

**АКАДЕМІЯ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ**  
**ІНСТИТУТ ФТИЗІАТРІЇ І ПУЛЬМОНОЛОГІЇ**  
**ІМ. Ф.Г. ЯНОВСЬКОГО АМН УКРАЇНИ**

**ДИФЕРЕНЦІАЦІЯ МІКОБАКТЕРІЙ КОМПЛЕКСУ**

**MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS**

*(використання біохімічних тест-наборів Microxpress виробництва Tulip  
Diagnostics (p) LTD.)*

*(методичні рекомендації)*

Київ 2006

“УЗГОДЖЕНО”  
Начальник лікувально-  
організаційного управління  
АМН України,

“УЗГОДЖЕНО”  
Начальник відділу  
соціально небезпечних хвороб  
Департаменту державного санітарно-  
епідеміологічного нагляду МОЗ  
України

проф. В.В. Лазоришинець  
“\_\_\_\_\_” червня 2006 р.

Федько О.А.  
“\_\_\_\_\_” червня 2006 р.

**Заклад-розробник:**

Інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф.Г. Яновського АМН України

**Укладачі:**

**Фещенко Ю.І.**, д-р мед. наук, академік АМН України,  
професор, тел. 275-04-02

**Журило О.А.**, д-р мед. наук, тел. 275-54-30

**Барбова А.І.**, канд. мед. наук, ст. наук. співроб., тел. 275-54-30

**Пельо В.В.**, лікар-епідеміолог, тел. 275-54-30

**Миронченко С.В.**, мол. наук. співроб., тел. 275-55-11

**Трофімова П.С.**, мол. наук. співроб., тел. 275-55-11

**Пустовалова А.О.**, мол. наук. співроб., тел. 275-55-11

**Рецензенти:** *д-р мед. наук*  
*д-р мед. наук*

**Черенько С.О.**  
**Поліщук О.І.**

*Голова профільної проблемної комісії МОЗ та АМН України –  
академік АМН України, професор Ю.І. Фещенко*

*Голова експертної комісії – доктор медичних наук,  
професор В.М. Мельник*

Київ 2006

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

- КСБ – кислотостійки бактерії  
МС – медикаментозна стійкість  
ТСН – гідрозид тіофен-2-карбоксилової кислоти

## ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
1 Ідентифікація виділених культур мікобактерій.....	4
1.1 Систематика кислотостійких бактерій (група 21 – мікобактерії).....	4
1.2 Комплекс <i>M. tuberculosis</i> .....	4
1.3 Атипові мікобактерії.....	5
2 Диференціація мікобактерій.....	8
2.1 Попередня ідентифікація комплексу <i>M. tuberculosis</i> .....	8
Виявлення корд-фактору.....	9
2.2 Основні біохімічні тести ідентифікації <i>M.tuberculosis</i> .....	10
2.3 Ключові тести для окремих видів мікобактерій.....	10
Ніациновий тест .....	12
Визначення нітратредуктазної активності .....	15
Каталазний тест.....	18
Реакція гідролізу твіну-80.....	21
Тест із саліциловокислим натрієм (саліциловий тест).....	23
Тест із паранітробензойною кислотою (PNB-тест).....	24
Піразинамідазний тест.....	24
Тест із 5% хлоридом натрію.....	24
Тест із гідрозидом тіофен-2-карбоксилової кислоти (ТСН).....	24
РЕЗЮМЕ.....	26
Перелік літературних джерел.....	26

## ВСТУП

Виявлення кислотостійких бактерій (КСБ) в мазках мокротиння у пацієнтів із клінічними і рентгенологічними ознаками на туберкульоз служить підставою для проведення організаційних заходів і для призначення хворому протитуберкульозної хіміотерапії вже в перші 24 – 48 годин після одержання результатів дослідження мазка. Виявлення КСБ в мазках у період епідемії туберкульозу має звичайно більше діагностичне значення, ніж у період її спаду. При правильній організації і проведенні протиепідемічних заходів неминуче буде спостерігатись спад епідемії туберкульозу. Проте доведено, що в будь-якій епідемічній ситуації, виявлення у пацієнта КСБ не завжди служить бактеріологічним підтвердженням діагностики туберкульозу. Останнє залежить від того, як часто виділяються нетуберкульозні бактерії. Варто звернути увагу, що у ВІЛ-інфікованих осіб нерідко розвиваються супутні захворювання, які викликані комплексом *M. avium* та іншими нетуберкульозними мікобактеріями.

Диференціація *M. tuberculosis* від інших мікобактерій – це складна і важлива робота, оскільки тільки туберкульоз передається від людини людині. В економічно розвинених країнах Європи в даний час застосовують спеціальні дослідження. Це, наприклад, ДНК-РНК гібридизація з ростом культури в ВАСТЕС 7Н12 (середовище 12 В) чи тест із р-нітро- $\alpha$ -ацетил-аміно- $\beta$ -гідроксипропіофенолом у тій же культурі. Ці високоспецифічні і чутливі тести дають відповідь про належність культури до комплексу *M. tuberculosis* (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, у тому числі БЦЖ, *M. africanum* і *M. microti*). Тому диференціація істинних *M. tuberculosis* від інших представників цього комплексу вимагає проведення додаткових біохімічних тестів.

### 1 Ідентифікація виділених культур мікобактерій

#### 1.1 Систематика кислотостійких бактерій (група 21 – мікобактерії)

##### 1.1 Комплекс *M. tuberculosis*

У сучасній бактеріології ідентифікація мікобактерій представляє великі труднощі. З одного боку, в результаті інтенсивної і тривалої хіміотерапії туберкульозу змінилася морфологія збудника. З іншого боку, частішими стали випадки виділення з патологічного матеріалу атипичних мікобактерій. У практичних лабораторіях для диференціації *M. tuberculosis* від інших КСБ необхідно застосовувати найбільш прості і доступні тести, що включають бактеріологічні і біохімічні дослідження.

За останнім виданням Берджі (9 видання) група 21(мікобактерії) включає 45 видів, з яких більшість являється сапрофітами, непатогенними для людини. Поряд із цим, ряд видів може викликати ураження легень, лімфатичних вузлів та інших органів. Найбільш патогенними для людини є *M. tuberculosis* і *M. bovis*.

**M. tuberculosis** – збудник туберкульозу у людей. Ці мікобактерії дають первинний ріст при посіві патологічного матеріалу від 3-х тижнів до 2-х місяців, рідко – до 2,5 місяців. Пасажні культури ростуть швидше. Ріст на щільному яєчному середовищі, що містить гліцерин, рясний: культури ростуть у виді шорстких R-колоній, але можуть бути гладенькими, що зливаються між собою (S-варіант), мають кремовий відтінок. На рідкому живильному середовищі *M. tuberculosis* утворюють плівку на поверхні, у молодих культурах – тонку, у старих – зморшкувату, грубу, а іноді навіть дають придонний крихкуватий ріст. Температурний оптимум 37-38 °С. При 22 °С і 45 °С не ростуть. Морфологічно в мазку, забарвленому за Цілем-Нільсенем, *M. tuberculosis*, що виростили на яєчних середовищах, постають у вигляді поліморфних тонких спирто-, луго-, кислотостійких паличок, часто зігнутих, що лежать під кутом одна до одної, а іноді можна навіть бачити невеликі скупчення у вигляді так званих “кіс” (часточки від мікроколоній).

**M. bovis** – мікобактерії, що викликають туберкульоз у великої рогатої худоби, рідко у людей, трохи коротші, з менш вираженою схильністю до розгалуження, морфологічні відмінності від *M. tuberculosis* не виражені. Культуральні властивості також подібні, однак на штучних середовищах ростуть повільніше і тільки при температурі 37 – 38 °С. У первинних культурах і на середовищах, що не містять пірувату, відзначають бідний ріст; колонії дрібні, плоскі, шорсткуваті. Концентрація гліцерину в середовищі більше ніж 0,75 % впливає негативно на швидкість розмноження *M. bovis*. Колонії не мають пігменту, вони - білого або сірого кольору. Бактеріоскопічно відрізнити їх від *M. tuberculosis* не представляється можливим. Морфологічно і культурально подібні з *M. africanum* і BCG.

**M. africanum** – основний збудник туберкульозу в Африці. Справжнє поширення збудника визначити складно, тому що в багатьох лабораторіях його не ідентифікують, або плутають з *M. bovis*.

### 1.3 Атипові мікобактерії

В даний час атипові мікобактерії привертають все більшу увагу бактеріологів і клініцистів. Атипові мікобактерії характеризуються широким спектром медикаментозної стійкості (МС) і потенційною патогенністю для людини і тварин.

При виділенні з патологічного матеріалу хворих атипових мікобактерій важливо встановити значення їх у патології. Особливої уваги заслуговують випадки повторного виділення з патологічного матеріалу атипових культур при відсутності в досліджуваному матеріалі *M. tuberculosis*. Атипові мікобактерії відрізняються від *M. tuberculosis* рядом ознак в залежності від їх таксономічної належності. Для систематизації атипових мікобактерій користуються класифікацією Раньона, заснованою, головним чином, на двох ознаках - швидкості росту і пігментоутворенні. За цим угрупованням всі атипові мікобактерії розділені

на 4 групи. Представники перших 3-х груп ростуть повільно, 4-ї групи ростуть швидко. Найбільш патогенні для людини мікобактерії I і III груп.

**I група - фотохромогенні мікобактерії: *M. kansasii*, *M. marinum* (*M. balnei*), *M. simiae*, *M. szulgai*.** Кислотостійкі палички; при культивуванні звичайно утворюють жовто-жовтогарячий пігмент; колонії виростають протягом 2 тижнів при температурі 37 °C і протягом 3 тижнів – при кімнатній температурі. При культивуванні на світлі пігментоутворюючі штами дають більш інтенсивне червоно-жовтогаряче забарвлення колоній. Молоді клітини довгі і порівняно широкі, розташовуються стрічками; утворюють S- і R-колонії. Типовий вид – *M. kansasii*.

***M. kansasii*.** Утворюють пігмент (кристали β-каротину) тільки при рості на світлі. По ступеню шорсткості колоній штами варіюють від SR до RS, але можуть бути повністю шорсткуватими (R). Для ідентифікації кристалів каротину рекомендується вивчення колоній під малим збільшенням (30 – 100), їхня наявність – чітка ознака, що відокремлює *M. kansasii* (а також *M. marinum*) від інших видів. У людини викликають туберкульозоподібні ураження легень, найбільш часто спостерігають шийні лімфаденіти (скрофули) і ураження шкіри, рідше, особливо в ослаблених пацієнтів, дисеміновані ураження.

***M. marinum*.** Частіше утворюють S-колонії, відмінна риса – прискорений ріст при температурі 30-33 °C і повна його відсутність при 37 – 40 °C. Швидкість росту у різних штамів варіює від 5 до 15 діб. До 30,0 % штамів дають слабо позитивний ніациновий тест. У людини найбільш часто викликає ураження верхніх і нижніх кінцівок.

**II група - скотохромогенні мікобактерії: *M. scrofulaceum*; *M. aquae* (*M. gordonae*) - *M. aquae* I типу – “водопровідні мікобактерії”, *M. aquae* II типу – *M. gordonae*; *M. flavescens*.** Варіабельні кислотостійкі палички, частіше утворюють S-колонії, плоскі чи з гострою верхівкою, у пігментоутворюючих штамів колонії забарвлені в жовто-жовтогарячі тони, незалежно від культивування на світлі чи в темряві (забарвлення на світлі більш інтенсивне).

***M. scrofulaceum*.** Умовно-патогенні мікобактерії, що повільно ростуть, через 2 тижні утворюють жовті колонії. Мікроколонії округлі, утворені безладно розташованими паличками (як купка висипаних сірників). Викликають у дітей ураження лімфовузлів і легень. За характером росту і морфологією нагадують сапрофіти *M. aquae* (*M. gordonae*) і *M. flavescens*. Для їхньої диференціальної діагностики звичайно використовують тести стійкості до 5,0 % розчину NaCl, гідролізу твін-80 і відновлення нітратів, а також амідазний тест, що диференціює *M. aquae* I типу («водопровідні» мікобактерії) і *M. aquae* II типу (*M. gordonae*).

**III група - нефотохромогенні мікобактерії: *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. xenopi*, *M. haemophilum*.**

Видимий ріст культур виявляється вже через 5 – 10 діб і більше, звичайно утворюють кремові, іноді напівпрозорі, гладенькі S-колонії, що добре емульгуються у воді. При старінні культур колонії деяких штамів можуть набувати жовтогарячого забарвлення (пігментація не залежить від експозиції на світлі). Ніациновий тест негативний.

**M. avium.** Морфологічно і культурально аналогічна *M. intracellulare* і утворює з нею комплекс *avium-intracellulare*. Морфологічно представлені тонкими, слабо гіллястими паличками, мікроколонії зірчасті, що трансформуються в округлі утворення з безладно розташованими бактеріями. В умовах лабораторії диференціювати *M. avium* і *M. intracellulare* важко. Перша добре росте при температурі 45 °С, а друга не дає росту протягом 3 тижнів. Від сапрофітних видів їх диференціюють по стійкості до 5,0 % розчину NaCl і нездатності гідролізувати твін-80. Лікування уражень, викликаних комплексом *avium-intracellulare*, представляє велику проблему, в порівнянні з іншими туберкульозоподібними ураженнями, тому що збудники виявляють множинну хіміорезистентність.

**M. xenopi.** Молоді культури ростуть у вигляді непігментованих колоній, пізніше з'являється пігмент жовтого кольору. Морфологічно - довгі ниткоподібні палички. Ростуть при 40-45 °С, умовно-патогенні для людини.

**M. haemophilum.** Виявляє унікальну для мікобактерій здатність до росту на 5,0 % кров'яному агарі (також на середовищі Левенштейна-Єнсена, доповненому 2,0 % цитратом амонійного заліза). Викликає рідкі випадки гнійних лімфаденітів у дорослих осіб з імунодефіцитами та у дітей без імунодефіциту.

**IУ група – мікобактерії, що швидко ростуть: M. phlei, M. smegmatis, M. malmoense, M. chelonae (M. abscessus), M. fortuitum (M. minetti), M. friedmanii і ін. – сапрофітні види, клінічне значення мають лише два останніх види.**

Ростуть у вигляді пігментних або безпігментних колоній, частіше в R-формі. Гарний ріст дають протягом 2 – 5 днів при 25 °С. Найважливіша диференціальна ознака – здатність рости при температурі 45 °С і вище та прискорювати свій ріст при температурному оптимумі.

Непігментовані колонії виростають при посіві малих кількостей матеріалу. Пігментоутворення, як відмінна ознака класифікації Раньона, у даної групи мікобактерій непридатне, тому що на утворення пігменту впливає склад середовища, вік культури, повторні пасажі, є природні пігментоутворюючі варіанти.

**M. fortuitum (M. minetti).** Ріст у субкультурах на яєчному середовищі з'являється на 2 – 4 добу у вигляді “розетки”. Морфологічно – короткі палички. На середовищі Левенштейна-Єнсена можуть поглинати фарбу й забарвлюватися в зелений колір. Потенційно-патогенні для людини.

Таким чином, для клініки особливе значення мають наступні види атипичних мікобактерій: *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum*.

Для правильної оцінки виділених мікобактерій – ідентифікації і визначення їх ролі в захворюванні людини необхідно провести диференціацію виділених культур із використанням спеціальних методик. Комплекс цих тестів різноманітний, в залежності від кваліфікації лабораторних робітників, обсягу досліджень, що проводяться, і умов роботи лабораторії. При культуральному методі дослідження варто враховувати ріст на яєчних, агарових і рідких живильних середовищах. Враховується також швидкість росту, температурний оптимум росту, морфологія колоній, їх колір.

## 2 Диференціація мікобактерій

### 2.1 Попередня ідентифікація комплексу *M. tuberculosis*

Первинна ідентифікація мікобактерій комплексу *M. tuberculosis* від нетуберкульозних бактерій здійснюється за такими культуральними характеристиками (Наказ МОЗ України № 45) (табл. 1):

- швидкість росту на щільних живильних середовищах;
- пігментоутворення;
- морфологія колоній;
- наявність кислотостійкості;
- температура росту.

Таблиця 1 – Культуральні ознаки комплексу *M. tuberculosis*

Культуральні ознаки	Комплекс <i>M. tuberculosis</i>
Швидкість росту	Ті, що повільно ростуть > 3 тижнів
Пігментоутворення	Колір слонової кістки
Морфологія колоній	R чи S форми
Наявність кислотостійкості	Виразене кислотостійке фарбування
Температура росту	Оптимальний ріст при 35 – 37 <sup>0</sup> С

Підтвердження належності виділеної культури мікобактерій до комплексу *M. tuberculosis* на підставі спеціальних лабораторних тестів є обов'язковим.

Для диференціювання *M. tuberculosis* і *M. bovis* від інших мікобактерій можна використовувати здатність атипичних і сапрофітних мікобактерій до росту на середовищі Левенштейна-Єнсена з 500,0 мкг/мл саліциловокислого натрію або паранітробензойної кислоти, доданої до середовища в тій же концентрації. Ці речовини інгібують ріст *M. tuberculosis* та *M. bovis*, на відміну від інших мікобактерій, що ростуть добре в їх присутності. Контролем служить середовище без препаратів.

Варто згадати ще про один простий тест, який в комплексі з вказаними вище дозволяє

диференціювати збудників туберкульозу від атипівих мікобактерій – це толерантність деяких видів мікобактерій до NaCl. Метод ґрунтується на здатності атипівих мікобактерій IV групи рости на середовищі з 5,0 % NaCl. Крім цієї групи, на даному середовищі ростуть тільки *M. terrae* complex [включає *M. triviale*, *M. terrae*, *M. nonchromogenicum* (III група)] і *M. flavescens* (II група), а також деякі мікобактерії I групи (*M. marinum*). Всі інші мікобактерії, у тому числі *M. tuberculosis* і *M. bovis*, на цьому середовищі не ростуть.

Після одержання попередньої відповіді про належність виділених мікобактерій до комплексу *M. tuberculosis* потрібно дуже невелике число тестів для диференціації бактерій в середині комплексу.

Остаточна ідентифікація *M. tuberculosis* і їхня диференціація від *M. bovis* можлива на підставі комплексу з наступних тестів: продукція ніацину, позитивні результати редукції нітратів, стійкість до дії 5,0 мкг гідразиду тіофен-2-карбоксилової кислоти (ТЧН) в 1,0 мл середовища і, нарешті, позитивний результат проби на піразинамідазу.

Позитивні результати цих тестів дозволяють виключити наявність *M. bovis*.

Негативна відповідь на термостабільну каталазу і продукція піни в колонках менше 45 мм при кімнатній температурі також мають важливе значення при кінцевому диференціюванні, але ці тести не дозволяють відрізнити *M. tuberculosis* від *M. bovis*.

Варто звернути увагу, що ніациновий тест може бути негативний у деяких штамів *M. tuberculosis*, зазвичай стійких до ізоніазиду. Аналогічне явище може спостерігатися й у відношенні тесту редукції нітратів. Негативні результати на піразинамідазу можуть мати місце у хворих, що лікувалися піразинамідом при розвитку стійкості до цього препарату.

Крім того, псевдонегативні результати цих тестів часто пояснюються будь-якими відхиленнями від стандартної методики проведення, виготовлення реагентів в лабораторних умовах.

### ***Виявлення корд-фактора***

Крім росту на цих середовищах, використовують здатність мікобактерій по-різному рости на рідких живильних середовищах. Атипіві мікобактерії ростуть дифузно у вигляді кучок, на відміну від істинних туберкульозних мікобактерій, що ростуть плівкою, або придонно, мають корд-фактор і ростуть у вигляді “кіс”, “джгутів”, “вусів” – у тісному переплетенні окремих паличок одна з одною. Це може служити диференціальною ознакою. Проте, стійкі до препаратів групи ГІНК *M. tuberculosis* цілком або частково втрачають корд-фактор. Тому для диференціації *M. tuberculosis* від атипівих визначення корду-фактору треба використовувати в комплексі з іншими тестами. Для відрізнення *M. tuberculosis* від інших мікобактерій (*M. bovis* і атипівих мікобактерій) використовують різноманітні біохімічні методи.

## 2.2 Основні біохімічні тести ідентифікації *M. tuberculosis*

Як відображено вище, для відрізнення *M. tuberculosis* від інших мікобактерій, а також для розрізнення *M. tuberculosis* від *M. bovis* використовують мінімальний набір біохімічних експрес-тестів, що дають можливість відрізнити *M. tuberculosis* від атипових і розрізнити деякі види атипових мікобактерій всередині груп Раньона.

Як сказано вище, *для ідентифікації M. tuberculosis досить застосовувати* наступні основні біохімічні тести:

- \* тест на наявність здатності продукувати ніотинову кислоту (ніациновий тест);
- \* тест на наявність нітратредуктазної активності;
- \* тест на наявність термостабільної каталази;
- \* тест на наявність росту на середовищі з натрієм саліциловокислим (500 мкг/мл).

*Як додаткові тести* можна використовувати:

- \* ріст на середовищі, що містить 500 мкг/мл паранітробензойної кислоти;
- \* ріст на середовищі, що містить 5,0 % хлориду натрію.

*Для диференціації M. tuberculosis і M. bovis варто враховувати* результати наступних проб:

- \* ніациновий тест;
- \* тест на наявність нітратредуктази;
- \* тест на наявність піразинамідази;
- \* ріст на середовищі, що містить 2,0 мкг/мл гідразиду тіофен-2-карбоксилової кислоти (ТСН – тест).

## 2.3 Ключові тести для окремих видів мікобактерій

Наводимо ключові тести для окремих видів мікобактерій:

**Схема 1 - Основні тести для відрізнення *M. tuberculosis*, *M. bovis* від інших мікобактерій**

**Тести для диференціації мікобактерій комплексу *M. tuberculosis***

Диференціальні тести	Мікобактерії	
	<i>M. tuberculosis</i>	Нетуберкульозні, що повільно ростуть
<i>Основні біохімічні тести на наявність:</i>		
Ніотинової кислоти	+	– (крім <i>M. simiae</i> )
Нітратредуктази	+	±
Термостабільної каталази	–	+
Ріст на середовищі з натрієм саліциловокислим (500 мкг/мл):	–	+/-
<i>Додаткові тести: ріст на середовищах, що містять:</i>		
Паранітробензойну кислоту (500 мкг/мл)	–	+ (крім <i>M. gastris</i> )
Натрію хлориду 5,0 %	–	+ (крім <i>M. marinum</i> , <i>M. terre</i> )

**Тести для дифереціяції окремих видів мікобактерій комплексу  
M. tuberculosis**

Диференціальні тести	Види мікобактерій комплексу M. tuberculosis			
	M.tuber- culosis	M. bovis	M. africanum	M. microti
<i>Основні біохімічні тести на наявність:</i>				
Нікотинової кислоти	+	-	+/-	+/-
Нітратредуктази	+	-	-	-
Термостабільної каталази	-	-	-	-/+
Ріст на середовищі із саліциловокислим натрієм (500 мкг/мл)	-	-	-	-
<i>Додаткові тести: ріст на середовищах, що містять:</i>				
Піразинамід	+	-	+	+
Гідроліз твіну-80	-/+	-/+	-	-/+
TCH (2 мкг/мл)	+	-	+/-	+/-

**Схема 2 – I група - Фотохромогенні мікобактерії**

Штами	25 °C	37 °C	45 °C	Відновлення нітратів	Гідроліз твіну - 80
M. kansasii	+	±	-	+	+
M. simiae	+	±	-	-	+
M. marinum	+	±	-	-	-

Примітка. Для розрізнення всередині групи необхідні наступні тести: утворення пігменту, гідроліз твіну-80, ніацинова проба (M. simiae ±), відновлення нітратів, ріст при 25 і 37°C.

**Схема 3 – II група - Скотохромогенні мікобактерії**

Штами	25 °C	37 °C	45 °C	Відновлення нітратів	Уреаза	Гідроліз твіну - 80
M. aquae (M. gordonae)	+	±	-	-	+	+
M. aquae	+	±	-	-	-	+
M. scrofulaceum	+	±	-	-	+	-

**Схема 4 – III група - Нефотохромогенні мікобактерії (основні тести)**

Штами	25 °C	45 °C	Відновлення нітратів	Гідроліз твіну-80	Каталаза 68 °C	Амідазна активність
M. avium	±	±	-	-	+	H; П
M. intracellulare	±	±	-	-	+	H; П
M. terrae	+	-	+	+	+	0
M. triviale	+	-	+	+	+	H; П; 0*
M. xenopi	-	+	-	-	+	H; П

Примітка. M. terrae Вайна – 0; M. terrae Тсукамура – H; П. H – нікотинамід (+), П – піразинамід (+), 0 – негативна реакція.

### Схема 5 – IV група - Мікобактерії, що швидко ростуть (основні тести)

Штами	25 °С	37 °С	45 °С	52 °С	Гідроліз твіну-80
<i>M. fortuitum</i>	+	+	-	-	±
<i>M. phlei</i>	+	+	+	+	+
<i>M. smegmatis</i>	+	+	+	-	+

Для атипичних мікобактерій, крім вказаних нами особливостей (швидкості росту, пігментоутворення, морфології колоній і паличок, температурного оптимуму) характерними являються: негативна ніацинова проба, відсутність пероксидазної активності при високій активності каталази, виражена термостабільність каталази в більшості мікобактерій, ріст на живильних середовищах із паранітробензойною кислотою і саліциловокислим натрієм, відсутність у більшості випадків корд-фактора. *Характерним також для атипичних мікобактерій є первинна стійкість до більшості антимікобактеріальних препаратів!*

Для ідентифікації *M. tuberculosis* рекомендуються біохімічні тести виробництва **фірми Tulip Diagnostics (p) LTD. (Індія)**, що пройшли апробацію в Референс-лабораторії з мікробіологічної діагностики туберкульозу ІФП АМН України і зарекомендували себе з позитивного боку.

#### Ніациновий тест

**Принцип методу.** Ніацин (похідне нікотинової кислоти) відіграє надзвичайну роль у здійсненні всіх окислювально-відновних реакцій, що відбуваються в клітинах кислотостійких мікобактерій. Ніацин продукують усі мікобактерії, але у *M. tuberculosis* в результаті блокування ряду метаболічних шляхів нікотинова кислота накопичується у великих кількостях, у багато разів перевищуючих її вміст в клітинах мікобактерій інших видів. Варто враховувати, що ніациновий тест може бути позитивним і у деяких видів нетуберкульозних мікобактерій, наприклад, *M. simiae*, у деяких штамів БЦЖ і ряду мікобактерій, що швидко ростуть (4 група по Раньону).

Псевдонегативні результати виключаються при дослідженні 6-тижневої культури *M. tuberculosis*, що виростає на середовищі Левенштейна-Єнсена з додаванням L-аспарагіну, щоправда, при цьому необхідна наявність не менше 50 добре сформованих колоній. Забруднююча мікрофлора може стати причиною псевдопозитивних відповідей, тому чистоту культури варто підтвердити бактеріоскопічним дослідженням мазка, пофарбованого по Цілю-Нільсену.

Ніациновий тест заснований на виявленні ніацину в живильному середовищі, а не в самих мікобактеріях, тому у випадку зливного росту, який перешкоджає екстракції ніацину, необхідно піпеткою проникнути через шар бактеріального росту в глиб живильного

середовища. Для екстрагування ніацину стерильну дистильовану воду чи ізотонічний розчин хлориду натрію нашаровують на поверхню середовища й експонують від 30 хв. до 2 год. при кімнатній температурі. Екстракт (0,6 мл) переносять у пробірку з пробкою, що загвинчується, або ватно-марлевою, тому що реакція вимагає вільного доступу кисню протягом усього дослідження.

Присутність ніацину визначається такою реакцією:

	<b>Цитратна буферна суміш</b>	
<b>KSCN + Chloramine-T</b>	→	<b>Суаноген chloride</b>
<b>Ніацин + Суаноген chloride</b>	→	<b>γ-карбоксільний-глутаконовий альдегід</b>
<b>γ-карбоксільний-глутаконовий альдегід + ПАВА</b>	→	<b>Утворення основи Шиффа (жовтогарячого кольору)</b>

#### ***Реактиви для постановки тесту.***

Реагент Microxpress NIACIN DROP TEST – це біохімічний тест на розпізнавання *M. tuberculosis* з концентрацією ніацина 5,0 µg/ml. Набір NIACIN DROP TEST складається з:

1. NIACIN Reagent (R1) – підготовлений для Potassium Thiocyanate (KSCN).
2. NIACIN Reagent (R2) – підготовлений для цитратної буферної суміші.
3. NIACIN Reagent (R3) – підготовлений для розчину Chloramine-T.
4. NIACIN Reagent (R4) – підготовлений для параамінобензойної кислоти (ПАВА).
5. NIACIN Standard (S) – готовий до використання.

NIACIN Standard (S) використовується для підтвердження роботи тестової системи, а також для контролю концентрації ніацину на рівні 5,0 µg/ml.

#### ***Збереження і надійність тест-системи.***

Зберігати набір NIACIN DROP TEST необхідно при температурі від 2 до 8 °C подалі від вогню.

#### ***Необхідні додаткові матеріали.***

Ламінарний бокс, центрифуга з максимальною швидкістю обертів до 3500 об/хв, дезинфекційний засіб, 0,1 – 1,0 мл піпетка змінної величини, пробірки із пробками, що загвинчуються, або ватно-марлевими, штатив для пробірок, біла дошка/картон для фону, стерильна дистильована вода чи стерильний ізотонічний розчин хлориду натрію.

#### ***Вимоги до зразків.***

Для тесту використовуються 3 – 4 тижневі життєздатні культури (не менше 50 колоній) в середовищі Левенштейна-Єнсена чи Міддлбрукка 7H10 без медикаментозних препаратів.

#### ***Процес дослідження.***

\* Перед початком постановки тесту нагріваємо реагенти до кімнатної температури.

\* Додаємо в середовище з культурою (**середовище без медикаментозних препаратів, на середовищі 3 – 4 тижнева життєздатна культура, що містить більше 50 колоній**), що знаходиться під кутом, 1,0 мл стерильної дистильованої води чи стерильного ізотонічного розчину хлориду натрію.

\* Якщо культура росте «газоном» (щільно), поверхню середовища необхідно злегка проткнути піпеткою для того, щоб збільшити контакт стерильної дистильованої води чи стерильного ізотонічного розчину хлориду натрію із середовищем (**ніацин вивільняється із середовища, але не з колоній**).

\* Термін контакту стерильної дистильованої води чи ізотонічного розчину хлориду натрію з середовищем повинен бути протягом 30 хв. при температурі 20 – 25°C. Стерильна дистильована вода чи ізотонічний розчин хлориду натрію повинні цілком покривати колонії, тому пробірка повинна знаходитися під нахилом.

\* Відсмоктуємо піпеткою рідкий екстракт із пробірки з культурою в стерильну чисту пробірку з ватно-марлевою чи з пробкою, що загвинчується, і центрифугуємо при 3500 об/хв 15 хв. до одержання чистого конденційного екстракту.

\* Переносимо 0,6 мл конденційного екстракту в стерильну пробірку з ватно-марлевою чи з пробкою, що загвинчується.

\* Відкриваємо пробки з реагентами R1, R2, R3 і R4 по годинниковій стрілці таким чином, щоб відкрилися отвори піпетки відповідних флаконів.

\* У стерильну пробірку з ватно-марлевою чи з пробкою, що загвинчується, яка містить конденційний екстракт, **додаємо наступні реагенти в зазначеній послідовності:**

- a. 1 краплю реагенту R1 і перемішуємо;
- b. 1 краплю реагенту R2 і перемішуємо;
- c. 1 краплю реагенту R3 і перемішуємо;
- d. 1 краплю реагенту R4 і перемішуємо.

\* Закриваємо пробірку пробкою і ставимо в штатив.

\* Стежимо за ходом кольорової реакції (від безбарвного до жовтого, використовуючи білий фон). Рекомендується також порівнювати колір у пробірці з 0,6 мл дистильованої води і 0,5 мл гранично концентрованого відібраного ніацину, приготованого як зазначено нижче (контроль).

\* Реєструємо дані негайно і повторно через 15 хв.

\* Закриваємо пробки з реагентами R1, R2, R3 і R4 і поміщаємо в холодильник при температурі 2 – 8 °C відразу ж після завершення постановки тесту.

**Аналіз результатів.**

1. Утворення жовтого кольору протягом 15 хв. показує позитивну реакцію.
2. Відсутність забарвлення після закінчення 15 хв. свідчить про негативну реакцію.

### **Процедура підтвердження вірогідності тесту ніацину/готування гранично концентрованого ніацину (контроль)**

Рекомендується періодично контролювати краплинний ніациновий тест. Для цього відкриваємо пробку пробірки з ніацином Standard (S) до відкриття отвору крапельниці. Проводимо ряд дій, як зазначено в табл. 2.

Таблиця 2 – Процедури підтвердження вірогідності тесту ніацину/готування гранично концентрованого ніацину (контроль)

Пробир-ка №	Розчин води, мл	Стандарт у мл (50 µg/ml) ніацину	Концентрат ніацину	R1	R2	R3	R4	Результат
1.	0,5 мл	-	-	1 крапля	1 крапля	1 крапля	1 крапля	негатив.
2.	0,5 мл	1 крапля або 50 µl	5 µg/ml	1 крапля	1 крапля	1 крапля	1 крапля	2+(колір концентрату)

#### ***Важливі зауваження.***

1. Не можна використовувати для постановки тесту неживу, змішану чи забруднену культуру мікобактерій.
2. Культура мікобактерій, що містить менше 50 колоній, молодше 3 – 4 тижнів може містити меншу кількість ніацину і може дати слабку чи негативну реакцію.
3. Не завжди можливо вловити зміну кольору культури неозброєним оком, особливо якщо робити це на агарі Міддлбрукка 7H10. Ніацин-негативні штами *M. tuberculosis* можуть давати різні результати.
4. Хоча всі мікобактерії виробляють ніацин, *M. tuberculosis* накопичують найбільшу кількість. Ніацин також виробляють *M. simiae* і деякі штами *M. chelonae*.
5. Отриманий у ході реакції жовтий колір згодом втрачає інтенсивність. Виходячи з цього, колір потрібно зафіксувати протягом 15 хв.

### **Визначення нітратредуктазної активності**

**Принцип методу.** Реакція відновлення нітратів дає можливість диференціювати *M. tuberculosis*, які мають нітратредуктазу, від *M. bovis* і *M. avium* та від деяких нетуберкульозних бактерій, у яких цей фермент відсутній. З усіх мікобактерій, нітратредуктазна активність найбільш виражена у *M. tuberculosis*. Це дозволяє використовувати даний тест у сполученні з ніациновим тестом для диференціальної діагностики *M. tuberculosis* та мікобактерій інших видів.

Принцип методу полягає у визначенні активності нітратредуктази по кількості відновленого нітриту з нітрату, що супроводжується кольоровою реакцією з парадиметиламінобензальдегідом. Варто пам'ятати, що цей тест є основним для визначення *M. kansasii*, і особливо *M. szulgai*.

Присутність нітриту в середовищі виявляється в утворенні слабкого рожевого, темно-рожевого чи фіолетового кольору при введенні нітрит реакенту, який сорбовано на стрипі. Відсутність зміни фарбування стрипу з нітрит реакентом вказує на те, що в середовищі нітриту немає.

Це може бути з двох причин:

1. Нітрат не було редуковано і штам дав негативну реакцію на нітрит.
2. Можливо, нітрат перетворився в нітрит, а той у свою чергу в закис азоту чи просто азот, що не дають позитивної реакції на нітрит-реакент, але сам штам – нітрат позитивний.

Кожне середовище, яке тестується після негативної реакції на нітрит-реакент потрібно протестувати на виявлення однієї з цих причин. Для цього в негативний тест додається невелика кількість порошкоподібного цинку. Він каталізує перетворення нітрату в нітрит хімічним способом. Якщо нітрат не був редукований організмом, наприклад, якщо штам нітрат-негативний, він буде виділений порошком цинку і червоний колір з'явиться протягом 15 хвилин. Якщо ж, після додавання порошку цинку, ніякого кольору не утворюється в середовищі, що інкубується, то це значить, що мікроорганізм не тільки перетворив нітрат у нітрит, але і далі в азотовмісні гази. Ці мікроорганізми вважаються нітрат-позитивними.

#### ***Реактиви для постановки тесту.***

Реакент Microxpress NITRATE REDUCTION KIT складається з:

- a. R1 – реакент нітрат субстрат.
- b. R2 – смужка для детекції нітриту (нітрит-реакент).
- c. R3 – порошок цинк-реакент.

#### ***Збереження і надійність тест-системи.***

Зберігати набір NITRATE REDUCTION KIT необхідно при температурі від 2 до 8 °C подалі від світла.

#### ***Необхідні додаткові матеріали.***

Ламінарний бокс, дезинфекційний засіб, стерильні пробірки, термостат.

#### ***Вимоги до зразків.***

Використовуйте 3 – 4 тижневу культуру, отриману на середовищі Левенштейна-Сенсена чи рідкого середовища.

#### ***Процес дослідження.***

1. Підготуйте пробірку, що містить досліджувану культуру на середовищі Левенштейна-Єнсена.
2. У стерильну тест-пробірку піпеткою додайте 1,0 мл реагент нітрат субстрат (R1).
3. У цю тест-пробірку асептично емульгуйте 1 повну петлю культури, що досліджується.
4. Ретельно перемішайте емульговану культуру з реагентом нітрат субстрату і інкубуйте 3 години при температурі 37 °С.
5. Підготуйте необхідне число стрипів.
6. Занурте стрип для детекції нітриту (R2) в тест-пробірку з реагентом нітрат субстрату і емульговою культурою таким чином, щоб вона просочилася вмістом, **чи**
7. Візьміть піпеткою 1 краплю вмісту тест-пробірки з реагентом нітрат субстрату і емульговою культурою і нанесіть на стрип.
8. Стежте за зміною кольору стрипу від блідорожевого, темнокоричного до фіолетового протягом 30 – 60 сек.
9. Якщо колір не проявився, додайте, використовуючи дозатор, порошок цинку в тест-пробірку з реагентом нітрат субстрату і емульговою культурою і повторіть пп. 6–8. Аналіз результатів досліджень проводьте згідно табл. 3.

Таблиця 3 – Аналіз результатів

Зміна кольору		Результат
Додавання нітрит-позитивного реагента	Додавання порошку цинка	
Блідорожевий, темнокоричний або фіолетовий	–	Нітрат-позитивний штам
Немає зміни кольору	Немає зміни кольору	Нітрат-позитивний штам
Немає зміни кольору	Блідорожевий, темнокоричний або фіолетовий	Нітрат-негативний штам

**Важливі зауваження.**

1. Стежте за тим, щоб додавалася рівно задана дозатором кількість порошку цинку. Зайва кількість порошку цинку приводить до дуже швидкого виділення нітрату, а потім його перетворення в нітрит і азотвмісні гази. Це робить визначення нітриту неможливим.
2. Проведення процедури визначення нітрату виконуйте протягом 30 хв. від моменту виймання культури з термостату. Більш тривале перебування культури при кімнатній температурі може знизити активність ензимів.

**Каталазний тест**

**Принцип.** Каталаза – це внутрішньоклітинний розчинний фермент, що здатний

розщеплювати перекис водню на воду і кисень. При цьому в реагуючій суміші утворюються пухирці кисню, що вказує на наявність каталазної активності. Майже усі види мікобактерій мають каталазну активність, за винятком *M. bovis* і деяких резистентних до ізоніазиду штамів *M. tuberculosis*.

У клітинах мікобактерій присутній ряд ізоферментів каталази, які відрізняються по термостабільності. Нетуберкульозні мікобактерії і деякі сапрофіти синтезують термостабільну каталазу.

У зв'язку з цим, є можливість використовувати тест, який вказує на наявність каталази (виконується при кімнатній температурі) і тест на термостабільність каталази – тест визначення наявності каталази при pH 7.0 і температурі 68 °С.

#### ***Реактиви для постановки тесту.***

Набір Microxpress CATALASE DETECTION KIT складається з:

1. CATALASE Reagent (R1) – M/15 фосфатний буферний розчин pH 7.0
2. CATALASE Reagent (R2) – основний розчин Tween-80
3. CATALASE Reagent (R3) – готовий 30,0 % перекис водню (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

CATALASE DETECTION KIT – не цілком готовий до застосування продукт, вимагає приготування:

1. Попередньо готується 10,0 % субстрат реагенту Tween-80 (при температурі 2 – 8 °С його можна зберігати до 1 місяця).
2. Реагент пероксидаза-Твепен потрібно приготувати шляхом змішування рівних кількостей 10,0 % субстрату реагенту Tween-80 і 30,0 % перекису водню.

Реагент пероксидаза-Твепен необхідно використовувати тільки свіжоприготованим для кожного тесту.

#### ***Приготування 10,0 % субстрату реагенту Tween-80.***

**Примітка.** Описана нижче процедура приготування 10,0 % субстрату реагенту Tween-80 підходить для тестування однієї культури як для визначення каталазної активності, так і для визначення термостабільності каталази. Для приготування 10,0 % субстрату реагенту Tween-80 більше, ніж для однієї культури, помножте кількість, зазначену в табл.4 на необхідне число тестів. Зберігайте приготований реагент в чистій, стерильній темного кольору ємності з кришкою при температурі 2 – 8 °С.

- \* Стерильно закачайте в чисту стерильну пробірку реагенти, як вказано в табл.4.
- \* Нагрійте цей розчин до 50 °С до повного розчинення Tween-80 злегка розмішуючи.
- \* Щільно закрийте кришку пробірки.
- \* Таким чином, отримаємо 1,0 мл 10,0 % субстрату реагенту Tween-80.
- \* Дайте охолонути.

Таблиця 4 – Приготування 10,0 % субстрату реагенту Tween-80 для 1 культури

Реагент	Кількість для тесту
R1	1,0 мл
R2	100μл

\* Якщо реагент залишається стерильним, він може зберігатися при 2 – 8 °С до 1 місяця. Якщо потрібно, субстрат реагенту можна перед використанням нагріти.

***Приготування 1,0 мл реагенту пероксидази Tween.***

**Примітка.** Реагент пероксидази Tween повинний бути свіжоприготованим перед початком постановки тесту. Усі залишки видалити.

1. Перед самим початком тесту змішайте 0,5 мл 10,0 % субстрату реагенту Tween-80 і 0,5 мл реагенту R3 у чистій стерильній пробірці.
2. Перемішайте.

**Виявлення каталази (виконується при кімнатній температурі)**

Як було сказано вище, нативні каталазні ензими, які продукують мікобактерії, перетворюють перекис водню у воду і кисень. Це можна спостерігати по появі пухирців кисню, що з'являються при додаванні 50 – 100 мкл реагенту Tween-пероксида в 3 – 4 тижневу культуру, вирощену на щільному живильному середовищі.

**Тест на термостабільність каталази – тест визначення наявності каталази при рН 7.0 і температурі 68 °С**

1. Певні мікобактерії втрачають активність каталази в буферному розчині при рН 7.0 і температурі 68 °С.
2. Деякі ізоніазид-стійкі види *M. tuberculosis* виявляють термостабільну каталазу і в таких випадках можливий позитивний тест.

***Збереження і надійність тест-системи.***

Зберігати набір CATALASE DETECTION необхідно при температурі від 2 до 8°С подалі від світла.

***Необхідні додаткові матеріали.***

Ламінарний бокс, стерильна бактеріологічна петля/лопатка, дезінфекційний засіб, 0,1 – 1,0 мл піпетка змінної величини, пробірки для досліджень з пробками, що загвинчуються або ватно-марльовими, штатив для пробірок, водяна баня.

***Вимоги до зразків.***

Для тесту використовуються 3 – 4 тижневі життєздатні культури на середовищі Левенштейна-Єнсена.

***Процес дослідження.***

***При кімнатній температурі***

\* У 3 – 4 тижневу культуру, вирощену на щільному середовищі, додаємо 50 – 100 мкл реагенту пероксидази Tween.

\* Стежимо за появою пухирців. Іноді це може зайняти до 5 хв.

### ***При постійній температурі (рН 7.0, 68 °С)***

\*Промаркуйте відповідним чином потрібну кількість пробірок із пробками для культур, що досліджуються.

\* Відкрийте стерильну пробірку і стерильно закачайте 0,5 мл фосфатного буферного розчину рН 7.0 у кожен пробірку.

\* Стерильною петлею/лопаткою приготуйте емульсію декількох колоній з культури і помістіть їх у буферний розчин.

\* Використовуйте тільки стерильну петлю/лопатку для кожного нового засіву.

\* Поставте пробірки з емульгованими колоніями у водяну баню чи нагрійте до 68 °С на 20 хв. (**Суворе дотримання температурних і часових умов надзвичайно важливо для одержання точного результату**).

\*Через 20 хв. встановіть пробірки в штатив і дайте охолонути.

\*Закачайте піпеткою 0,5 мл реагенту пероксидази Tween у кожен колбу.

\*На поверхні рідини з'являються пухирці. Утилізуйте пробірки з негативною реакцією тільки через 20 хв.

**Примітка.** Тестові процедури (використовуючи 2 методи) можна проводити в одному й тому ж живильному середовищі.

### ***Аналіз результатів***

#### ***При кімнатній температурі***

1. Миттєве бурхливе виділення пухирців – позитивна реакція (швидкоплинна).
2. Повільне нечисленне виділення пухирців – позитивна реакція (млявоплинна).
3. Відсутнє виділення пухирців протягом 5 хв. – негативна реакція.

#### ***При постійній температурі (рН 7, 68 °С)***

1. Виділення пухирців – позитивна реакція.
2. Відсутнє виділення пухирців протягом 20 хв. – негативна реакція.

### ***Важливі зауваження.***

1. Намагайтеся не збовтувати колбу під час фіксування результатів, тому що Tween-80 сам може виділяти пухирці при збовтуванні і давати в такий спосіб помилкову позитивну реакцію.

Співвідношення окисно-відновних ферментів у різних видів мікобактерій показано в табл. 5.

Таблиця 5 – Ідентифікація мікобактерій по окисно-відновним ферментам і ніациновій пробі

Мікобактерії	Каталаза	Термостабільність каталази	Ніацинова проба
Атипові	+++	+	–
<i>M.tuberculosis</i> , чутливі до ізоніазиду	++	–	+
<i>M.tuberculosis</i> , стійкі до ізоніазиду	+, ±	–	+
<i>M.bovis</i>	++	–	–

### Реакція гідролізу Твіну-80

**Принцип методу.** Важливою реакцією для ідентифікації мікобактерій всередині II і III груп (за Раньоном), є реакція гідролізу твіну-80. Тест можна також використовувати для реакції-підтвердження *M. kansasii* (позитивна реакція на 3 – 6 добу), а також використовувати для теста-диференціації двох скотохромогенів *M. gordonae* (позитивний) і *M. scrofulaceum* (негативний).

Звичайно, непатогенні повільно зростаючі скотохромогени і нон-хромогени продукують ліпазу, яка може гідролізувати Tween-80 в олеїнову кислоту і сорбітол, у той час як сапрофітні мікроорганізми цих груп не здатні.

Інтактний Tween-80 викликає в нейтрального червоного індикатора слабокоричневе забарвлення. Під час гідролізу Tween-80, він більше не може реагувати з індикатором, який зберігає свій натуральний баланс pH 7.0 рожево-червоного кольору.

#### **Реактиви для постановки тесту.**

Реагент Microxpress TWEEN-80 HYDROLYSIS – біохімічний тест на диференціацію сапрофітних видів фотохромогенів, нонхромогенів і скотохромогенів. Набір TWEEN-80 HYDROLYSIS складається з:

1. Гідролізний реагент Tween-80 (R1) – фосфатний буферний розчин pH 7.0
2. Гідролізний реагент Tween-80 (R2) – реагент Tween-80.
3. Гідролізний реагент Tween-80 (R3) – вихідний 0,1 % розчин натурального червоного індикатору.

Субстрат гідролізного реагенту Tween-80, що використовується в тесті, можна приготувати з готових до вживання компонентів набору TWEEN-80 HYDROLYSIS.

#### **Збереження і надійність тест-системи.**

Зберігати набір TWEEN-80 HYDROLYSIS необхідно при температурі від 2 до 8 °C подалі від світла.

#### **Необхідні додаткові матеріали.**

Ламінарний бокс, термостат, 3 мм стерильна бактеріологічна петля, дезінфекційний засіб, 10,0 – 100 мкл, 0,1 – 1,0 мл піпетки змінної величини, дослідні пробірки з пробками,

що загвинчуються, штатив для пробірок, стерильна дистильована вода чи стерильний ізотонічний розчин хлориду натрію.

#### ***Вимоги до зразків.***

Для тесту використовуються повільно зростаючі культури на середовищі Левенштейна-Єнсена. Повільно зростаючі культури можна посіяти на субстрат Tween-80 відразу ж як тільки виросте на середовищі Левенштейна-Єнсена необхідна кількість.

#### ***Приготування реагенту гідролізного субстрату Tween.***

**Примітка.** Описана нижче процедура приготування реагенту підходить для засівання однієї культури, що тестується. Для більшої кількості культур використовуйте дані з табл.6, помноживши їх на потрібну кількість тестів. Зберігайте приготований реагент у чистій стерильній колбі/пляшці з пробкою темного кольору при 2 - 8 °С. Реагент можна зберігати в такому вигляді 2 тижні.

1. Стерильно закапайте наступні реагенти в стерильну пробірку з пробкою, як вказано в табл.6.

Таблиця 6 – Приготування реагенту гідролізного субстрату Tween для 1 культури

Реагент	Кількість для тесту
R1	2,0 мл
R2	10,0 мкл
R3	40,0 мкл

2. Підігрійте до 50 °С розчин і, злегка помішуючи, дайте цілком розчинитися Tween-80.
3. Щільно закрийте пробку.
4. Отриманий розчин коричневого кольору є гідролізний субстрат реагенту Tween-80.
5. Дайте реагенту охолонути.
6. Приготований реагент можна зберігати в такому вигляді 2 тижні.
7. Якщо потрібно, перед застосуванням реагент можна підігріти.
8. Стерильним способом закапайте в стерильні відповідно промарковані пробірки з пробками по 2,0 мл даних реагентів.

#### ***Процес дослідження.***

\*Промаркуйте відповідно до культур, що тестуються, стерильні пробірки з пробками, які містять гідролізний субстрат реагенту Tween-80.

\*Використовуючи 3,0 мм стерильну петлю, наберіть культуру, що тестується й асептично засійте її у відповідно промарковану пробірку з реагентом.

\*Для кожної реакції використовуйте стерильну петлю.

\*Закрийте пробірку пробкою і помістіть в термостат при температурі 35 – 37°С.

\*Спочатку через 24 години, потім 5 днів, а потім через 10 – 12 днів перевірте реагент на наявність зміни кольору від слабокоричневого до рожево-червоного.

\*Не збовтуйте пробірку з реагентом.

#### ***Аналіз результатів.***

1. Зміна кольору гідролізного субстрату реагенту Tween-80 у пробірці свідчить про позитивний результат тесту.
2. Перші результати потрібно зафіксувати через 24 години, і пробірки з позитивним результатом повинні бути відкладені.
3. Пробірки з негативним результатом потрібно інкубувати до 5 днів і перевіряти. Позитивні пробірки відкласти.
4. Пробірки з негативним результатом через 5 днів інкубуються для перевірки до 10–12 днів.
5. Зафіксуйте остаточні дані на 10–12 день і утилізуйте всі пробірки.

***Важливе зауваження.*** Під час інкубації зберігайте пробірки в темному місці для зменшення можливості спонтанного знебарвлення нейтрального червоного реагенту.

#### **Тест із саліциловокислим натрієм (саліциловий тест)**

Мікобактерії комплексу *M. tuberculosis* не мають здатність утилізувати саліциловокислий натрій, який пригнічує їх ріст. Ця властивість саліцилату натрію використовується як один з основних методів диференціації *M. tuberculosis* і нетуберкульозних мікобактерій.

Для проведення цього тесту готують середовище Левенштейна-Єнсена, до складу якого до згортання вводять саліцилат натрію в кількості, що дозволяє одержати концентрацію препарату, рівну 500 мкг/мл. Зазначений тест ставиться одночасно з тестом МС, облік результатів тесту роблять одночасно з урахуванням тесту МС при яасному рості культури в контролях.

#### **Тест із паранітробензойною кислотою (РНВ-тест)**

##### ***Приготування середовища з паранітробензойною кислотою***

50,0 мг паранітробензойної кислоти добре розтирають у ступці, додають 5,0 мл дистильованої води і 1,0 мл 4,0 % їдкого натру до рН 8.0. Після повного розчинення кислоти додають 2–3 краплі 6,0 % соляної кислоти, доводячи рН до 7.0. Отриманий розчин додають до 95,0 мл попередньо профільтрованого яєчного середовища, одержуючи в такий спосіб кінцеву концентрацію паранітробензойної кислоти в середовищі, рівну 500 мкг/мл. Згортання середовища роблять у звичайному режимі.

##### ***Процес дослідження.***

\* Посів на середовище Левенштейна-Єнсена з паранітробензойної кислотої в концентрації 500 мкг/мл здійснюють в одночас з постановкою тесту МС.

\* У процесі інкубації при 37<sup>0</sup> С пробірки досліджують на 3-й, 7-й, 14-й і 21-й день.

\* При аналізі результатів користатися даними схеми 1.

### **Піразинамідазний тест**

Тест застосовується як додатковий для диференціації *M. tuberculosis* і *M. bovis*. Заснований на здатності *M. tuberculosis* протягом 4-х днів дезамінувати піразинамід до піразинової кислоти й амонію, що вказує на наявність піразинамідази. *M. bovis* не виявляє піразинамідазної активності навіть після 7 днів інкубації.

### **Тест із 5,0 % хлоридом натрію**

Даний тест використовується для диференціації мікобактерій комплексу *M. tuberculosis* і виконується аналогічно тесту з паранітробензойною кислотою на середовищі Левенштейна-Єнсена, яке містить 5,0 % хлориду натрію. Метод заснований на здатності ряду видів нетуберкульозних мікобактерій рости на середовищі, яке містить 5,0 % хлориду натрію. *M. tuberculosis* на цьому середовищі не росте.

### **Тест із гідразидом тіофен-2-карбоксіловою кислотою (ТСН - тест)**

**Принцип методу.** Тест чутливості ТСН використовується для диференціації *M. bovis* від інших нехромогенних повільно зростаючих мікобактерій, у тому числі і *M. tuberculosis*. *M. bovis* чутлива до низьких концентрацій ТСН (від 1,0 до 5,0 мкг/мл), у той час як *M. tuberculosis* стійка до ТСН. Деякі види *M. bovis* можуть давати слабкий ріст на середовищі Левенштейна-Єнсена, яке містить гліцерин, у той час як *M. tuberculosis* та інші мікобактерії дають яскравий ріст. *M. bovis* демонструє гарний ріст на даному середовищі з піруватом натрію, але без ТСН чи гліцерину.

Microxpress TCH SENSITIVITY TEST розроблений на цій підставі.

**Реактиви для постановки тесту.** Набір TCH SENSITIVITY TEST складається з:

1. R1 – середовище Левенштейна-Єнсена с 10,0 мг/л ТСН (без пірувата натрію і гліцерину).
2. R2 – середовище Левенштейна-Єнсена з піруватом натрію (без ТСН і гліцерину).
3. R3 – середовище Левенштейна-Єнсена з гліцерином (без ТСН і пірувата натрію).

### **Збереження і надійність тест-системи.**

Зберігати набір TCH SENSITIVITY TEST необхідно при температурі від 2 до 8 °C подалі від світла.

### **Необхідні додаткові матеріали.**

Ламінарний бокс, термостат, 3,0 мм стерильна бактеріологічна петля, дезінфекційний засіб, 0,1 – 1,0 мл піпетки змінної величини, Вортекс, дослідні пробірки з пробками, що загвинчуються або ватно-марльовими, штатив для пробірок, стандарт Мак-Фарленда № 1, стерильна дистильована вода чи стерильний ізотонічний розчин хлориду натрію.

### **Вимоги до зразків.**

Для тесту використовуються тільки 3 – 4 тижневі культури на середовищі Левенштейна-Єнсена.

### **Процес дослідження:**

\* Наберіть повну петлю колоній бактерій, отриманих на середовищі Левенштейна-Єнсена без медикаментозних препаратів.

\* Перемістіть їх у стерильну пляшку з 0,1 мл стерильної дистильованої води чи ізотонічним розчином хлориду натрію.

\* Щільно закрийте пляшку і збовтуйте вміст на Вортексі 10 хвилин, щоб забезпечити однорідність суспензії.

\* Дайте відстоятися 10 хв.

\* Отриману мутну рідину розбавте до відповідності стандарту Мак-Фарленда № 1, а потім у співвідношенні 1:1000 у ізотонічному розчині хлориду натрію чи дистильованій стерильній воді.

\* Перед посівом приведіть набір ТСН до рівня кімнатної температури (20 – 25 °С).

\* Пронумеруйте кожен набір середовища ТСН SENSITIVITY TEST відповідно з даними пацієнтів (номерами).

\* Засійте 0,2 мл розведеної суспензії піпеткою на:

а) середовище Левенштейна-Єнсена з 10,0 мг/л ТСН (без пірувата натрію і гліцерину);

б) середовище Левенштейна-Єнсена з піруватом натрію (без ТСН і гліцерину);

в) середовище Левенштейна-Єнсена з гліцерином (без ТСН і пірувата натрію).

\* Щільно закрийте пляшечки і інкубуйте живильні середовища при температурі 37 °С 3 тижні.

\* Через три тижні врахуйте дані в такий спосіб, де (+) – наявність росту, а (–) – відсутність.

Середовище	R1	R2	R3	Результат
Спостереження	–	+	–	<b><i>M. bovis</i></b>
	+	–	+	<b><i>M. tuberculosis</i></b>

### **Важливі зауваження.**

1. Не використовуйте для тесту знебарвлене або інфіковане культуральне середовище.
2. Ізоніазид-стійкі штами *M. bovis* можуть також бути ТСН-стійкими.
2. Деякі штами *M. tuberculosis* можуть бути чутливими до ТСН і не будуть рости на такому середовищі.

## РЕЗЮМЕ

Моніторинг за штамми *M. tuberculosis* і атипovими мікобактеріями, які циркулюють серед бактеріовиділювачів – це одна з інтегральних частин визначення ефективності програм боротьби з туберкульозом у межах окремо взятої країни. Методичні рекомендації розроблені за вимогами ВООЗ і Міжнародного Союзу по боротьбі з легенеvими захворюваннями до бактеріологічної діагностики туберкульозу. Докладно наводяться схеми основних біохімічних тестів ідентифікації мікобактерій. Для ідентифікації *M.tuberculosis* рекомендуються біохімічні тести виробництва фірми Tulip Diagnostics (p) LTD. (Індія), що пройшли апробацію в Референс-лабораторії ІФП АМН України і зарекомендували себе з позитивного боку. Наведено методики постановки мінімального набору біохімічних тестів, які є обов'язковими для виконання в лабораторіях, що займаються виділенням *M.tuberculosis* із мокротиння. Перевагою цих тестів є те, що вони стандартизовані, легкі в постановці, не потребують тривалого часу (від постановки до отримання кінцевого результату). Впровадження тестів ідентифікації мікобактерій в Україні вперше дозволить з'ясувати відсоток атипovих мікобактерій, які відіграють роль в патології захворювань легень, викликаних мікобактеріями різних видів.

### Прелік літературних джерел

1. Определитель бактерий Берджи: Пер. с англ. / Под ред. Д. Хоулта. – М.: Мир, 1997. – 800 с.
2. Покровский В.И., Поздеев О.К. Медицинская микробиология. – М.: ГЭОТАР Медицина, 1999. – 1184 с.
3. Туберкулез. Патогенез, защита, контроль: Пер. с англ. / Под. ред. Барри Р. Блума. – М.: Медицина, 2002. – 696 с.
4. Туберкулез с множественной лекарственной устойчивостью: Пер. с англ. / Под ред. И. Бастиана, Ф. Порталс. – М.: Медицина и жизнь, 2003. – 368 с.