный штамм

0,366	0,360	0,509	0,503	0,373	0,406	1	**К**
0,798	**0,808**	0,720	0,742	0,762	1	0,406	**6**
0,842	**0,907**	0,784	**0,861**	1	0,762	0,373	**5**
0,819	**0,833**	**0,850**	1	**0,861**	0,742	0,503	**4**
0,708	0,731	1	**0,850**	0,784	0,720	0,509	**3**
0,893	1	0,731	**0,833**	**0,907**	**0,808**	0,360	**2**
1	**0,893**	0,708	**0,819**	**0,842**	0,798	0,366	**1**
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**К**	

От пациента №3 с 2018 по 2019 годы было выделено 6 штаммов из мокроты, результаты анализа CCI матрицы представлены в Приложении 2.

Изучение динамики изменений масс-спектров с помощью построения CCI матрицы позволяет сделать следующие выводы: 1 выделенный штамм высоко идентичен со 2 штаммом (0,893), с 4 (0,819) и с 5 штаммом, а также относительно близок с 6 штаммом (0,798); 2 штамм также близок по CCI Score с 4 (0,833), с 5 (0,907) и в отличие от 1 штамма более близок с 6 штаммом (0,808). Однако 3 штамм структурно отличим от остальных анализируемых штаммов и не образует близкородственных связей ни с одним штаммом, кроме 4 штамма (0,850). Дополнительно 4 штамм образует пары с высоким CCI Score помимо пары с первыми тремя штаммами с 5 штаммом (0,861).

От пациента №4 в период с 2018 по 2019 годы было изолировано 7 штаммов представителей MABSc. Результаты построения CCI матрицы штаммов, выделенных из мокроты от пациента №4, представлены на Приложении 2.

Анализ CCI матрица в виде «тепловой карты» для штаммов, выделенных от пациента №4, позволил нам выявить различия между выделенными штаммами согласно масс-спектрам МО. Числовые значения CCI Score представлены в таблице 23.

Таблица 23 – Результаты построения CCI матрицы в числовых значениях пациента №4, К – контрольный штамм

0,424	0,461	0,458	0,618	0,641	0,331	0,590	1	**К**
0,671	0,665	0,694	0,618	0,633	0,628	1	0,590	**7**
0,776	0,761	0,783	0,679	0,672	1	0,628	0,331	**6**
0,673	0,693	0,731	**0,805**	1	0,672	0,633	0,641	**5**
0,807	**0,809**	0,764	1	**0,805**	0,679	0,618	0,618	**4**
0,916	**0,926**	1	0,764	0,731	0,783	0,694	0,458	**3**
0,899	1	**0,926**	**0,809**	0,693	0,761	0,665	0,461	**2**
1	**0,899**	**0,916**	**0,807**	0,673	0,776	0,671	0,424	**1**
1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**К**	

Таким образом, первые три штамма являются близкородственными, согласно CCI Score: пара 1 и 2 штамма (0,899), 1 и 3 штамма (0,916), и 3 штамм и 2 (0,926). 4 штамм у данного пациента условно можно считать переходным, CCI Score 4 и 1 штаммом (0,807), со 2 штаммом (0,809) и с 5 штаммом (0,805). Последующие изолированные штаммы представителей MABSc не имеют никаких родственных связей с первыми пятью штаммами и являются измененными по масс-спектрам, что отражает CCI матрица анализируемых штаммов.

Пациент №5 участвовал в нашем исследовании весь анализируемый период. От него было собранно наибольшее количество образцов клинического материала. С 2017 по 2020 годы было выделено 13 штаммов представителей MABSc. Один штамм представителя MABSc был обнаружен из смывов душевой лейки пациента. После этого мы провели анализ с помощью CCI матрицы штаммов, выделенных от пациента №5, результаты представлены Приложении 2.

Использование тепловой карты позволило выявить наличие нескольких групп отличающихся друг от друга штаммов. Числовые значения CCI матрицы из-за большого количества штаммов разделены на 2 таблицы: в таблице 26 указаны с 1 по 8 штамм и контрольный штамм, в таблице 24 (с 8 по 14 штамм и К контрольный штамм).

Таблица 24 – Результаты построения CCI матрицы в числовых значениях пациента №5, К – контрольный штамм

0,426	0,467	0,434	0,528	0,473	0,392	0,232	0,357	1	К
0,714	0,719	0,763	0,764	0,799	0,677	0,703	0,492	0,486	14
0,747	0,784	0,67	0,791	**0,803**	0,726	0,694	0,580	0,466	13
0,737	**0,813**	0,668	0,749	0,745	**0,813**	0,649	0,718	0,427	12
0,629	0,677	0,776	**0,803**	0,704	0,631	0,611	0,479	0,568	11
0,722	0,754	0,736	**0,800**	**0,836**	0,774	**0,819**	0,702	0,489	10
0,737	**0,803**	0,685	0,779	0,743	0,726	0,663	0,692	0,467	9
0,553	0,594	0,484	0,543	0,537	0,588	0,603	1	0,357	8
0,780	0,761	0,703	0,781	**0,867**	0,722	1	0,603	0,232	7
0,716	0,786	0,713	0,794	0,794	1	0,722	0,588	0,392	6
0,821	0,796	**0,845**	**0,889**	1	0,794	**0,867**	0,537	0,473	5
0,769	0,785	**0,884**	1	**0,889**	0,794	0,781	0,543	0,528	4
0,684	0,667	1	**0,884**	**0,845**	0,713	0,703	0,484	0,434	3
0,915	1	0,667	0,785	0,796	0,786	0,761	0,594	0,467	2
1	**0,915**	0,684	0,769	0,821	0,716	0,780	0,553	0,426	1
1	2	3	4	5	6	7	8	К	

При установлении связей между штаммами согласно CCI матрице нами были получены следующие результаты: вся популяция была условно разделена на 2 группы с 1 по 8 штамм и с 8 по 14 штамм. Это связано с тем, что 8 штамм существенно отличается согласно CCI Score от всех остальных исследуемых штаммов.

В 1 группе пара 1 и 2 штамма является близкородственной (0,915), дополнительно 1 имеет связь с 5 штаммом (0,821), а 2 штамм с 9 (0,803) и с 12 (0,813) штаммами; 3 штамм связан с 4 (0,884). Штамм 5 имеет близкородственные связи с штаммами: 3 (0,845), 4 (0,889), 7 (0,867), 10 (0,836), 13 (0,803). 6 штамм образует пару только с 12 штаммом (0,813), 7 штамм помимо связи с пятым штаммом, образует пару с 10 штаммом (0,819). Со штаммом 8, согласно CCI матрице, не выявлено никаких связей с выделенными штаммами. При этом

необходимо отметить, что данный штамм был выявлен при культивировании в период от 21 до 28 суток, что существенно отличает его от других штаммов, выделенных от пациента.

Таблица 25 – Результаты построения CCI матрицы в числовых значениях пациента №5, К – контрольный штамм

0,357	0,467	0,489	0,568	0,427	0,466	0,486	1	**К**
0,492	0,716	**0,801**	0,719	0,672	0,723	1	0,486	**14**
0,58	**0,835**	**0,809**	0,725	**0,865**	1	0,723	0,466	**13**
0,718	**0,918**	0,738	0,676	1	**0,865**	0,672	0,427	**12**
0,479	0,796	0,748	1	0,676	0,725	0,719	0,568	**11**
0,702	0,766	1	0,748	0,738	**0,809**	**0,801**	0,489	**10**
0,692	1	0,766	0,796	**0,918**	**0,835**	0,716	0,467	**9**
1	0,692	0,702	0,479	0,718	0,58	0,492	0,357	**8**
0,603	0,663	**0,819**	0,611	0,649	0,694	0,703	0,232	**7**
0,588	0,726	0,774	0,631	**0,813**	0,726	0,677	0,392	**6**
0,537	0,743	**0,836**	0,704	0,745	**0,803**	0,799	0,473	**5**
0,543	0,779	**0,800**	**0,803**	0,749	0,791	0,764	0,528	**4**
0,484	0,685	0,736	0,776	0,668	0,67	0,763	0,434	**3**
0,594	**0,803**	0,754	0,677	**0,813**	0,784	0,719	0,467	**2**
0,553	0,737	0,722	0,629	0,737	0,747	0,714	0,426	**1**
8	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**	**К**	

При анализе штаммов из 2 условной группы согласно CCI матрицы были выявлены следующие связи: 9 штамм имеет связь с 12 (0,918) и 13 (0,835) штаммами; 10 штамм с 13 (0,809) и 4 (0,800), 11 штамм только с 4 штаммом, 12 с 13 (0,865), 14 только с 10 (0,801).

От пациента №6 в 2018 году было выделено 4 штамма представителей MABSc. Построение CCI матрицы штаммов, выделенных из мокроты от пациента №6, представлены Приложении 2.

Анализ CCI матрица в виде «тепловой карты» для штаммов, выделенных от пациента №4, позволил нам выявить однородность между выделенными штаммами согласно масс-спектрам МО. Числовые значения CCI Score представлены в таблице 26.

Таблица 26 – Результаты построения CCI матрицы в числовых значениях пациента №6, К – контрольный штамм

0,434	0,434	0,527	0,473	1	**К**
0,844	**0,844**	**0,888**	1	0,473	**4**
0,883	**0,883**	1	**0,888**	0,527	**3**
0,890	1	**0,883**	**0,844**	0,434	**2**
1	**0,890**	**0,883**	**0,844**	0,434	**1**
1	**2**	**3**	**4**	**К**	

Согласно проведенному анализу с использованием CCI матрицы была выявлена однородность среди выделенных штаммов, CCI Score для всех штаммов составил больше 0,800 и это свидетельствует об их сродстве.

В 2020 году от пациента №7 было выделено 2 штамма. Результаты CCI матрицы выделенных штаммов от пациента №7 представлены Приложении 2.

При проведении анализа CCI матрица в виде «тепловой карты» для штаммов, выделенных от пациента №7, была выявлена однородность между выделенными штаммами согласно масс-спектрам МО. Числовые значения CCI Score представлены в таблице 27.

Таблица 27 – Результаты построения CCI матрицы в числовых значениях пациента №7, К – контрольный штамм

0,467	0,425	1	**К**
0,805	1	0,425	**2**
1	**0,805**	0,467	**1**
1	**2**	**К**	

Результаты CCI Score показали, что выделенные штаммы от этого пациента однородны и не имеют отличий по масс-спектрам.

Для оценки возможности использования данных о значении CCI индекса масс-спектров, полученных со штаммов, выделенных от пациентов с МВ в качестве дополнительного критерия оценки риска развития микобактериоза было принято решение использовать значения CCI индекса для культур MABSc, последовательно выделенных в хронологичеком порядке.

ГЛАВА 17. Оценка диагностической значимости показателей составного индекса корреляции для двух последовательно выделенных штаммов *Mycobacterium abscessus* complex при прогнозировании риска развития микобактериоза у пациентов с муковисцидозом

В связи с полученными данными при сопоставлении масс-спектров, было принято решение проанализировать зависимость развития клинической и/или рентгенологической картины микобактериоза у пациентов с МВ от значений CCI индекса масс-спектров для последовательно выделенных в хронологическом порядке штаммов MABSc. Данный параметр для анализа был обусловлен ранее полученными данными о связи развития обострения хронического инфицирования MABSc с формой колоний и более частым выделением однотипных R колоний у пациентов с развившейся в последствии клинической и рентеголонической картиной микобактериоза.

В результате проведенного статистического анализа были получены достоверные различия между значениями CCI индекса для 35 пар последовательно выделенных штаммов MABSc от пациентов с хроническим высевом без клинической картины микобактериоза и с развитием клинической и/или рентгенологической картины микобактериоза.

Таблица 28 – Значения CCI индекса от клинических и/или рентгенологических признаков микобактериоза

Клинические и/или рентгенологические признаки микобактериоза	Значение CCI индекса для последовательно выделенных штаммов			p
	M ± SD	95% ДИ	n	
Отсутствие	0,672 ± 0,144	0,561 – 0,782	9	0,010*
Наличие	0,789 ± 0,098	0,749 – 0,828	26	
* – различия показателей статистически значимы p<0,05 M – средняя арифметическая величина; SD – стандартное отклонение; ДИ – доверительный интервал границ 95%; n – количество штаммов				

Для оценки диагностической значимости и установления порогового значения CCI индекса для последовательно выделенных штаммов MABSc при прогнозировании риска развития микобактериоза был проведен ROC-анализ. ROC-кривая представлена на рисунке 11.

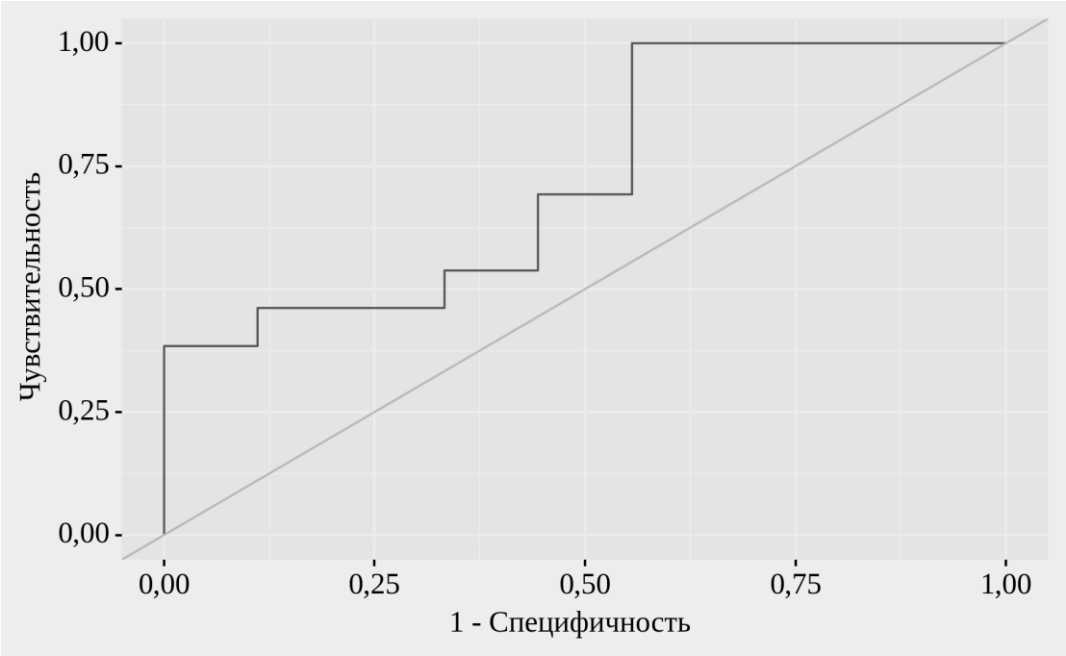


Рисунок 11 – ROC-кривая, характеризующая зависимость вероятности показателя клинические и/или рентгенологические признаки микобактериоза от показателя CCI индекса; AUC=0,726

Пороговое значение показателя CCI индекс в точке cut-off, которому соответствовало наивысшее значение индекса Юдена, составило 0,603. Чувствительность и специфичность модели составили 100,0% и 44,4%, соответственно. Полученная модель была статистически значимой (p=0,045).

Таким образом, значения CCI индекса для последовательно выделенных штаммов MABSc могут быть использованы как дополнительный микробиологический критерий в оценке риска развития клинической картины микобактериоза у пациентов с МВ. В случае значений CCI индекса <0,603 – микробиологическое исследование проводится в соответствии с рекомендациями 1 раз в 3 месяца [35], так как риск развития клинической картины микобактериоза низкий. В случае значения CCI индекса ≥0,603 необходим регулярный микробиологический мониторинг не реже одного раза в месяц с оценкой культуральных свойств штаммов MABSc, выделенных на универсальной хромогенной среде, в качестве дополнительного критерия оценки риска развития клинической картины микобактериоза.

В главе, посвященной анализу культуральных особенностей представителей MABSc, были описаны данные о том, что количество штаммов в S форме, выделенных от пациентов с хроническим инфицированием до клинических проявлений достоверно выше, чем от хронически инфицированных пациентов с клиническими проявлениями, и от больных с однократным высевом. Тогда как при хроническом инфицировании с клиническими проявлениями было обнаружено достоверно больше штаммов, которые растут в R форме. Эти данные свидетельствуют о том, что при длительном инфицировании представители MABSc переходят от S формы популяций к R форме, что достоверно выявляется при использовании универсальной хромогенной среды и требует более глубокого

изучения, в том числе и при анализе масс-спектров, для возможного использования при прогнозировании риска развития микобактериоза.

После построения CCI матриц были выявлены достоверные данные о различиях между значениями CCI индекса для пар последовательно выделенных штаммов MABSc от пациентов с хроническим высевом без клинической картины микобактериоза и с развитием клинической и/или рентгенологической картины микобактериоза. На основе полученных данных был проведен ROC-анализ, по результатам которого определены значения CCI индекса для последовательно выделенных штаммов MABSc которые могут быть использованы для дополнительного микробиологического критерия в оценке риска развития клинической картины микобактериоза у пациентов с МВ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одна из основных задач микробиологической диагностики заключается в поиске и установлении этиологического агента при развитии той или иной бактериальной инфекции. Как и во времена Л. Пастера, Р. Коха, С.Н. Виноградского использование питательных сред и, в целом, микробиологического метода является ключевым при диагностике инфекционных заболеваний и на сегодняшний день. Однако за последние 30-40 лет микробиологическая диагностика инфекционных осложнений достигла определенных этапов совершенствования и оптимизации. Появление современных технологий идентификации внесло значительный вклад в изменение таксономии прокариот, при этом ключевую роль сыграло внедрение в рутинную микробиологическую практику генетических методов исследования, в том числе и полногеномного секвенирования [60, 69, 90, 71, 92, 140].

Не меньшую роль в описание новых видов МО внесла технология MALDI-ToF масс-спектрометрии, которая за счет низкой стоимости реагентов позволяет изучать широкий спектр бактерий и грибов. С каждым годом появляется все больше публикаций, в которых отражено описание новых МО, участвующих в различных инфекционных процессах в организме человека и НТМ в этом плане, не являются исключением [121, 158]. Представляя собой разнообразную группу сапрофитных бактерий, обитающих преимущественно в окружающей среде, они все чаще становятся причиной развития инфекционных процессов различной локализации, особенно у пациентов из групп риска по развитию микобактериозов, к которым в том числе относятся пациенты с МВ [115].

Ряд особенностей НТМ позволяют им длительно сохраняться в окружающей среде и делают их потенциальными инфекционными агентами для пациентов с МВ. Следует учитывать, что помимо окружающей среды пациенты могут инфицироваться внутри стационара, при амбулаторном лечении, а также при прямом контакте друг с другом [74, 159]. В связи с этим особенно остро встает вопрос о раннем выявлении колонизации и инфицирования дыхательных путей НТМ у пациентов из групп риска с точки зрения профилактики потенциального перекрестного инфицирования. Другой проблемой, связанной с НТМ, является их активное размножение и сохранение в источниках водоснабжения, как в общественных местах, так и в квартирах и частных домах. Основным фактором передачи при этом является аэрозоль, чаще всего образуемый при использовании душевых насадок или других распылителей [59]. Одновременно с этим не исключено инфицирование пациентов с МВ и другими клинически значимыми для них МО, например, *P.aeruginosa* и другими НФГОБ, которые имеют схожие с НТМ ареалы.

Распространенность инфекций, вызванных НТМ в последнее время имеет выраженную тенденцию к увеличению [116]. Во многих странах мира отмечено повышение заболеваемости микобактериозами различной локализации [122]. Такие же данные приводятся и при анализе заболеваемости микобактериозами у пациентов с МВ [90]. В России на данный момент отсутствует официальная

статистика заболеваемости инфекциями, вызванными НТМ, несмотря на то, что число случаев микобактериозов по данным многих авторов ежегодно увеличивается.

По данным Регистра больных муковисцидозом в Российской Федерации 2019 года среди 3169 включенных в него пациентов, доля инфицированных НТМ составляет всего 1,0%. На 2017 год доля инфицированных составила 0,7 % и 0,9 % в 2018 году [31, 32]. При этом взрослые инфицируются намного чаще, что становится крайне актуальным в связи с увеличением продолжительности жизни пациентов с МВ, улучшением антибактериальной терапии и появлением возможности трансплантации легких. При сравнении с данными зарубежных стран, в которых распространенность НТМ варьирует от 5 до 20% среди пациентов с МВ, возникает закономерный вопрос с чем именно связаны такие низкие показатели распространенности НТМ у пациентов с МВ в РФ [40, 119, 120].

Одной из возможных причин низкой распространенности микобактериозов у пациентов с МВ является то, что проведение таких исследований в России осуществляется в микробиологических лабораториях противотуберкулезной службы. Однако микрофлора, которая является наиболее распространенной у пациентов с МВ (*P.aeruginosa, A.xylosoxidans, B.cepacia*, различные энтеробактерии) может значительно контаминировать образцы мокроты и затруднять выделение НТМ из клинического материала. Исследователи для решения этой проблемы все чаще поднимают вопрос о необходимости использования для выделения НТМ искусственных агаризованных питательных сред для выделения ВСС и универсальных хромогенных сред [10].

Еще одной сложностью является то, что в лабораториях противотуберкулезной службы не работают с материалом, представленном МЗСГ и отделяемым со слизистой оболочки носа, что исключает выделение НТМ у детей, не умеющих отхаркивать мокроту в связи с возрастными особенностями. При этом отмечено, что выявление колонизации параназальных синусов и носовых ходов в последние годы является актуальным с точки зрения последующего формирования колонизации и инфекции нижних дыхательных путей [5].

Все вышеперечисленное актуализирует необходимость разработки алгоритмов выделения быстрорастущих НТМ из клинического материала пациентов с МВ в рутинной микробиологической практике. Данный аспект является особенно актуальным в связи с широким внедрением в микробиологическую диагностику метода MALDI-ToF масс-спектрометрии. В базе данных масс-спектрометра, содержатся спектры необходимые для идентификации НТМ и по этой причине в оснащенных таким оборудованием лабораториях появилась возможность для лабораторной диагностики микобактериозов, включая пациентов с МВ. Тем временем для идентификации НТМ с помощью масс-спектрометрии в большинстве случаев необходимо получить культуру МО, выращенную на питательной среде. По этой причине в настоящее время необходима разработка и оптимизация выделения и

идентификации быстрорастущих НТМ как одних из основных возбудителей микобактериозов у пациентов с МВ, с целью улучшения микробиологической диагностики инфекционных осложнений у данной группы пациентов.

Для реализации этой цели в период с 2017 по 2020 годы нами было исследовано 5547 образцов клинического материала, собранных от 1148 пациентов с МВ из различных регионов РФ. Образцы биоматериала были представлены свободно отделяемой мокротой (52,1%), мазками со слизистой оболочки задней стенки глотки МЗСГ (30,0%) и отделяемым со слизистой оболочки носа (17,9%). За анализируемый период исследования из биологического материала, представленного преимущественно мокротой 52 образца (93,0%), а также 3 образцами (5,3%) МЗСГ и одним образцом (1,7%) материала из носовой полости, от 21 пациента с МВ было выделено 56 штаммов MABSc. Эти данные подтверждают возможность выделения MABSc у детей. Особенно это актуально в связи с тем, что были зарегистрированы данные выделения у пациентов с хроническим инфицирование MABSc не из мокроты, несмотря на то, что в рекомендациях ATS данные виды клинического материала не считаются приемлемыми для диагностики микобактериоза.

Что касается региональной инфицированности в ФО РФ, были получены следующие результаты (в скобках указана доля инфицированных): представители MABSc изолированы и идентифицированы из посевов биоматериала от пациентов из ЦФО – 4 больных с высевами представителей MABSc (2,8%), из ЮФО – 6 пациентов (3,5%), из ПФО – 7 больных (2,0%), из Уральского ФО (УФО) – 4 пациента (4,1%). Из всех областей, включенных в ФО, лидирующую позицию по количеству пациентов с МВ, от которых были выделены MABSc занимает, Ростовская область – 4 пациента (6,3%).

При исследовании практически во всех образцах материала от пациентов с МВ, исследованных культуральным способом совместно с MABSc, был получен рост сопутствующей микрофлоры. Всего было выделено 223 штамма различных МО, большая часть которых имеет клиническое значение у пациентов с МВ. Чаще всего были выделены грамположительные МО, затем НФГОБ и дрожжеподобные грибы. Наиболее частым патогеном, с которым выделялись MABSc, был *Staphylococcus aureus,* он выделен в 29 случаях. В 24 случаях были выделены представители *Candida* spp. которые хоть не имеют в большинстве случаев клинического значения, однако могут повлиять на ростовые свойства MABSc. Следующую позицию занимает *Pseudomonas aeruginosa*, который находился в клиническом материале в 13 случаях, представители ВСС – в 2 случаях, в 11 случаях выделялась *Stenotrophomonas maltophilia,* в 6 случаях – *E.coli*. И, на наш взгляд, по этой причине подбор оптимальных селективных питательных сред и их использование для выделения MABSc является крайне актуальным, это обусловлено тем, что довольно часто грамположительные МО, НФГОБ, дрожжеподобные грибы и различные представители орофарингеальной микрофлоры могут подавлять рост MABSc, что в результате влияет на качество диагностики микобактериозов.

Согласно данным литературы, при посеве на искусственные питательные среды видимый рост MABSc, как правило, появляется в течение 7 суток после посева [101]. Для культивирования часто используются среды для выделения микобактерий: Левенштейна-Йенсена, Финн-2, Миддлбрука 7H11. Однако при использовании данных сред в связи с особенностями микробного разнообразия в клиническом материале от пациентов с МВ, выделение MABSc часто регистрируется совместно с другими быстрорастущими микроорганизмами.

Появление в практике врачей-бактериологов универсальных хромогенных сред, предназначенных для культивирования многих бактерий, облегчило задачу поиска причины заболевания при микробиологической диагностике. Однако в случае с МВ использование таких сред весьма ограничено, в связи с особенностями и широким разнообразием микрофлоры дыхательных путей у пациентов. Решением для исключения балластной флоры при посеве клинического материала на питательные среды, является использование селективных сред. Одним из примеров таких сред является среда для выделения BCC на которой возможно выделение, в том числе и представителей MABSc.

Определенной трудностью при микробиологической диагностике инфекционных осложнений, вызванных представителями MABSc у пациентов с МВ, является определение сроков их культивирования.

В руководстве по микробиологической диагностике инфекций дыхательных путей у пациентов с МВ отмечено, что выделение представителей MABSc на селективной среде для BCC возможно, при продлении инкубации до 14 суток [35]. В нашем исследовании среди 56 штаммов, выделенных от пациентов с МВ, рост 43 (76,8%) штаммов был выявлен в период до 14 суток что соответствует заявленным срокам, однако рост 13 (23,2%) штаммов регистрировался после 14 суток. Увеличение сроков выявления роста связано с рядом причин, в том числе доступностью и составом компонентов в питательной среде, а также применением антимикробной химиотерапии у пациентов, инфицированных представителями MABSc. По нашим данным продление времени культивирования посевов от пациентов с МВ целесообразно проводить до 28 суток, что повышает вероятность их обнаружения в исследуемом материале.

Помимо этого, пересев чистой культуры представителей MABSc на плотные агаризированные питательные среды позволил нам оценить диссоциацию по культуральным свойствам MABSc при развитии микобактериозов у пациентов с МВ. При оценке типа колоний в зависимости от показателя формы инфекционного процесса на среде для выделения BCC не были получены статистически достоверные различия. При культивировании на хромогенной среде были выявлены несколько морфотипов MABSc: 30 штаммов (46,9%) росли в форме S колоний, 11 штаммов (17,2%) в R форме колоний и 23 штамма (35,9%) при культивировании давали рост как в S, так и в R форме. Таким образом, только при оценке типа колоний штаммов MABSc, выросших на универсальной хромогенной среде были выявлены статистически значимые различия в зависимости от показателя формы инфекционного процесса ($p<0,001$).

Количество штаммов в S форме, выделенных от пациентов с хроническим инфицированием до появления клинических проявлений, достоверно выше, чем от хронически инфицированных пациентов с клиническими проявлениями, и от пациентов с однократным высевом. У пациентов с хроническим инфицированием с клиническими проявлениями было обнаружено достоверно больше штаммов, которые растут в R форме. При этом у пациентов, обследованных однократно не зарегистрирован рост колоний в R форме, все штаммы давали рост в виде либо S колоний, либо в S и R форме одновременно. Переход от S к R варианту формы колоний по данным литературы вероятно связан с развитием тяжелых инфекций [94, 103, 147].

Известно, что для культивирования НТМ возможно использование универсальных хромогенных сред, обладающих высокой продуктивностью [10]. Однако использование универсальных хромогенных сред для микробиологической диагностики у пациентов с МВ весьма ограничено, не исключено, что часть быстрорастущей флоры подавляет рост других клинически значимых МО. По этой причине для микробиологической диагностики как уже было отмечено выше, необходимо использование селективных питательных сред, например, среды для выделения BCC.

При этом важно помнить, что из-за своих физиологических особенностей получить рост НТМ во многих случаях весьма затруднительно и данный факт необходимо учитывать при разработке новых питательных сред. С одной стороны, для выделения представителей MABSc необходимо прибегать к пролонгированным срокам культивирования, с другой – они являются довольно прихотливыми МО и для их роста и повышения продуктивности питательной среды необходимо наличие в составе дополнительных компонентов, например, железа.

Для определения оптимальной концентрации железа с целью повышения продуктивности питательной среды нами были проанализированы несколько вариантов питательной среды для выделения BCC с различными концентрациями соли железа. После процедур культивирования статистически достоверные различия были получены для штаммов, выросших на среде для выделения BCC с концентрацией органической соли железа (III) гидроксида полимальтозата 240 мг. Результаты продуктивности среды для выделения BCC с концентрацией соли железа 240 мг были сопоставимы с продуктивностью универсальной хромогенной среды, что делает ее приемлемой при исследовании материала от пациентов с МВ.

После определения сроков культивирования и создания среды для повышения вероятности обнаружения в клиническом материале от пациентов с МВ представителей MABSc возник вопрос: насколько питательная среда влияет на качество идентификации с использованием метода MALDI-ToF масс-спектрометрии? В литературе отмечено что, качество идентификации при использовании масс-спектрометрии зачастую зависит от состава микробной клетки [10]. При этом состав микробной клетки возможно зависит от питательной среды, на которой происходит культивирование бактерии.

В библиотеке спектров НТМ для масс-спектрометров (Bruker Daltonik GmbH, Германия) находятся спектры, снятые со сред Левенштейна-Йенсена и Миддлбрука. В литературе описаны работы, в которых отмечено, что при идентификации *M.abscessus*, выделенных на среде Левенштейна-Йенсена и универсальной хромогенной среде, степень достоверности идентификации является сопоставимой [10]. При этом не были описаны результаты сравнения универсальной хромогенной среды со средой для выделения ВСС.

Всего в исследовании были сняты спектры с 64 штаммов представителей MABSc, из которых 8 штаммов были выделены от пациентов при обследовании на туберкулез. Идентификация выделенных штаммов проводилась с использованием метода расширенного прямого нанесения.

Первым этапом этого раздела исследования было проведение сравнения результатов идентификации MABSc, выращенных на среде для выделения ВСС с использованием основной библиотеки спектров масс-спектрометра, в которой находятся спектры 2 штаммов *M. abscessus* с библиотекой дополнительных спектров НТМ (Mycobacteria Library версия 4.0, Bruker Daltonik GmbH, Германия), в которой содержатся 36 масс-спектров штаммов *M.abscessus*.

При сравнении показателей уровня коэффициента совпадения Score в зависимости от выбранной библиотеки были получены статистически достоверные различия. Использование библиотеки Mycobacteria Library версия 4.0 показало достоверно лучшие результаты идентификации, чем при применении основной библиотеки. Однако, следует отметить, что даже при использовании дополнительной библиотеки масс-спектров для штаммов MABSc, выросших на селективной среде для ВСС, достоверность видовой идентификации была низкой. Вне зависимости от использованной библиотеки результат видовой идентификации был ограничен всего двумя штаммами из 64, что составило 3,1%. Для получения результата видовой идентификации при использовании среды для выделения ВСС было необходимо использовать методом экстракции муравьиной кислотой, что требует гораздо больше времени в пробоподготовке. Данный метод значительно ограничен в рутинной микробиологической практике.

В связи с полученными результатами идентификации на среде ВСС была проведена оценка идентификации с использованием двух библиотек, исследуемых штаммов после пересева на хромогенную среду. При сравнении показателя Score в зависимости от используемой библиотеки, нами были выявлены статистически значимые различия, подтверждающие, что идентификация с использованием библиотеки Mycobacteria Library версия 4.0 представителей MABSc, выделенных на хромогенной среде, достоверно лучше при сравнении с основной библиотекой. С использованием основной библиотеки удалось выполнить идентификацию до вида для 19 штаммов (29,7%). При использовании специализированной библиотеки видовая идентификация была получена в отношении 38 штаммов (59,4%) MABSc. Это связано с тем, что для всех тестируемых штаммов количество пиков на хромогенной среде достоверно выше, чем на среде для выделения ВСС, по этой причине и показатели Score при идентификации MABSc, выделенных на хромогенной среде, были достоверно

выше, чем на селективной среде для выделения ВСС. Таким образом, метод расширенного прямого нанесения оказался приемлемым при использовании универсальной хромогенной среды для получения результатов видовой идентификации.

После разработки среды для выделения ВСС с ростовой добавкой, которая показала достоверное лучшие показатели продуктивности при сравнении среды для выделения ВСС без добавления соли железа, был проведен анализ по возможности ее использования для идентификации.

Результаты сравнения пиков при использовании различных питательных сред показали существенные различия: количество пиков, полученных с культур, выращенных на среде для выделения ВСС с добавлением соли железа, оказалось достоверное больше, чем со среды для выделения ВСС без добавления железа, но одновременно меньше, чем с хромогенной среды.

В дальнейшем возник закономерный вопрос о влиянии разработанной нами среды на значения Score, полученных при идентификации с помощью масс-спектрометрии. В этом случае идентификация до вида с использованием специализированной библиотеки масс-спектров проведена в отношении 5 штаммов (7,8%). Результаты статистического анализа показали, что несмотря на то, что с штаммов, выращенных на разработанной нами среде, было получено достоверно большее количество пиков, чем со среды для выделения ВСС, значения Score оказались сопоставимы и достоверных различий выявлено не было.

Таким образом, согласно проведенным исследованиям разработанная нами среда для выделения представителей MABSc из клинического материала от пациентов с МВ показала более высокие показатели Score, полученные при идентификации с использованием библиотеки Mycobacteria Library версия 4.0 MALDI-ToF масс-спектрометра, что подтверждает ее использование при диагностике микобактериозов у пациентов с МВ. При этом после первичного посева исследуемого материала и выделения на разработанной нами среде представителей MABSc с последующей их идентификацией, необходимо проводить пересев микобактерий на хромогенную среду для оценки культуральных свойств и повышения качества видовой идентификации.

В главе, в которой описаны результаты анализа культуральных особенностей представителей MABSc, были приведены данные о том, что количество штаммов в S форме, выделенных от пациентов с хроническим инфицированием до клинических проявлений достоверно выше, чем от хронически инфицированных пациентов с клиническими проявлениями, и от больных с однократным высевом. Тогда как при хроническом инфицировании с клиническими проявлениями было обнаружено достоверно больше штаммов, которые растут в R форме. Эти данные свидетельствуют о том, что при длительном инфицировании популяция штаммов MABSc становится более однородной по культуральным свойствам, при этом получение только R колоний на универсальной хромогенной среде достоверно связано с переходом хронического инфицирования в обострение с появлением клинических или рентгенологических симптомов микобактериоза. Однако данные

о диссоциации микроорганизмов по культуральным свойствам затруднительно использовать для проведения прогностических исследований, в связи с чем нами был предложен способ прогнозирования развития микобактериоза по данным анализа масс-спектров, полученных со штаммов, последовательно выделенных от пациентов с хроническим высевом MABSc

После проведения анализа масс-спектров и построения CCI матриц были выявлены достоверные различия между значениями CCI индекса для пар последовательно выделенных штаммов MABSc от пациентов с хроническим высевом без клинической картины микобактериоза и с развитием клинической и/или рентгенологической картины микобактериоза. На основе полученных данных проведен ROC-анализ, по результатам которого определены значения CCI индекса для последовательно выделенных штаммов MABSc которые могут быть использованы для дополнительного микробиологического критерия в оценке риска развития клинической картины микобактериоза у пациентов с МВ. В случае значений CCI индекса <0,603 – микробиологическое обследование проводится в 1 раз в 3 месяца в соответствии с рекомендациями [35], так как риск развития клинической картины микобактериоза низкий. В случае значения CCI индекса ≥0,603 необходим регулярный микробиологический мониторинг не реже одного раз в месяц с определением культуральных свойств штаммов MABSc, выделенных на универсальной хромогенной среде, содержащей триптофан и хромогены для выявления глюкуронидаз и галактозидаз, и расчетом CCI индекса для последовательно выделенных штаммов в качестве дополнительного критерия оценки риска развития клинической картины микобактериоза.

На основании полученных результатов проведенного исследования был предложен алгоритм микробиологической диагностики у пациентов с МВ, направленный на улучшение выделения и идентификации быстрорастущих НТМ, который представлен на рисунке 26.

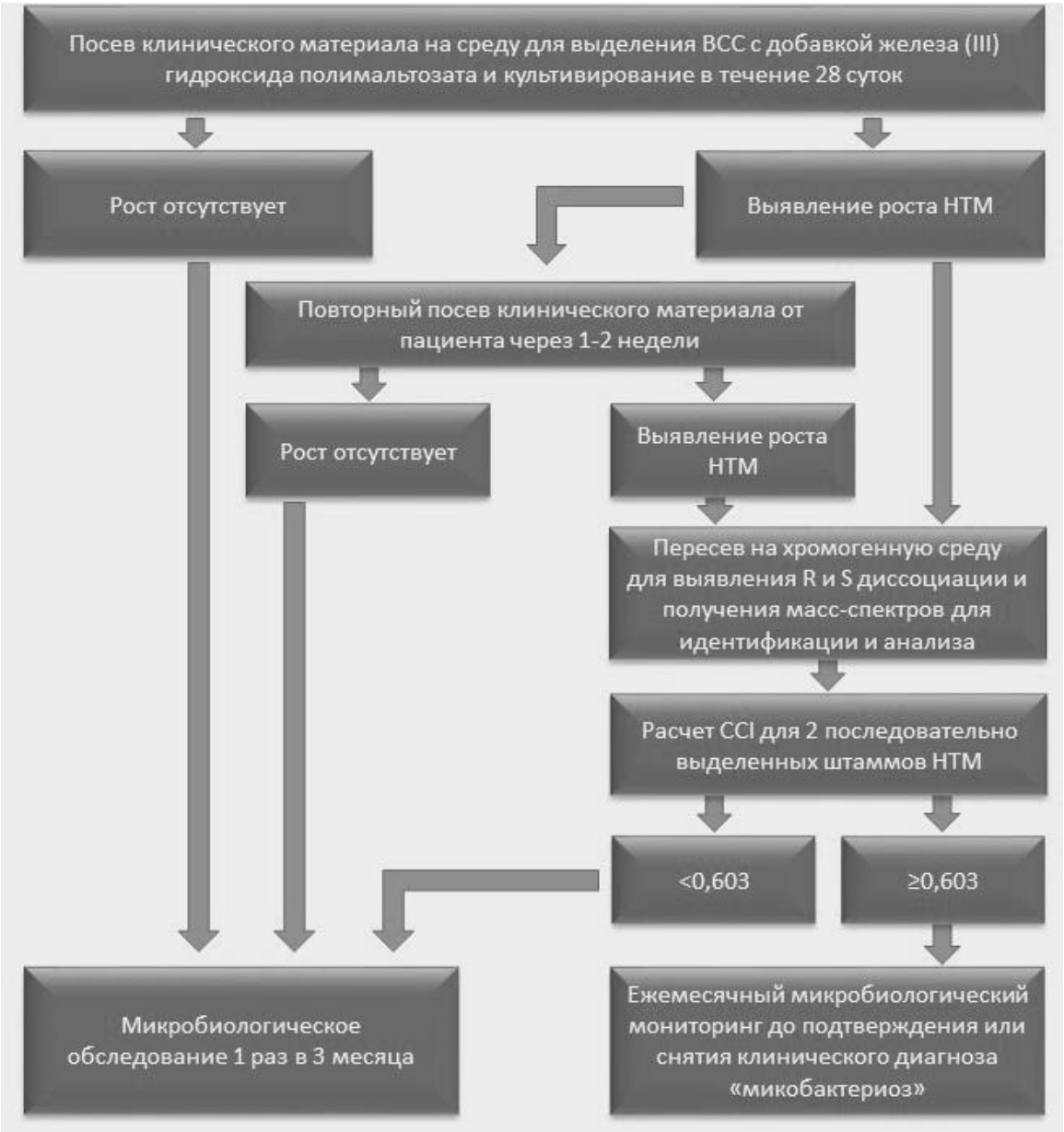


Рисунок 12 – Алгоритм микробиологической диагностики инфекционных осложнений, вызванных нетуберкулезными микобактериями, у пациентов с муковисцидозом

Таким образом, предлагаемые варианты по оптимизации микробиологической диагностики инфекционных осложнений, вызванных нетуберкулезными микобактериями, у пациентов с муковисцидозом, которые включают пролонгированное до 28 суток культивирование с использованием разработанной нами среды с добавлением железа (III) гидроксида полимальтозата, последующий пересев отдельных колоний на универсальную хромогенную среду с идентификацией и оценкой RS диссоциации, а также анализ CCI индекса для последовательно выделенных штаммов НТМ позволяет улучшить диагностику микобактериозов у пациентов с МВ.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БРМ	– быстрорастущие микобактерии
ВИЧ	– вирус иммунодефицита человека
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
КОЕ	– колониеобразующая единица
МВ	– муковисцидоз
МЗСГ	– мазки со слизистой оболочки задней стенки глотки
МО	– микроорганизмы
НТМ	– нетуберкулезные микобактерии
НФГОБ	– неферментирующие грамотрицательные бактерии
ПФО	– Приволжский федеральный округ
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
УФО	– Уральский федеральный округ
ФО	– Федеральный округ
ЦФО	– Центральный федеральный округ
ЮФО	– Южный федеральный округ
ATS	– American thoracic society
BCC	– *Burkholderia cepacia* complex
CCI	– Composite Correlation Index
ERS	– European Respiratory Society
ESCMID	– European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases
HCCA	– α-циано-4-гидроксикоричная кислота
IDSA	– Infectious Diseases Society of America
MABSc	– *Mycobacterium abscessus* complex
MALDI-ToF	– Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight
MTC	– микобактерии туберкулезного комплекса

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Атлас по медицинской микробиологии, вирусологии и иммунологии / под ред. А. А. Воробьева, А. С. Быкова. – Москва : Медицинское информационное агентство, 2003. – 72 с.
2. Гетерогенность в изогенных популяциях бактерий и современные технологии клеточного фенотипирования / Б. Г. Андрюков, Н. Ф. Тимченко, И. Н. Ляпун [и др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2021. – Т. 98, № 1. – С. 73–83.
3. Железо как эссенциальный фактор роста микобактерий / А. В. Лямин, А. В. Халиулин, Д. Д. Исматуллин [и др.] // Известия Самарского научного центра РАН. – 2016. – Т. 18, № 5(2). – С. 320–327.
4. Использование времяпролетной масс-спектрометрии с матричноактивированной лазерной десорбцией/ионизацией (MALDI-ToF MS) для идентификации бактериальных и грибковых возбудителей III-IV групп патогенности / И. В. Чеботарь, С. В. Поликарпова, Ю. А. Бочарова [и др.] // Лабораторная служба. – 2018. – Т. 7, № 2. – С. 78–86.
5. Кондратенко, О. В. Комплексный подход к микробиологической диагностике бактериальных осложнений при муковисцидозе : специальность 03.02.03 «Микробиология» : диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Кондратенко Ольга Владимировна. – Самара, 2020. – 264 с.
6. Контаминирующая микрофлора при обследовании на туберкулез: сапрофиты или потенциальные патогены? / А. В. Лямин, Д. Д. Исматуллин, А. В. Жестков [и др.] // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2019. – № 3. – С. 63–70.
7. Красовский, С. А. Муковисцидоз: диагностика, клиника, основные принципы терапии / С. А. Красовский, В. А. Самойленко, Е. Л. Амелина // Пульмонология и аллергология. – 2013. – № 1. – С. 42–46.
8. Лабораторная диагностика микобактериозов у пациентов с муковисцидозом (обзор литературы) / А. В. Лямин, Д. Д. Исматуллин, А. В. Жестков [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2018. – Т. 63, № 5. – С. 315–320.
9. Лямин, А. В. Лабораторная диагностика микобактериозов : учебное пособие для студентов / А. В. Лямин, А. В. Жестков, Д. Д. Исматуллин. – Самара : Право, 2019. – 72 с.
10. Лямин, А. В. Новые подходы к культивированию и идентификации кислотоустойчивых представителей порядка ACTINOMYCETALES, выделенных из клинического материала : специальность 03.02.03 «Микробиология» : диссертация на соискание ученой степени доктора медицинских наук / Лямин Артем Викторович. – Самара, 2020. – 214 с.

11. Майрова, А. А. Индентификация нетуберкулезных микобактерий и выбор оптимальной комбинации методов для их видовой дифференциации : специальность 03.00.07 «Микробиология» : автореферат диссертации на соискание учетной степени кандидата биологических наук / Майорова Ангелина Александровна ; ФГУЗ «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г. Н. Габричевского» Роспотребнадзора РФ. – Москва, 2007. – 26 с.
12. Масс-спектрометрическая оценка карбапенемазной активности pseudomonas aeruginosa / Ю. А. Бочарова, И. В. Чеботарь, О. А. Крыжановская [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2018. – Т. 63, № 2. – С. 99–105.
13. Маянский, А. Н. Патогенетическая микробиология : руководство / А. Н. Маянский. – Нижний Новгород : Изд. Нижегородской государственной медицинской академии, 2006. – 520 с.
14. Микобактериозы в практике врачей пульмонологов и фтизиатров / А. Э. Эргешов, Е. И. Шмелев, М. Н. Ковалевская [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2016. – Т. 94, № 9. – С. 39–43.
15. Микобактериозы во фтизиопульмонологической практике: обзор литературы и собственный опыт / Л. Д. Гунтупова, С. Е. Борисов, И. П. Соловьева [и др.] // Практическая медицина. – 2011. – № 51. – С. 39–50.
16. Микобактериозы органов дыхания: эпидемиология, микробиологические и клинические аспекты диагностики / Л. Д. Гунтупова, С. Е. Борисов, М. В. Макарова [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. – 2012. – № 2. – С. 8–14.
17. Морфологическая верификация ВИЧ-ассоциированного микобактериоза, вызванного нетуберкулезными микобактериями Myc. avium complex / Ю. Р. Зюзя, Ю. Г. Пархоменко, В. Н. Зимина [и др.] // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2015. – № 3. – С. 11–21.
18. 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.
19. Нетуберкулезные микобактерии: современные возможности видовой идентификации / А. В. Лямин, А. М. Ковалёв, А. В. Жестков [и др.] // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2017. – Т. 19, № 1. – С. 11–14.
20. Определитель бактерий Берджи : 2 томах. Т. 2 : пер. с англ. / под ред. Дж. Хоулта, Н. Крига, П. Снита [и др.]. – Москва : Мир, 1997. – 386 с.
21. Опыт применения микробиологических методов исследований при инфекционных осложнениях тяжелых травм / С. А. Свистунов, А. А. Кузин, Т. Н. Суборова [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2016. – Т. 6, № 4. – С. 373–378.
22. Патент RU 173302 U1 Российская Федерация, МПК C12M 1/22 (2006.01). Чашка для культивирования микроорганизмов с двухпозиционной резьбой : заявка № 2017108813, 16.03.2017 : опубл. 21.08.2017 / А. В. Лямин, И. Р. Тонеев, А. В. Козлов [и др.]. – Бюл. № 24. – 7 с.

23. Патент RU 175134 U1 Российская Федерация, МПК C12M 1/22 (2006.01). Флакон для культивирования микроорганизмов : заявка № 2017116263, 10.05.2017 : опубл. 22.11.2017 / А. В. Лямин, И. Р. Тонеев, А. В. Козлов [и др.]. – Бюл. № 33. – 5 с.
24. Патент RU 2659155 C1 Российская Федерация, МПК G01N 33/487 (2006.01). Способ сбора и первичного посева жидкости назального лаважа от пациентов с муковисцидозом для микробиологического исследования : заявка № 2017122649, 27.06.2017 : опубл. 28.06.2018 / О. В. Кондратенко, А. В. Лямин, Е. Д. Медведева, А. В. Ермолаева. – Бюл. № 19. – 6 с.
25. Патент RU 2668406 C1 Российская Федерация, МПК C12Q 1/04 (2006.01), C12N 1/20 (2006.01), C12R 1/01 (2006.01). Способ первичного посева биоматериала, выделенного из нижних дыхательных путей пациентов с муковисцидозом : заявка № 2017122657, 27.06.2017 : опубл. 28.09.2018 / О. В. Кондратенко, А. В. Лямин, Д. Д. Исматуллин. – Бюл. № 28. – 9 с.
26. Патент RU 2711957 C1 Российская Федерация, МПК C12N 1/20 (2006.01), C12R 1/01 (2006.01). Способ первичного посева клинического материала для выделения нетуберкулезных микобактерий: заявка № 2019114858, 14.05.2019 : опубл. 23.01.2020 / А. В. Лямин, Д. Д. Исматуллин, О. В. Кондратенко [и др.]. – Бюл. № 3. – 5 с.
27. Представители Mycobacterium abscessus complex у пациентов с бронхолёгочной патологией: распространённость, особенности культивирования и идентификации / К. Р. Калимулина, Д. Д. Исматуллин, А. В. Лямин [и др.] // Клиническая лабораторная диагностика. – 2020. – Т. 65, № 5. – С. 316–320.
28. Приказ № 109 МЗ РФ от 21 марта 2003 года «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в Российской Федерации / Министерство здравоохранения российской федерации. – Текст : электронный // Техэксперт. Консорциум Кодекс. – URL: http://docs.cntd.ru/document/901868614 (дата обращения: 23.04.2020).
29. Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации 2015 год / под ред. Е. И. Кондратьевой, С. А. Красовского, А. Ю. Воронковой [и др.]. – Москва : МЕДПРАКТИКА-М, 2016. – 72 с.
30. Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации 2016 год / под ред. С. А. Красовского, А. В. Черняка, А. Ю. Воронковой [и др.]. – Москва : МЕДПРАКТИКА-М, 2018. – 64 с.
31. Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации 2017 год / под ред. А. Ю. Воронковой, Е. Л. Амелиной, Н. Ю. Каширской [и др.]. – Москва : МЕДПРАКТИКА-М, 2019. – 68 с.
32. Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации 2018 год / под ред. Е. Л. Амелиной, Н. Ю. Каширской, Е. И. Кондратьевой [и др.]. – Москва : МЕДПРАКТИКА-М, 2020. – 68 с.
33. Регистр больных муковисцидозом в Российской Федерации 2019 год / под ред. Н. Ю. Каширской, Е. И. Кондратьевой, С. А. Красовского [и др.]. – Москва : МЕДПРАКТИКА-М, 2021. – 68 с.

34. Руководство по медицинской микробиологии. В 3 книгах. Книга 1. Общая и санитарная микробиология / Колл. Авторов ; [под ред. Лабинской А.С., Волиной Е.Г.] – Москва : БИНОМ, 2008. – 1080 с.
35. Руководство по микробиологической диагностике инфекций дыхательных путей у пациентов с муковисцидозом / С. В. Поликарпова, С. В. Жилина, О. В. Кондратенко [и др.]. – Москва ; Тверь : Триада, 2019. – 128 с.
36. Случай микобактериоза органов дыхания, вызванный M. kansasii / Л. Д. Гунтупова, С. Е. Борисов, Т. П. Гришина [и др.] // Инфекционные болезни. – 2016. – № 2(15). – С. 65–72.
37. Сравнительный анализ методов идентификации нетуберкулезных микобактерий, выделенных из клинического материала / А. В. Лямин, Д. Д. Исматуллин, А. В. Жестков [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2017. – № 7(3). – С. 285–291.
38. Частота выявления и особенности морфологии нетуберкулезного микобактериоза у больных на поздней стадии ВИЧ-инфекции (по данным Оренбургской области) / А. М. Михайловский, С. А. Чуркин, Н. А. Пашкова [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2016. – Т. 94, № 12. – С. 57–61.
39. Acute respiratory failure involving an R variant of Mycobacterium abscessus / E. Catherinot, A. L. Roux, E. Macheras [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2009. – Jan., vol. 47(1). – P. 271–274.
40. Adjemian, J. Nontuberculous mycobacteria among patients with cystic fibrosis in the United States: screening practices and environmental risk / J. Adjemian, K. N. Olivier, D. R. Prevots // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2014. – Vol. 190. – P. 581–586.
41. Age-related prevalence and distribution of nontuberculous mycobacterial species among patients with cystic fibrosis / C. Pierre-Audigier, A. Ferroni, I. Sermet-Gaudelus [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2005. – Jul., vol. 43(7). – P. 3467–3470.
42. Amoebal Coculture of «Mycobacterium massiliense» sp. nov. from the Sputum of a Patient with Hemoptoic Pneumonia / T. Adékambi, M. Reynaud-Gaubert, G. Greub [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2004. – Vol. 42. – P. 5493–5501.
43. Brown-Elliott, B. A. Clinical and taxonomic status of pathogenic nonpigmented or late-pigmenting rapidly growing mycobacteria / B. A. Brown-Elliott, RJ. Jr. Wallace // Clin. Microbiol. Rev. – 2002. – Oct., vol. 15(4). – P. 716–746.
44. Bruker biotyper matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry system for identification of Nocardia, Rhodococcus, Kocuria, Gordonia, Tsukamurella, and Listeria species / P. R. Hsueh, T. F. Lee, S. H. Du [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2014. – Jul., vol. 52(7). – P. 2371–2379.
45. Children with cystic fibrosis are infected with multiple subpopulations of mycobacterium abscessus with different antimicrobial resistance profiles / L. P. Shaw, R. M. Doyle, E. Kavaliunaite [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2019. – Oct. 30, vol. 69(10). – P. 1678–1686.

46. Clinical and microbiological profile of non-tuberculous mycobacterial endophthalmitis-experience in a tertiary eye care centre in Southern India / R. M. Paulose, J. Joseph, R. Narayanan [et al.]. – Text : electronic // J. Ophthalmic. Inflamm. Infect. – 2016. – Dec., vol. 6(1). – 27. – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27439781/ (date of access: 09.10.2021).
47. CNS infections caused by Mycobacterium abscessus complex: clinical features and antimicrobial susceptibilities of isolates / M. R. Lee, A. Cheng, Y. C. Lee [et al.] // J. Antimicrob. Chemother. – 2012. – Jan., vol. 67(1). – P. 222–225.
48. Coban, A. Y. Evaluation of blood agar medium for the growth of mycobacteria / A. Y. Coban, A. Akgüneş, B. Durupınar // Mikrobiyol. Bul. – 2011. – Oct., vol. 45(4). – P. 617–622.
49. Comparison of MALDI-TOF MS with HPLC and nucleic acid sequencing for the identification of Mycobacterium species in cultures using solid medium and broth / B. W. Buchan, K. M. Riebe, M. Timke [et al.] // Am. J. Clin. Pathol. – 2014. – Jan., Vol. 141(1). – P. 25–34.
50. Current significance of the Mycobacterium chelonae-abscessus group / R. S. Jones, K. L. Shier, R. N. Master [et al.] // Diagn. Microbiol. Infect. Dis. – 2019. – Jul., vol. 94(3). – P. 248–254.
51. Cystic fibrosis / F. Ratjen, S. C. Bell, S. M. Rowe [et al.]. – Text : electronic // Nat. Rev. Dis. Primers. – 2015. – May 14, vol. 1. – 15010. – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27189798/ (date of access: 09.10.2021).
52. Cystic fibrosis airway microbiota associated with outcomes of nontuberculous mycobacterial infection / L. J. Caverly, M. Zimbric, M. Azar [et al.]. – Text : electronic // ERJ Open Res. – 2021. – Apr. 19, vol. 7(2). – 00578-2020. – URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8053818/ (date of access: 09.10.2021).
53. Dai, J. Web-Accessible Database of hsp65 Sequences from Mycobacterium Reference Strains / J. Dai, Y. Chen, M. Lauzardo // J. Clin. Microbiol. – 2011. – Vol. 49(2011). – P. 2296–2303.
54. Daley, C. L. Pulmonary non-tuberculous mycobacterial infections / C. L. Daley, D. E. Griffith // Int. J. Tuberc. Lung. Dis. – 2010. – Vol. 14, N 6. – P. 665–671.
55. Decontamination Strategies Used for AFB Culture Significantly Reduce the Viability of Mycobacterium abscessus Complex in Sputum Samples from Patients with Cystic Fibrosis / D. Stephenson, A. Perry, A. Nelson [et al.]. – Text : electronic // Microorganisms. – 2021. – Jul. 27, vol. 9(8). – 1597. – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34442676/ (date of access: 09.10.2021).
56. Detection of rapidly growing mycobacteria in routine cultures of samples from patients with cystic fibrosis / CR. Jr. Esther CR, S. Hoberman, J. Fine [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2011. – Apr., vol. 49(4). – P. 1421–1425.
57. Dissemination of Mycobacterium abscessus via global transmission networks / C. Ruis, J. M. Bryant, S. C. Bell [et al.] // Nat. Microbiol. – 2021. – Oct., vol. 6(10). – P. 1279–1288.

58. Drancourt, M. Cost-effectiveness of blood agar for isolation of mycobacteria / M. Drancourt, D. Raoult. – Text : electronic // PLoS Negl. Trop. Dis. – 2007. – Nov. 28, vol. 1(2). – e83. – URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/ pubmed/18060087 (date of access: 16.11.2021).
59. Ecological Analyses of Mycobacteria in Showerhead Biofilms and Their Relevance to Human Health / M. J. Gebert, M. Delgado-Baquerizo, A. M. Oliverio [et al.]. – Text : electronic // mBio. – 2018. – Oct. 30, vol. 9(5). – e01614-18. – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30377276/ (date of access: 09.10.2021).
60. Edgar, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput / R. C. Edgar // Nucleic Acids Research. – 2004. – Vol. 32(5). – P. 1792–1797.
61. Elborn, J. S. Identification and management of unusual pathogens in cystic fibrosis / J. S. Elborn // J. R. Soc. Med. – 2008. – Jul., vol. 101, (suppl 1). – P. S2–S5.
62. Epidemic of postsurgical infections caused by Mycobacterium massiliense / R. S. Duarte, M. C. Lourenço, Lde S. Fonseca [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2009. – Jul., vol. 47(7). – P. 2149–2155.
63. Epidemiology of Nontuberculous Mycobacteria Infection in Children and Young People With Cystic Fibrosis: Analysis of UK Cystic Fibrosis Registry / A. I. Gardner, E. McClenaghan, G. Saint [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2019. – Feb. 15, vol. 68(5). – P. 731–737.
64. Epidemiology of Nontuberculous Mycobacteriosis / J. Adjemian, S. Daniel-Wayman, E. Ricotta [et al.] // Semin. Respir. Crit. Care Med. – 2018. – Jun., vol. 39(3). – P. 325–335.
65. Epidemiology of pulmonary disease due to nontuberculous mycobacteria in Southern China, 2013-2016 / Y. Tan, B. Su, W. Shu [et al.]. – Text : electronic // BMC Pulm. Med. – 2018. – Nov. 9, vol. 18(1). – 168. – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30413193/ (date of access: 09.10.2021).
66. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for identification and clustering of Neisseria gonorrhoeae / A. Carannante, E. De Carolis, P. Vacca [et al.] // BMC Microbiol. – 2015. – Jul. 24, vol. 15. – P. 142.
67. Evaluation of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nocardia species / A. Verroken, M. Janssens, C. Berhin [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2010. – Nov., vol. 48(11). – P. 4015–4021.
68. Evaluation of Various Culture Media for Detection of Rapidly Growing Mycobacteria from Patients with Cystic Fibrosis / C. L. Preece, T. A. Wichelhaus, A. Perry [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2016. – Jul., vol. 54(7). – P. 1797–1803.
69. Felsenstein, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap / J. Felsenstein // Evolution. – 1985. – Vol. 39. – P. 783–791.
70. Furukawa, B. S. Nontuberculous Mycobacteria in Cystic Fibrosis / B. S. Furukawa, P. A. Flume // Semin. Respir. Crit. Care Med. – 2018. – Jun., vol. 39(3). – P. 383–391.

71. Garrity, G. M. A New Genomics-Driven Taxonomy of Bacteria and Archaea: Are We There Yet? / G. M. Garrity // J. Clin. Microbiol. – 2016. – Aug., vol. 54(8). – P. 1956–1963.
72. Goldbart, A. Non-nuberculous mycobacteria infection treated with intermittently inhaled high-dose nitric oxide / A. Goldbart, D. Gatt, I. Golan Tripto. – Text : electronic // BMJ Case Rep. – 2021. – Oct. 28, vol. 14(10). – e243979. – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34711619/ (date of access: 09.11.2021).
73. Griffith, D. E. Clinical Features of Pulmonary Disease Caused by Rapidly Growing Mycobacteria: An Analysis of 154 Patients / D. E. Griffith, W. M. Girard, R. J. Wallace // Am. Rev. Respir. Dis. – 1993. – Vol. 147. – P. 1271–1278.
74. Gross, J. E. Prevention of transmission of Mycobacterium abscessus among patients with cystic fibrosis / J. E. Gross, S. L. Martiniano, J. A. Nick // Curr. Opin. Pulm. Med. – 2019. – Nov., vol. 25(6). – P. 646–653.
75. Gupta, R. S. Phylogenomics and Comparative Genomic Studies Robustly Support Division of the Genus Mycobacterium Into an Emended Genus Mycobacterium and Four Novel Genera / R. S. Gupta, B. Lo, J. Son. – Text : electronic // Front. Microbiol. – 2018. – Feb. 13, vol. 9 – 67. – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29497402/ (date of access: 09.10.2021).
76. Hill, U. G. Non-tuberculous mycobacteria in cystic fibrosis / U. G. Hill, R. A. Floto, C. S. Haworth // J. R. Soc. Med. – 2012. – Jun., vol. 105, suppl 2(Suppl 2). – P. S14–S18.
77. Hughes, D. A. Eradication success for non-tuberculous mycobacteria in children with cystic fibrosis / D. A. Hughes, I. Bokobza, S. B. Carr. – Text : electronic // Eur. Respir. J. – 2021. – May 27, vol. 57(5). – 2003636. – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33542059/ (date of access: 09.10.2021).
78. Identification of closely related Ixodes species by protein profiling with MALDI-TOF mass spectrometry / P. H. Boyer, L. Almeras, O. Plantard [et al.]. – Text : electronic // PLoS One. – 2019. – Oct. 17, vol. 14(10). – e0223735. – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31622384/ (date of access: 09.10.2021).
79. Identification of Nocardia species using matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight mass spectrometry / S. Segawa, M. Nishimura, K. Sogawa [et al.]. – Text : electronic // Clin. Proteomics. – 2015. – Mar. 7, vol. 12(1). – 6. – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25931991/ (date of access: 09.10.2021).
80. Improved Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS)-Based Identification of Mycobacterium spp. by Use of a Novel Two-Step Cell Disruption Preparatory Technique / J. A. O'Connor, M. Lynch-Healy, D. Corcoran [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2016. – Feb., vol. 54(2). – P. 495–496.
81. Inaccuracy of Single-Target Sequencing for Discriminating Species of the Mycobacterium abscessus Group / E. Macheras, A.-L. Roux, F. Ripoll [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2009. – Vol. 47, N 8. – P. 2596–2600.

82. Increasing reports of non-tuberculous mycobacteria in England, Wales and Northern Ireland, 1995-2006 / J. E. Moore, M. E. Kruijshaar, L. P. Ormerod [et al.]. – Text : electronic // BMC Public Health. – 2010. – Oct. 15, vol. 10. – 612. – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20950421/ (date of access: 09.10.2021).
83. Infections caused by Mycobacterium abscessus: epidemiology, diagnostic tools and treatment / F. Mougari, L. Guglielmetti, L. Raskine [et al.] // Expert. Rev. Anti. Infect. Ther. – 2016. – Vol. 14(12). – P. 1139–1154.
84. Kusunoki, S. Proposal of Mycobacterium peregrinum sp. nov., nom. rev., and elevation of Mycobacterium chelonae subsp. abscessus to species status: Mycobacterium abscessus comb. nov / S. Kusunoki, T. Ezaki // Int. J. Syst. Bacteriol. – 1992. – Apr., vol. 42(2). – P. 240–245.
85. Leung, J. M. Nontuberculous mycobacteria: the changing epidemiology and treatment challenges in cystic fibrosis / J. M. Leung, K. N. Olivier // Curr. Opin. Pulm. Med. – 2013. – Nov., vol. 19(6). – P. 662–669.
86. Long-term natural history of non-cavitary nodular bronchiectatic nontuberculous mycobacterial pulmonary disease / S. M. Moon, B. W. Jhun, S. Y. Baek [et al.] // Respir. Med. – 2019. – May, vol. 151. – P. 1–7.
87. MALDI Spectra Database for Rapid Discrimination and Subtyping of Mycobacterium kansasii / J. Murugaiyan, A. Lewin, E. Kamal [et al.]. – Text : electronic // Front Microbiol. – 2018. – Apr. 3, vol. 9. – 587. – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29670585/ (date of access: 09.10.2021).
88. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry can accurately differentiate between Mycobacterium masilliense (M. abscessus subspecies bolletii) and M. abscessus (sensu stricto) / S. H. Teng, C. M. Chen, M. R. Lee [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2013. – Sep., vol. 51(9). – P. 3113–3116.
89. Medical management of atraumatic Mycobacterium abscessus cutaneous infection: A case report / C. W. Tiong, T. Nack, A. Y. C. Tai [et al.]. – Text : electronic // J. Clin. Tuberc. Other Mycobact. Dis. – 2019. – Vol. 17. – 100132. – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31867443/ (date of access: 09.10.2021).
90. Medjahed, H. Mycobacterium abscessus: a new player in the mycobacterial field / H. Medjahed, J.-L. Gaillard, J.-M. Reyrat // Trends Microbiol. – 2019. – Vol. 18(3). – P. 117–123.
91. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms / S. Kumar, G. Stecher, M. Li [et al.] // Molecular Biology and Evolution. – 2018. – Vol. 35. – P. 1547–1549.
92. Microbial genomic taxonomy / C. C. Thompson, L. Chimetto, R. A. Edwards [et al.]. – Text : electronic // BMC Genomics. – 2013. – Dec. 23, vol. 14. – 913. – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24365132/ (date of access: 09.10.2021).
93. Molecular epidemiology of Mycobacterium abscessus, with focus on cystic fibrosis / B. E. Jonsson, M. Gilljam, A. Lindblad [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 207. – Vol. 45. – P. 1497–1504.

94. Molecular longitudinal tracking of Mycobacterium abscessus spp. during chronic infection of the human lung / K. M. Kreutzfeldt, P. R. McAdam, P. Claxton [et al.]. – Text : electronic // PLoS One. – 2013. – May 16, vol. 8(5). – e63237. – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23696800/ (date of access: 09.10.2021).
95. Moore, M. An Unusual Acid-Fast Infection of the Knee with Subcutaneous, Abscess-Like Lesions of the Gluteal Region / M. Moore, J. B. Frerichs // J. Investig. Dermatol. – 1953. – Vol. 20. – P. 133–169.
96. Multicenter cross-sectional study of nontuberculous mycobacterial infections among cystic fibrosis patients, Israel / I. Levy, G. Grisaru-Soen, L. Lerner-Geva [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2008. – Vol. 14. – P. 378–384.
97. Multicenter study of prevalence of nontuberculous mycobacteria in patients with cystic fibrosis in France / A. L. Roux, E. Catherinot, F. Ripoll [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2009. – Dec., vol. 47(12). – P. 4124–4128.
98. Multistate US Outbreak of Rapidly Growing Mycobacterial Infections Associated with Medical Tourism to the Dominican Republic, 2013-2014(1) / D. Schnabel, D. H. Esposito, J. Gaines [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2016. – Aug., vol. 22(8). – P. 1340–1347.
99. Mycobacterial genotypes are associated with clinical manifestation and progression of lung disease caused by Mycobacterium abscessus and Mycobacterium massiliense / S. J. Shin, G. E. Choi, S. N. Cho [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2013. – Jul., vol. 57(1). – P. 32–39.
100. Mycobacterium abscessus and children with cystic fibrosis / I. Sermet-Gaudelus, M. Le Bourgeois, C. Pierre-Audigier [et al.] // Emerg. Infect. Dis. –2003. – Dec., vol. 9(12). – P. 1587–1591.
101. Mycobacterium abscessus Complex Infections in Humans / M. R. Lee, W. H. Sheng, C. C. Hung [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2015. – Sep., vol. 21(9). – P. 1638–1646.
102. Mycobacterium abscessus complex: A Review of Recent Developments in an Emerging Pathogen / L. Victoria, A. Gupta, J. L. Gómez [et al.]. – Text : electronic // Front Cell. Infect. Microbiol. – 2021. – Apr. 26, vol. 11. – 659997. – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33981630/ (date of access: 09.10.2021).
103. Mycobacterium abscessus morphotype comparison in a murine model / L.J. Caverly, S. M. Caseres, C. Fratelli [et al.]. – Text : electronic // PLoS One. – 2015. – Feb. 12, vol. 10(2). – e0117657. – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25675351/ (date of access: 09.10.2021).
104. Mycobacterium abscessus Infection after Breast Lipotransfer: A Report of 2 Cases / I. Miguel Escuredo, E. Vicario Elorduy, L. Guío Carrión. – Text : electronic // Plast. Reconstr. Surg. Glob. Open. – 2020. – Aug. 19, vol. 8(8). – e3063. – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32983807/ (date of access: 09.10.2021).
105. Mycobacterium abscessus, a taxonomic puzzle / E. Tortoli, T. A. Kohl, B. A. Brown-Elliott [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2018. – Jan., vol. 68(1). – P. 467–469.

106. Mycobacterium abscessus, an Emerging and Worrisome Pathogen among Cystic Fibrosis Patients / G. Degiacomi, J. C. Sammartino, L. R. Chiarelli [et al.]. – Text : electronic // Int. J. Mol. Sci. – 2019. – Nov. 22, vol. 20(23). – 5868. – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31766758/ (date of access: 16.11.2021).
107. Mycobacterium abscessus: Environmental Bacterium Turned Clinical Nightmare / R. C. Lopeman, J. Harrison, M. Desai [et al.]. – Text : electronic // Microorganisms. – 2019. – Mar. 22, vol. 7(3). – 90. – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30909391/ (date of access: 16.11.2021).
108. Mycobacterium abscessus-Bronchial Epithelial Cells Cross-Talk Through Type I Interferon Signaling / C. Zhang, H. Asif, G. E. Holt [et al.]. – Text : electronic // Front Immunol. – 2019. – Dec. 9, vol. 10. – 2888. – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31921151/ (date of access: 16.11.2021).
109. Mycobacterium bourgelatii sp. nov., a rapidly growing, non-chromogenic species isolated from the lymph nodes of cattle / V. Guerin-Faublee, J. P. Flandrois, C. Pichat [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2013. – Dec., vol. 63(Pt 12). – P. 4669–4674.
110. Mycobacterium celeriflavum sp. nov., a scotochromogenic rapid grower isolated from clinical specimens / A. H. Shahraki, C. Çavuşoğlu, E. Borroni [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2015. – Feb., vol. 65(Pt 2). – P. 510–515.
111. Mycobacterium chelonae-abscessus complex associated with sinopulmonary disease, northeastern U.S.A. / K. E. Simmon, B. A. Brown-Elliott, P. G. Ridge [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2011. – Vol. 17. – P. 1692–1700.
112. Mycobacterium iranicum sp. nov., a rapidly growing scotochromogenic species isolated from clinical specimens on three different continents / H. Shojaei, C. Daley, Z. Gitti [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2013. – Apr., vol. 63(Pt 4). – P. 1383–1389.
113. Mycobacterium litorale sp. nov., a rapidly growing mycobacterium from soil / Y. Zhang, J. Zhang, C. Fang [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2012. – May, vol. 62(Pt 5). – P. 1204–1207.
114. Mycobacterium neoaurum and Mycobacterium bacteremicum sp. nov. as causes of mycobacteremia / B. A. Brown-Elliott, RJ. Jr. Wallace, C. A. Petti [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2010. – Vol. 48. – P. 4377–4385.
115. Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis / J. A. Nick, C. L. Daley, P. M. Lenhart-Pendergrass [et al.] // Curr. Opin. Pulm. Med. – 2021. – Nov. 1, vol. 27(6). – P. 586–592.
116. Nontuberculous mycobacteria in cystic fibrosis associated with allergic bronchopulmonary aspergillosis and steroid therapy / H. Mussaffi, J. Rivlin, I. Shalit [et al.] // Eur. Respir. J. – 2005. – Vol. 25. – P. 324–328.
117. Nontuberculous mycobacteria in Denmark, incidence and clinical importance during the last quarter-century / T. S. Hermansen, P. Ravn, E. Svensson [et al.]. – Text : electronic // Sci. Rep. – 2017. – Vol. 7(1). – 6696. – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28751677/ (date of access: 16.11.2021).
118. Nontuberculous mycobacteria. I: multicenter prevalence study in cystic fibrosis / K. N. Olivier, D. J. Weber, R. J. Wallace [et al.] // Am. J. Respir. Crit. Care Med. – 2003. – Vol. 167. – P. 828–834.

119. Nontuberculous mycobacterial disease in adult cystic fibrosis patients / M. L. Aitken, W. Burke, G. McDonald [et al.] // Chest. – 1993. – Vol. 103. – P. 1096–1099.
120. Nontuberculous mycobacterial infection in young children with cystic fibrosis / CR. Jr. Esther, M. M. Henry, P. L. Molina [et al.] // Pediatr. Pulmonol. – 2005. – Vol. 40. – P. 39–44.
121. Non-tuberculous mycobacterial infections-A neglected and emerging problem / I. Ahmed, S. Tiberi, J. Farooqi [et al.] // Int. J. Infect. Dis. – 2020. – Mar., vol. 92. – P. S46–S50.
122. Of tuberculosis and non-tuberculous mycobacterial infections - a comparative analysis of epidemiology, diagnosis and treatment / R. Gopalaswamy, S. Shanmugam, R. Mondal [et al.]. – Text : electronic // J. Biomed. Sci. – 2020. – Jun. 17, vol. 27(1). – 74. – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32552732/ (date of access: 16.11.2021).
123. Opportunistic Pathogens Enriched in Showerhead Biofilms / L. M. Feazel, L. K. Baumgartner, K. L. Peterson [et al.] // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2009. – Vol. 106. – P. 16393–16399.
124. Optimization of modified Middlebrook 7H11 agar for isolation of Mycobacterium bovis from raw milk cheese / R. Forgrave, J. A. Donaghy, A. Fisher [et al.] // Lett. Appl. Microbiol. – 2014. – Oct., vol. 59(4). – P. 384–390.
125. Piersimoni, C. Pulmonary infections associated with non-tuberculous mycobacteria in immunocompetent patients / C. Piersimoni, C. Scarparo // Lancet Infect. Dis. – 2008. – Vol. 8(2008). – P. 323–334.
126. Porvaznik, I. Non-Tuberculous Mycobacteria: Classification, Diagnostics, and Therapy / I. Porvaznik, I. Solovič, J. Mokrý // Adv. Exp. Med. Biol. – 2017. – Vol. 944. – P. 19–25.
127. Prevalence of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease, Germany, 2009–2014 / F. C. Ringshausen, D. Wagner, A. de Roux [et al.] // Emerging Infectious Diseases. – 2016. – Jun., vol. 22(6). – P. 1102–1105.
128. Prevalence, incidence, and mortality of nontuberculous mycobacterial infection in Korea: a nationwide population-based study / S. C. Park, M. J. Kang, C. H. Han [et al.]. – Text : electronic // BMC Pulm. Med. – 2019. – Aug. 1, vol. 19(1). – 140. – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31370826/ (date of access: 16.11.2021).
129. Proportions of Mycobacterium massiliense and Mycobacterium bolletii Strains among Korean Mycobacterium chelonae-Mycobacterium abscessus Group Isolates / H.-Y. Kim, Y. Kook, Y.-J. Yun [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2008. – Vol. 46, N 10. – P. 3384–3390.
130. Prospective study of mycobacterial infections in patients with cystic fibrosis / L. Hjelte, B. Petrini, G. Kallenius [et al.] // Thorax. – 1990. – Vol. 45. – P. 397–400.
131. Pulmonary isolation and clinical relevance of nontuberculous mycobacteria during nationwide survey in Serbia, 2010-2015 / I. Dakić, I. Arandjelović, B. Savić [et al.]. – Text : electronic // PLoS One. – 2018. – Nov. 21, vol. 13(11). – e0207751. – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30462740/ (date of access: 16.11.2021).
132. Pulmonary nontuberculous mycobacterial disease, Ontario, Canada, 1998-2010 / T. K. Marras, D. Mendelson, A. Marchand-Austin [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2013. – Nov., vol. 19(11). – P. 1889–1891.

133. Rapid Detection of Salmonella Enteritidis, Typhimurium, and Thompson by Specific Peak Analysis Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry / S. M. Yang, E. Kim, D. Kim [et al.]. – Text : electronic // Foods. – 2021. – Apr. 23, vol. 10(5). – 933. – URL: https://pubmed.ncbi. nlm.nih. gov/ 33922774/ (date of access: 16.11.2021).
134. Rapid identification and typing of listeria species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry / S. B. Barbuddhe, T. Maier, G. Schwarz [et al.] // Appl. Environ. Microbiol. – 2008 Sep., vol. 74(17). – P. 5402–5407.
135. Rapid MALDI-TOF mass spectrometry strain typing during a large outbreak of Shiga-Toxigenic Escherichia coli / M. Christner, M. Trusch, H. Rohde [et al.]. – Text : electronic // PLoS One. – 2014. – Jul. 8, vol. 9(7). – e101924. – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25003758/ (date of access: 16.11.2021).
136. Rapidly growing mycobacterial bloodstream infections / El. G. Helou, G. M. Viola, R. Hachem [et al.] // Lancet Infect. Dis. – 2013. – Feb., vol. 13(2). – P. 166–174.
137. Renna, M. Azithromycin blocks autophagy and may predispose cystic fibrosis patients to mycobacterial infection / M. Renna, C. Schaffner, K. Brown // J. Clin. Invest. – 2011. – Vol. 121. – P. 3554–3563.
138. 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 [et al.] // Int. J. Syst. Evol. Microbiol. – 2006. – Vol. 56. – P. 133–143.
139. Ryan, K. J. Sherris Medical Microbiology / K. J. Ryan, C. G. Ray. – 4th. – McGraw–Hill Medical, 2004. – 954 p.
140. Saitou, N. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees / N. Saitou, M. Nei // Molecular Biology and Evolution. –1987. – Vol. 4. – P. 406–425.
141. Sakatani, M. Nontuberculosis mycobacteriosis: the present status of epidemiology and clinical studies / M. Sakatani // Kekkaku. – 1999. – Vol. 74. – P. 377–384.
142. Sandrin, T. R. MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: A review / T. R. Sandrin, J. E. Goldstein, S. Schumaker // Mass Spectrom. Rev. – 2013. – Vol. 32, N 3. – P. 188–217.
143. Sood, G. Outbreaks of nontuberculous mycobacteria / G. Sood, N. Parrish // Curr. Opin. Infect. Dis. – 2017. – Vol. 30. – P. 404–409.
144. Sopko, J. A. Pulmonary disease due to Mycobacterium chelonei subspecies abscessus: A report of four cases / J. A. Sopko, J. Fieselmann, J. E. Kasik // Tubercle. – 1980. – Vol. 61. – P. 165–169.
145. Species Distribution and Isolation Frequency of Nontuberculous Mycobacteria, Uruguay / G. Greif, C. Coitinho, J. van Ingen [et al.] // Emerg. Infect. Dis. – 2020. – May, vol. 26(5). – P. 1014–1018.
146. Species identification of Mycobacterium abscessus subsp. abscessus and Mycobacterium abscessus subsp. bolletii using rpoB and hsp65, and susceptibility testing to eight antibiotics / W. Nie, H. Duan, H. Huang [et al.] // International Journal of Infectious Diseases. – 2014. – Vol. 25. – P. 170–174.

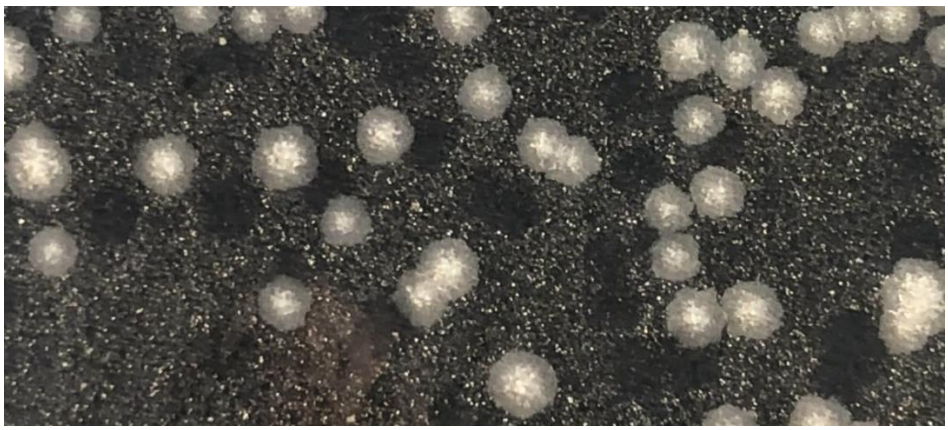
147. The distinct fate of smooth and rough Mycobacterium abscessus variants inside macrophages / A. L. Roux, A. Viljoen, A. Bah [et al.]. – Text : electronic // Open Biol. – 2016. – Nov., vol. 6(11). – 160185. – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27906132/ (date of access: 16.11.2021).
148. The epidemiology of nontuberculous mycobacterial pulmonary disease in the Netherlands / J. A. Schildkraut, S. M. H. Zweijpfenning, M. Nap [et al.]. – Text : electronic // ERJ Open Res. – 2021. – Jul. 12, vol. 7(3). – 00207-2021. – URL: https://www.researchgate.net/publication/352499747 (date of access: 16.11.2021).
149. The epidemiology of pulmonary nontuberculous mycobacteria: data from a general hospital in Athens, Greece, 2007-2013 / M. Panagiotou, A. I. Papaioannou, K. Kostikas [et al.]. – Text : electronic // Pulm. Med. – 2014. – Vol. 2014. – 894976. – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25132991/ (date of access: 16.11.2021).
150. The importance of early diagnosis of Mycobacterium abscessus complex in patients with cystic fibrosis / C. Ravnholt, M. Kolpen, M. Skov [et al.] // APMIS. – 2018. – Dec., vol. 126(12). – P. 885–891.
151. The influence of culture conditions on the identification of Mycobacterium species by MALDI-TOF MS profiling / T. Balážová, J. Makovcová, O. Šedo [et al.] // FEMS Microbiol. Lett. – 2014. – Apr., vol. 353(1). – P. 77–84.
152. The respiratory microbiome and nontuberculous mycobacteria: an emerging concern in human health / C. S. Thornton, M. Mellett, J. Jarand [et al.]. – Text : electronic // Eur. Respir. Rev. – 2021. – May 25, vol. 30(160). – 200299. – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34039671/ (date of access: 16.11.2021).
153. Tortoli, E. Clinical manifestations of nontuberculous mycobacteria infections / E. Tortoli // Clin. Microbiol. Infect. – 2009. – Oct., vol. 15(10). – P. 906–910.
154. Tortoli, E. Emended description of Mycobacterium abscessus, Mycobacterium abscessus subsp. abscessus and Mycobacterium abscessus subsp. bolletii and designation of Mycobacterium abscessus subsp. massiliense comb. nov / E. Tortoli, T. A. Kohl, B. A. Brown-Elliot // Int. J. Syst. Evolut. Microbiol. – 2016. – Vol. 66. – P. 4471–4479.
155. Tortoli, E. Impact of genotypic studies on mycobacterial taxonomy: the new mycobacteria of the 1990s / E. Tortoli // Clin. Microbiol. Rev. – 2003. – Vol. 16(2). – P. 319–354.
156. Treatment of Nontuberculous Mycobacterial Pulmonary Disease: An Official ATS/ERS/ESCMID/IDSA Clinical Practice Guideline / C. L. Daley, J. M. Iaccarino, C. Lange [et al.] // Clin. Infect. Dis. – 2020. – Aug. 14. – vol. 71(4). – P. 905–913.
157. Unique Features of Mycobacterium abscessus Biofilms Formed in Synthetic Cystic Fibrosis Medium / J. M. Belardinelli, W. Li, C. Avanzi [et al.]. – Text : electronic // Front Microbiol. – 2021. – Oct. 29, vol. 12. – 743126. – URL: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34777289/ (date of access: 16.11.2021).
158. Vouga, M. Emerging bacterial pathogens: the past and beyond / M. Vouga, G. Greub // Clin. Microbiol. Infect. – 2016. – Jan., vol. 22(1). – P. 12–21.

159. Whole-genome sequencing to identify transmission of Mycobacterium abscessus between patients with cystic fibrosis: a retrospective cohort study / J. M. Bryant, D. M. Grogono, D. Greaves [et al.] // Lancet. – 2013. – May 4, vol. 381(9877). – P. 1551–1560.
160. Zemanick, E. T. Cystic Fibrosis: Microbiology and Host Response / E. T. Zemanick, L. R. Hoffman // Pediatr. Clin. North Am. – 2016. – Aug., vol. 63(4). – P. 617–636.

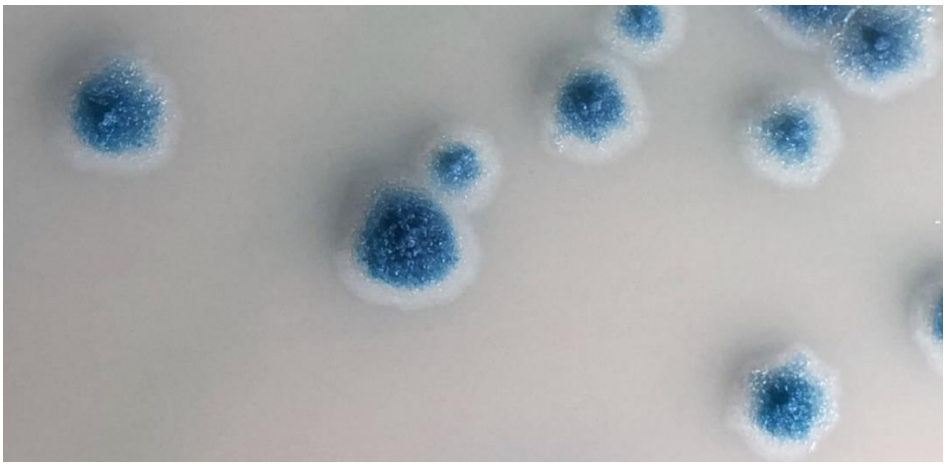
Приложение 1.

Вариант S формы колоний представителей MABSc, выделенных на среде для выделения BCC

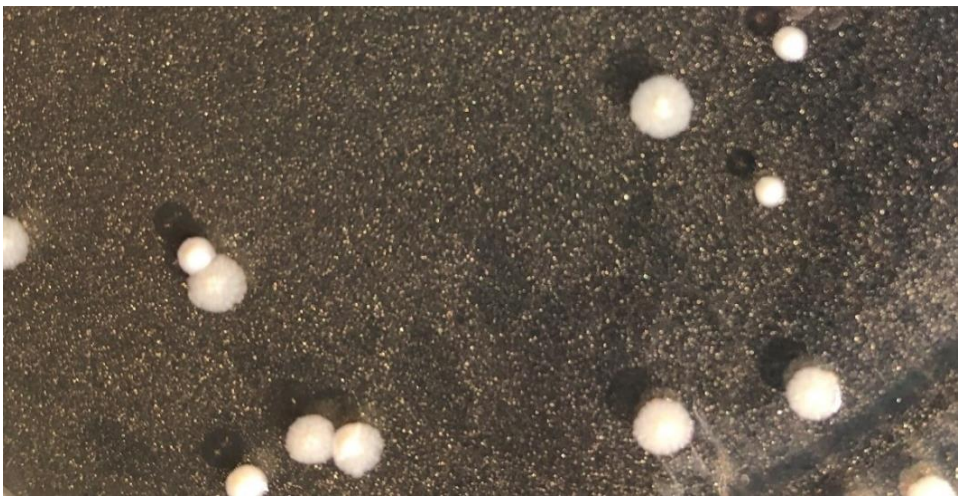
Вариант S формы колоний представителей MABSc, выделенных на хромогенной среде



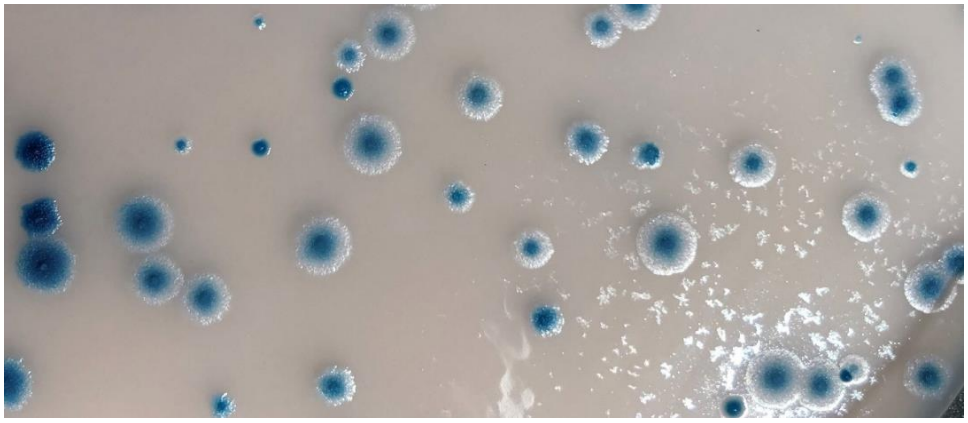
Вариант R формы колоний представителей MABSc, выделенных на среде для выделения BCC



Вариант R формы колоний представителей MABSc, выделенных на хромогенной среде

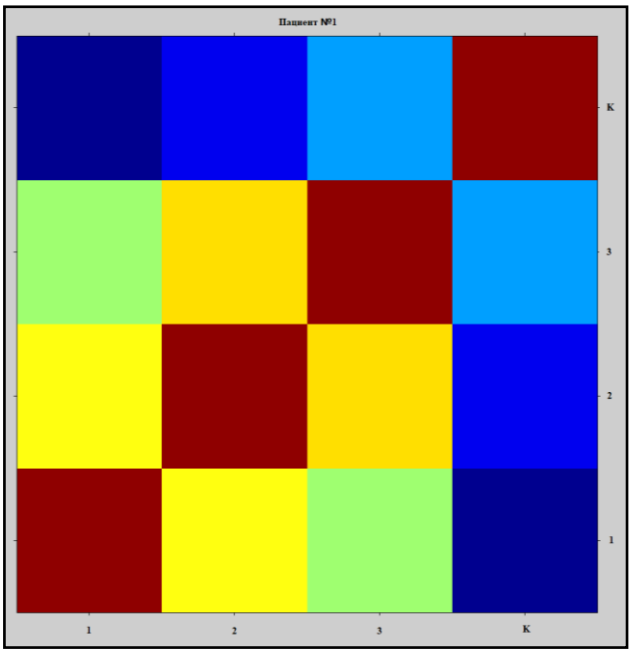


Вариант R и S формы колоний представителей MABSc, выделенных на среде для выделения BCC

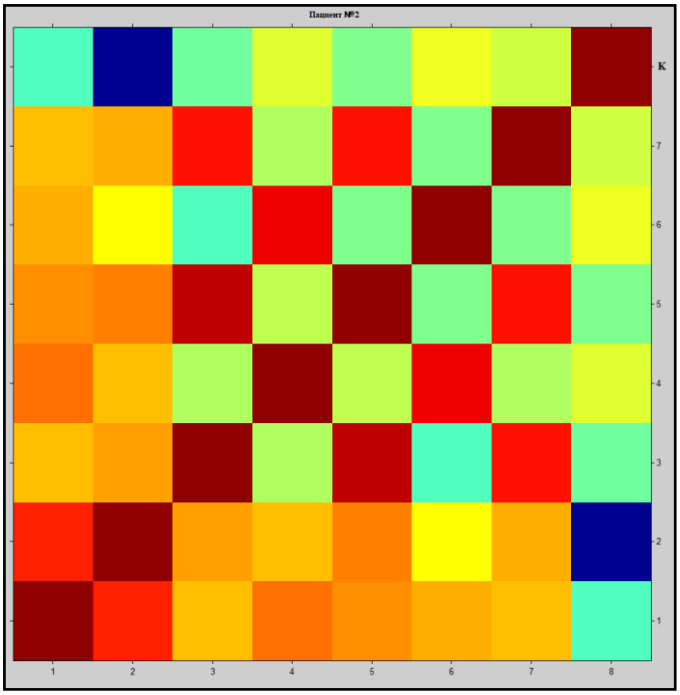


Вариант R и S формы колоний представителей MABSc, выделенных на хромогенной среде

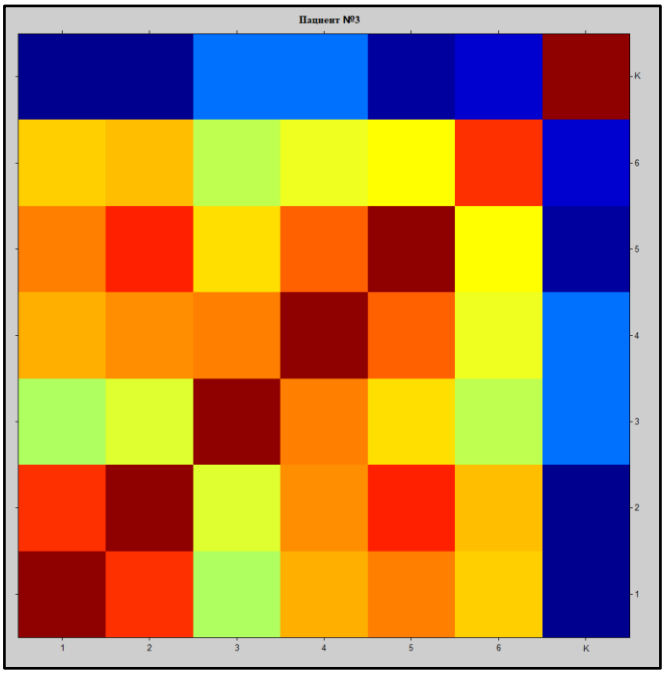
Приложение 2



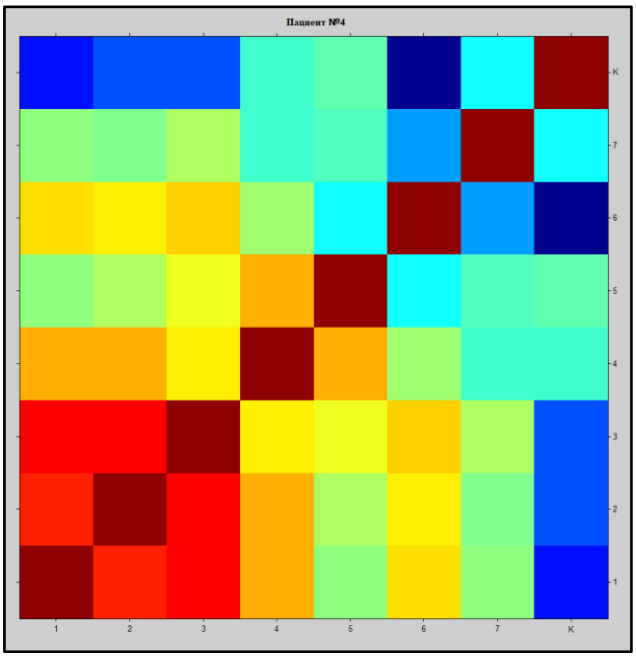
CCI матрица в виде «тепловой карты» пациента №1, K – контрольный штамм



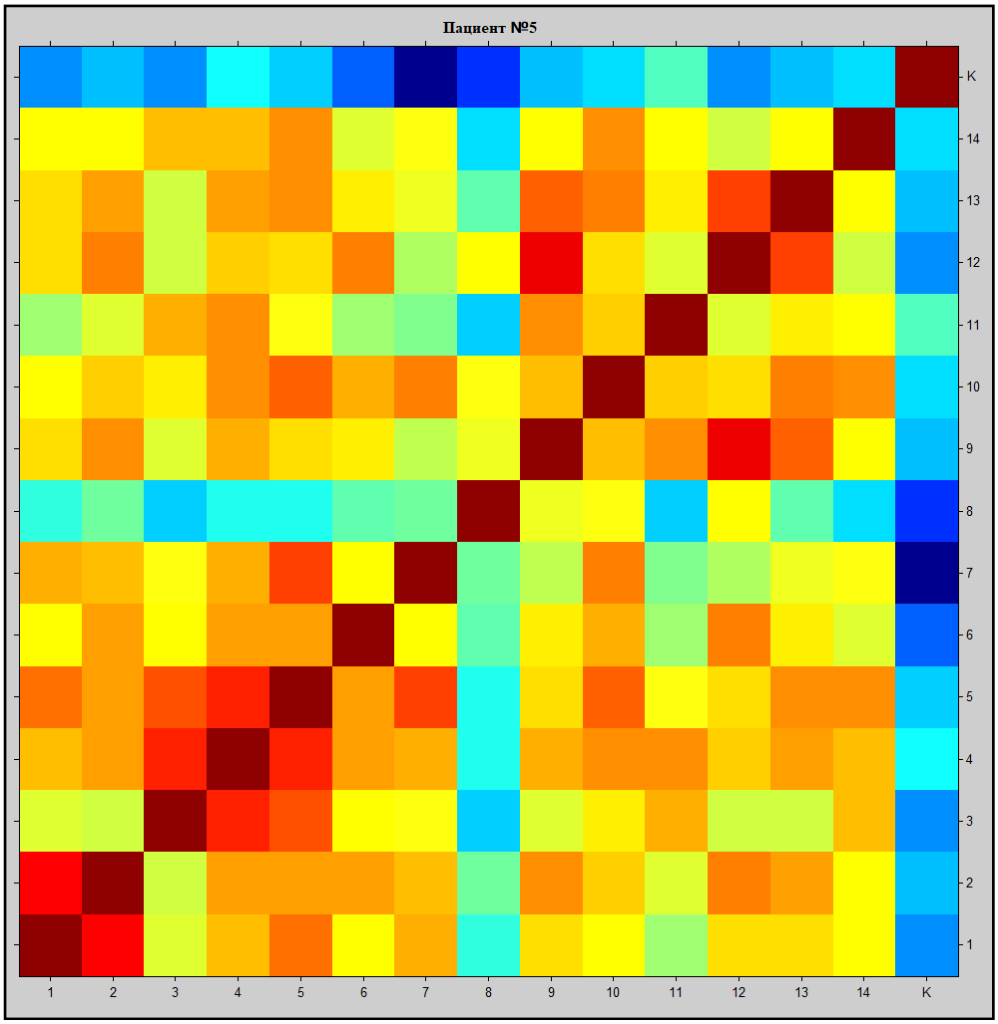
CCI матрица в виде «тепловой карты» пациента №2, K – контрольный штамм



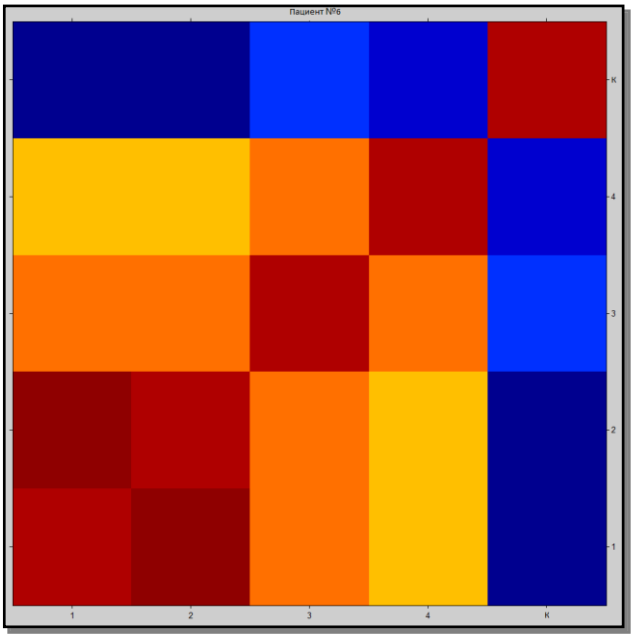
CCI матрица в виде «тепловой карты» пациента №3, K – контрольный штамм



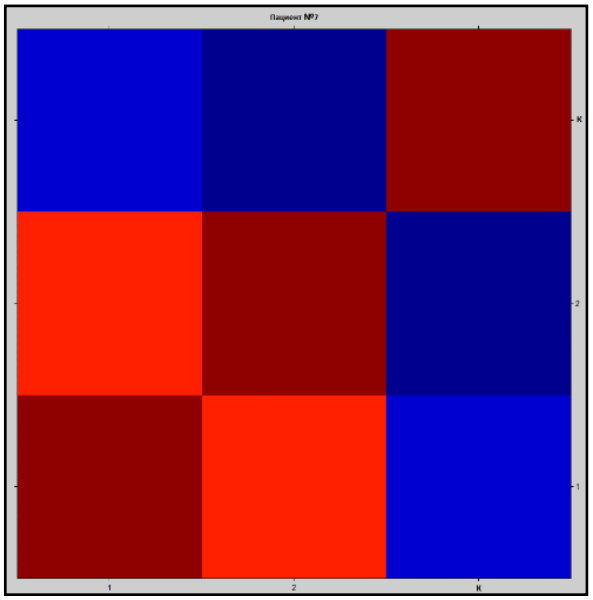
CCI матрица в виде «тепловой карты» пациента №4, K – контрольный штамм



CCI матрица в виде «тепловой карты» пациента №5, K – контрольный штамм



CCI матрица в виде «тепловой карты» пациента №6, К – контрольный штамм



CCI матрица в виде «тепловой карты» пациента №7, К – контрольный штамм

9 785604 517970