

Г. А. Скороход<sup>1</sup>, Е. И. Гудкова<sup>2</sup>, Ж. Ф. Циркунова<sup>1</sup>,  
И. Н. Слабко<sup>1</sup>, Н. Н. Бердник<sup>1</sup>

## MYCOBACTERIUM FORTUITUM КАК ТЕСТ-КУЛЬТУРА ДЛЯ УСКОРЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДЕЗИНФЕКЦИОННЫХ СРЕДСТВ В ОТНОШЕНИИ МИКОБАКТЕРИЙ

УО «Белорусский государственный университет»<sup>1</sup>  
ГУ «Республиканский центр гигиены, эпидемиологии  
и общественного здоровья» (НИИ гигиены, токсикологии,  
эпидемиологии, вирусологии и микробиологии)<sup>2</sup>

В соответствии с нормативными документами, регламентирующими испытания противотуберкулезной эффективности, туберкулоцидные режимы применения дезинфекционных средств должны отрабатываться только на основе оценки их эффективности в отношении эталонного штамма *M. terrae* ATCC 15755, так как *M. terrae*, не являясь патогенным видом, обладает более высокой устойчивостью к дезинфектантам, чем патогенные микобактерии. Однако, сроки оценки эффективности дезсредств на тест-культуре *M. terrae* составляют не менее 3 недель.

Цель работы: подобрать из числа эталонных штаммов быстрорастущих видов нетуберкулезных микобактерий тест-культуру, сопоставимую по устойчивости с *M. terrae* ATCC 15755 с целью её использования для ускоренного определения эффективности дезинфекционных средств в отношении микобактерий. При сравнительной оценке в количественном суспензионном методе эффективности дезинфекционных средств из различных химических групп в отношении тест-культуры *M. terrae* ATCC 15755 и эталонных штаммов быстрорастущих видов микобактерий: *M. fortuitum* ATCC 6841, *M. smegmatis* ATCC 19420, *M. phlei* ATCC 1175, показано, что минимальные эффективные концентрации всех исследованных шести дезсредств, содержащих АДВ из различных химических групп, в отношении *M. terrae* и *M. fortuitum* имели близкие значения, что свидетельствует о возможности применения эталонного штамма *M. fortuitum* для ускоренного определения эффективности дезсредств в отношении микобактерий в течение 4–5 суток.

**Ключевые слова:** *M. terrae*, быстрорастущие виды нетуберкулезных микобактерий, *M. fortuitum*, дезинфекционные средства.

G. A. Skorokhod, E. I. Gudkova, Zh. F. Tsirkunova, I. N. Slabko,  
N. N. Berdnik

## MYCOBACTERIUM FORTUITUM AS A TEST CULTURE FOR ACCELERATED DETERMINATION OF THE DISINFECTANTS EFFECTIVENESS AGAINST MYCOBACTERIA

In accordance with the regulatory documents governing the testing of anti-tuberculosis effect, tuberculocidal regimens for disinfectants should be developed only based on the reference strain *M. terrae* ATC C 15755 as a target, since non-pathogenic *M. terrae* has a higher resistance to disinfectants than pathogenic mycobacteria. However, the time frame for disinfectants effectiveness assessment on the *M. terrae* test culture is at least 3 weeks. The aim of the work: to select a test culture from among the reference strains of fast-growing non-tuberculous mycobacteria comparable in resistance to *M. terrae* ATCC 15755

for the purpose of disinfectants effectiveness testing acceleration. The comparative study of *M. terrae* ATCC 157, *M. fortuitum* ATCC 6841, *M. smegmatis* ATCC 19420 and *M. phlei* ATCC 1175 by a quantitative suspension method revealed similar minimal effective concentrations for all six studied disinfectants from different chemical groups in relation to *M. terrae* and *M. fortuitum*. This indicates the possibility of the *M. fortuitum* reference strain usage for accelerated (within 4–5 days) determination of the disinfectants effectiveness in relation to mycobacteria.

**Key words:** *M. terrae*, fast-growing species of non-tuberculous mycobacteria, *M. fortuitum*, disinfectants.

В системе мер предупреждения распространения туберкулеза и других микобактериозов первостепенную роль играют дезинфекционные мероприятия.

Для предотвращения передачи микобактериальных патогенов медицинские изделия, оборудование и объекты госпитальной среды подлежат обработке дезинфекционными средствами с доказанной микобактерицидной активностью, так как по устойчивости к химическим дезинфицирующим средствам микобактерии превосходят многие микроорганизмы [1, 3].

Для оценки эффективности дезинфекционных средств в отношении микобактерий в лабораторных условиях используется тест-культура *M. terrae* (эталонный штамм *M. terrae* ATCC 15755) [2, 4]. Показано, что данный вид, не являясь патогенным, обладает более высокой устойчивостью к дезинфектантам по сравнению с *M. tuberculosis* и *M. bovis*. Помимо этого, *M. terrae* растет несколько быстрее, чем патогенные микобактерии. Тем не менее, оценка эффективности дезинфекционных средств на тест-культуре *M. terrae* занимает не менее 3 недель.

Существенное сокращение сроков оценки эффективности дезинфекционных средств в отношении микобактерий возможно при подборе и использовании в качестве тест-культуры эталонного штамма из группы быстрорастущих видов нетуберкулезных микобактерий (НТМ), скорость роста которых на питательных средах составляет менее 7 суток.

Литературные данные свидетельствуют, что в ряде случаев для оценки биоцидной активности дезинфекционных средств исследователи используют как медленно-, так и быстрорастущие виды микобактерий, сопоставляя полученные результаты, которые свидетельствуют о разных уровнях резистентности к дезинфектантам как среди быстро-, так и среди медленно растущих видов НТМ [5, 7, 8]. При этом в ряде случаев резистентность быстрорастущих НТМ превышала таковую у микобактерий патогенных видов и была не ниже резистентности тест-культуры *M. terrae* ATCC 15755

[5, 6]. Это является предпосылкой для возможности подбора и использования определенного медленно растущего вида из числа НТМ для разработки метода ускоренного определения эффективности дезинфекционных средств в отношении микобактерий.

**Цель:** Подобрать из числа эталонных штаммов быстрорастущих видов нетуберкулезных микобактерий тест-культуру, сопоставимую по устойчивости с *M. terrae* ATCC 15755 с целью её использования для ускоренного определения эффективности дезинфекционных средств в отношении микобактерий.

#### Материалы и методы

Эталонные штаммы микобактерий: *M. phlei* ATCC 11758, *M. fortuitum* ATCC 6841, *M. smegmatis* ATCC 19420, *M. terrae* ATCC 15755.

Дезинфекционные средства на основе глутаральдегида, соли дихлоризоциануровой кислоты, глутаральдегида и гуанидина, додециламина и ЧАС, гуанидина и ЧАС, перекиси водорода.

Универсальный нейтрализатор, содержащий твин-80 (0,3 %), сапонин (3 %), гистидин (0,1 %) и цистин (0,1 %).

Определение эффективности дезинфекционных средств в отношении эталонных штаммов микобактерий выполняли количественным суспензионным методом согласно руководству «Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности» Руководство Р4.2.2643-10. Москва 2011.

Рабочие суспензии готовили по единой, модифицированной нами методике.

Культуру микобактерий снимали металлическим шпателем и вносили в стерильную толстостенную стеклянную конусообразную центрифужную пробирку объемом 10–12 мл, заполненную стеклянными бусами диаметром 3–4 мм на высоту 2–2,5 см. Перед внесением микробной массы в пробирку вносили дистиллированную воду по уровню бус. При внесении в пробирку снимаемой микробной массы лопатку шпателя

## Оригинальные научные публикации

вращали в столбике бус, что позволяло эффективно снимать бактерии со шпателя и одновременно выполнять первичную гомогенизацию суспензии. После внесения в пробирку всего объема микробной массы, полученную суспензию гомогенизировали на вортексе. После получения гомогенного материала добавляли 3–4 мл дистиллированной воды с последующей повторной гомогенизацией и, далее, по общепринятой методике.

Густую исходную бактериальную суспензию оставляли на 5–10 минут для осаждения негомогенизированных конгломератов. Полученную надосадочную жидкость отбирали пипеткой и переносили в стеклянную пробирку, диаметр которой соответствовал диаметру пробирки с оптическим стандартом мутности (ФГУН Государственного научно-исследовательского института стандартизации и контроля медицинских биологических препаратов им. Тарасевича Роспотребнадзора) и стандартизировали по оптическому стандарту мутности № 10, который соответствует  $1,0 \times 10^9$  микробных клеток в 1,0 мл, добавляя стерильную дистиллированную воду, либо по McFARLAND STANDARD с использованием соответствующей калибровки прибора (денситометра).

### Результаты и обсуждение

С целью подбора из числа быстрорастущих видов НТМ эталонного штамма, сопоставимого по устойчивости с *M. terrae*, были выполнены исследования по сравнительной оценке эффективности дезинфекционных средств из различных химиче-

ских групп в отношении тест-культуры *M. terrae* ATCC 15755 и талонных штаммов *M. fortuitum* ATCC 6841, *M. smegmatis* ATCC 19420, *M. phlei* ATCC 11758 при воздействии двукратных последовательных разведений дезинфектантов (кроме перекиси водорода). Экспозиция для всех дезинфектантов составляла 1 час.

Количественный учёт результатов проводили с учётом сроков роста тест-культуры в опыте и контроля: 20 суток – для *M. terrae* и 4–5 суток – для быстрорастущих видов микобактерий. По числу колоний определяли среднее количество жизнеспособных клеток микобактерий в контроле и выживших в опыте (КОЕ/мл) после воздействия дезинфектанта, с последующим определением десятичных логарифмов и фактора редукции (RF) числа бактерий в опыте по сравнению с контролем. При значении RF не менее 5 воздействие дезинфектантов в данной концентрации и экспозиции считалось эффективным.

Результаты сравнительной оценки эффективности дезинфектантов в отношении тест-культур *M. terrae* и эталонных штаммов быстрорастущих видов представлены в таблице.

Как следует из данных, представленных в таблице, минимальные эффективные концентрации всех дезинфектантов, установленные при их 2-кратных разведениях в отношении каждой тест-культуры, имели близкие значения при повторных исследованиях. Отмечались существенные различия в эффективности 5 из 6 изученных дезинфекционных средств по отношению к *M. smegmatis*

Таблица. Сравнительная оценка эффективности дезинфектантов в отношении тест-культур *M. terrae* и быстрорастущих видов микобактерий

Тест-культура	Исследование	Минимальные эффективные концентрации дезинфектантов (в %) на основе					Устойчивость
		глутарового альдегида	соли дихлоризоциануровой кислоты	додециламина, ЧАС	глутарового альдегида, гуанидина	гуанидина, ЧАС	
<i>M. terrae</i> ATCC 15755	1	0,62	0,019	0,5	19,2	> 10	4,0
	2	0,62	0,019	0,5	19,2	> 10	4,0
	3	0,62	0,019	0,5	19,2	> 10	4,0
	4	0,62	0,019	0,5	19,2	> 10	4,0
	5	0,62	0,09	0,5	19,2	> 10	4,0
<i>M. fortuitum</i> ATCC 6841	1	0,62	0,019	0,5	19,2	> 10	4,0
	2	0,62	0,019	0,5	19,2	> 10	4,0
	3	0,62	0,019	0,5	19,2	> 10	4,0
	4	0,62	0,019	0,5	19,2	> 10	4,0
	5	0,31	0,019	0,5	19,2	> 10	4,0
<i>M. smegmatis</i> ATCC 19420	1	0,16	0,009	0,5	4,8	2,5	3,0
	2	0,16	0,009	0,5	4,8	2,5	3,0
	3	0,16	0,009	0,5	4,8	2,5	3,0
<i>M. phlei</i> ATCC 11758	1	0,16	0,0047	0,5	4,8	2,5	3,0
	2	0,16	0,0047	0,5	4,8	2,5	3,0
	3	0,16	0,0047	0,5	4,8	2,5	3,0

и *M. phlei* по сравнению с *M. terrae*. *M. smegmatis* и *M. phlei* проявили значительно большую чувствительность к дезинфектантам на основе глутарового альдегида, дихлоризоциануровой кислоты, глутарового альдегида и гуанидина, гуанидина и ЧАС (минимальные эффективные концентрации ниже в 2–4 раза).

Величины минимальных эффективных концентраций всех 6 дезинфицирующих средств в отношении *M. fortuitum* и *M. terrae* имели близкие значения, что свидетельствует о возможности применения тест-культуры *M. fortuitum* для оценки эффективности дезинфектантов в отношении микобактерий.

### Литература

1. Еремеева, Н. И., Канищев В. В., Кравченко М. А., Вахрушева Д. В. Состояние проблемы выбора дезинфицирующих средств для дезинфекции поверхностей объектов противотуберкулезного стационара // Туберкулез и болезни легких. – 2015. – № 2. – С. 12–19.
2. Залуцкая, О. М., Сагальчик Е. Р., Суркова Л. К. Руководство по лабораторной диагностике туберкулеза. – Минск, 2013. – С. 50–52.
3. Канищев, В. В., Еремеева Н. И. Некоторые аспекты эффективности и возможных негативных последствий использования дезсредств в медицинских организациях // Ремедиум приволжье. – 2017. – № 6(156). – С. 26–30.
4. Методы лабораторных исследований и испытаний дезинфекционных средств для оценки их эффективности и безопасности: Руководство Р4.2.2643–10. – М., 2011.
5. Палий, А. П. Видовая устойчивость разных видов микобактерий к дезинфектанту «Экоцид С» // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2013. – № 8(106). – С. 84–86.
6. Палий, А. П. Туберкулоцидные свойства дезинфицирующих препаратов серии «Бланидас» // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2014. – № 3(113). – С. 97–101.
7. Cortesia, Claudia, Bello Teresita, Gustavo Lopez et al. Use of green fluorescent protein labeled non-tuberculous

mycobacteria to evaluate the activity quaternary ammonium compound disinfectants and antibiotics // Brazilian Journal of Microbiology. – 2017. – Vol. 48, Issue 1. – P. 151–158.

8. Burgess, Winona, Margolis Alyssa, Gibbs Sara et al. Disinfectant Susceptibility Profiling of Glutaraldehyde-Resistant Nontuberculous Mycobacteria // Infect Control Hosp Epidemiol. – 2017. – № 38(7). – P. 784–791. doi: 10.1017/ice.2017.75. Epub 2017 May 2.

### References

1. Eremeeva, N. I., Kanishchev V. V., Kravchenko M. A., Vahrusheva D. V. Sostoyanie problemy vybora dezinficiruyushchih sredstv dlya dezinfekcii poverhnostej ob"ektov protivotuberkuleznogo stacionara // Tuberkulez i bolezni legkih. – 2015. – № 2. – С. 12–19.
2. Zaluцкая, O. M., Sagal'chik E. R., Surkova L. K. Rukovodstvo po laboratornoj diagnostike tuberkuleza. – Minsk, 2013. – S. 50–52.
3. Kanishchev, V. V., Eremeeva N. I. Nekotorye aspekty effektivnosti i vozmozhnyh negativnyh posledstvij ispol'zovaniya dezsredstv v medicinskih organizacijah // Remedium privolzh'e. – 2017. – № 6(156). – S. 26–30.
4. Metody laboratornyh issledovanij i ispytaniy dezinficionnyh sredstv dlya ocenki ih effektivnosti i bezopasnosti: Rukovodstvo R4.2.2643–10. – M., 2011.
5. Palij, A. P. Vidovaya ustojchivost' raznyh vidov mikobakterij k dezinfektantu «Ekocid S» // Vestnik Altajskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. – 2013. – № 8(106). – S. 84–86.
6. Palij, A. P. Tuberkulocidnye svojstva dezinficiruyushchih preparatov serii «Blanidas» // Vestnik Altajskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. 2014. – № 3(113). – S. 97–101.
7. Cortesia, Claudia, Bello Teresita, Lopez Gustavo et al. Use of green fluorescent protein labeled non-tuberculous mycobacteria to evaluate the activity quaternary ammonium compound disinfectants and antibiotics // Brazilian Journal of Microbiology. – 2017. – Vol. 48, Issue 1. – P. 151–158.
8. Winona Burgess, Alyssa Margolis, Sara Gibbs et al. Disinfectant Susceptibility Profiling of Glutaraldehyde-Resistant Nontuberculous Mycobacteria // Infect Control Hosp Epidemiol. – 2017. – № 38(7). – P. 784–791. doi: 10.1017/ice.2017.75. Epub 2017 May 2.

Поступила 25.10.2024 г.