

УДК: 616-093/- 098: 576. 852. 211

**К.Ф. Чернушенко, О.А. Журило, М.Т. Клименко, А.І. Барбова,
С.Г. Ясир, Ж.Е. В'ялих, П.С. Трофімова**
**БІОЛОГІЧНІ ОСОБЛИВОСТІ L-ФОРМ МІКОБАКТЕРІЙ ТУБЕРКУЛЬОЗУ, ЩО
ВИДІЛЕНІ У ХВОРИХ НА ТУБЕРКУЛЬОЗ ЛЕГЕНЬ**

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

Збудник туберкульозу людини — мікобактерії туберкульозу (МБТ) під впливом тривалої антибактеріальної терапії хворих зазнає суттєвих біологічних змін. Зокрема мікобактерії туберкульозу можуть трансформуватися в L-форми МБТ, які являють собою бактеріальні клітини, дефектні по клітинній оболонці або ж повністю позбавлені її [6]. Ці нові морфологічні форми з новими біологічними властивостями тривалий час зберігаються в організмі хворого і спроможні затримати його одужання або ж спричинити рецидив захворювання. Хворі на туберкульоз в процесі лікування перестають виділяти типові форми збудника хвороби, але продовжують протягом тривалого часу залишатися джерелом туберкульозної інфекції [4, 5, 9]. Тому при негативних бактеріоскопії та посіві на МБТ у хворих з клінічними ознаками туберкульозу потрібно робити посів на L-форми МБТ [3, 8].

Виявлення L-форм МБТ методами бактеріоскопічного дослідження являє собою значні труднощі. Це пояснюється тим, що бактерії в L-формі характеризуються порушенням синтезу клітинної стінки, а часто зовсім її не мають. В зв'язку з цим вони не сприймають звичайних фарбників і не можуть бути виявленими при мікроскопічному дослідженні. Фазово-контрастна мікроскопія нативних препаратів досліджуваного патологічного матеріалу також не дозволяє виявити біологічно змінені форми збудника, оскільки форми незбалансованого росту мікобактерій, для яких характерна велика морфологічна різноманітність, важко відрізнити при мікроскопії від елементів харкотиння, розрушених клітин епітелію, клітинного детриту тощо.

У зв'язку з цим культуральний метод являється основним, який дозволяє виділити L-форми МБТ із патологічного матеріалу, отримати чисту культуру L-форм, вивчити їх морфологію, схильність до реверсії в бактеріальну форму та видову належність. L-форми МБТ для свого культивування потребують спеціальних живильних середовищ, що містять стабілізатори та осмотичні протектори. Ці змінені форми збудника виділяють із патологічного матеріалу на напіврідкому середовищі за методикою І.Р. Дорожкової [2].

Патологічний матеріал перед посівом обробляють 3 %-ним розчином сірчаної кислоти, яка знищує супутню неспецифічну мікрофлору. Ця обставина підтверджує те, що виділені L-форми належать до мікобактерій, для яких характерна кислотостійкість.

Матеріалом для дослідження на L-форми може бути будь-який патологічний субстрат: харкотиння, промивні води бронхів та шлунку (переважно у дітей), матеріал, отриманий при бронхоскопії, сеча, пунктат із закритих порожнин (спинно-мозкова рідина, ексудати та трансудати із плевральної та черевної порожнин, гній із натічників та ін.), матеріали біопсій, резекцій, аутопсій, органи експериментальних тварин. Правила взяття пато-

логічного матеріалу не відрізняються від загальноприйнятих при дослідженні на мікобактерії туберкульозу.

Посіви на L-форми здійснювали згідно з рекомендаціями І.Р. Дорожкової та співавт. [2].

Виділені із патологічного матеріалу культури L-форм в подальшому пасували (пересівали) на живильні середовища з метою визначення ступеня їх стабільності та отримання можливої реверсії в вихідний бактеріальний вид. Останнє необхідно для підтвердження видової належності виділених L-форм, а головне, для визначення лікарської чутливості штама-ревертанта до протитуберкульозних препаратів з метою корекції хіміотерапевтичного режиму.

При пасуванні культуру L-форм пересівали на свіже живильне середовище і інкубували в термостаті при 37 °С протягом 3-4 тижнів з подальшим переглядом макроскопічно та за допомогою фазового контрасту. Необхідною умовою пасування явився пересів кожної отриманої культури L-форм на 2 пробірки з напіврідким живильним середовищем Дорожкової та на щільне живильне яєчне середовище Льовенштайна-Єнсена або Фінна-2. Щільні середовища використовувалися для отримання реверсії.

У ревертантних штамів вивчалися морфологічні, культуральні, тінкторіальні, ферментативні властивості та чутливість до антибактеріальних препаратів. Всі досліджені властивості порівнювали з такими у типових МБТ, виділених у тих самих хворих. В роботі користувалися Приказом МЗ СРСР №558 [7]. Для більш швидкого визначення стабільності культури L-форм, чи її нестабільності (тобто схильності до реверсії) була застосована методика прискореної реверсії L-форм мікобактерій [1].

Вірулентність ревертантних штамів МБТ вивчали на найчутливіших до туберкульозу лабораторних тваринах — морських свинок. Свинок вагою 250 — 300 г інфікували підшкірно в праве стегно по 0,1 мг сухої маси культури МБТ в об'ємі 0,5 мл фізіологічного розчину хлористого натрію. Спостереження за тваринами проводили протягом 3-х міс. Загиблим протягом цього терміну свинкам робили розтин і оцінювали індекс туберкульозних уражень лімфовузлів та внутрішніх органів. Якщо свинки не гинули протягом цього терміну, їх забивали за допомогою ефіру і робили розтин. Туберкулезні ураження оцінювали за методикою Р.О. Драбкіної. Контролем була вірулентність лабораторного штаму МБТ H₃₇Rv, яким інфікували свинок в тій же дозі.

Найчастіше культури L-форм висівались через деякий час після припинення бактеріовиділення типових МБТ. Так із всіх культур L-форм, отриманих від хворих — бактеріовиділювачів типових форм МБТ, паралельно з типовими виділяли L-форми в 30,7 % випадків. Решту культур L-форм (69,3 %) було отримано після припинення виділення типових МБТ через 1—5 міс. Тобто проявилася зворотньо-пропорційна залежність між виділенням типових МБТ і їх L-трансформованих варіантів.

При посіві на L-форми в позитивних випадках в товщі напіврідкого середовища Дорожкової було видно ніжний хмаркоподібний ріст у вигляді колоній або ділянок помутніння середовища нерівномірної оптичної щільності, котрі частіше розподілялися в верхніх шарах стовпчика живильного середовища.

У випадку реверсії на щільних живильних середовищах виявлявся ріст типових або змінених кислотостійких мікобактерій (нерідко пігментованих), а на напіврідкому живильному середовищі (частіше у верхній частині стовпчика середовища) з'являвся ріст дрібних компактних білуватих колоній, що нагадують манну крупу. В нативному препараті при фазово-контрастній мікроскопії така колонія виглядає як мікроколонія МБТ-джугути, "коси". При забарвленні препарата за Ціль-Нільсеном видно типову мікроколонію МБТ, що складається з червоних паличок.

Штами, віднесені до категорії нестабільних L-форм, характеризувалися, як правило, рясною інтенсивністю росту, наявністю великої кількості мікроколоній, які складалися із скупчення кулястих тіл великих та середніх розмірів (30–100 мкм) з чіткою конфігурацією куль, з ознаками гомогенного пошкодження протоплазми, руйнуванням клітинних оболонок з накопиченням гомогенної безклітинної зернистості, виразною схильністю до реверсії у бактеріальну форму МБТ.

Штами, які були віднесені до категорії умовно-стабільних L-форм, характеризувалися помірним (частіше бідним) ростом, утворювали невеликі за розмірами скупчення зернистих мас з поодинокими кулястими або сферичними вакуолізованими тілами середніх та малих розмірів (20–30 мкм). Для них характерний уповільнений ріст на живильних середовищах та ослаблена життєздатність, вони не реверсували в бактеріальну форму навіть після 3 пасажу *in vitro*.

Вивчення морфології L-колоній починалося з появи перших ознак росту в напіврідкому живильному середовищі Дорожкової. Із ділянок макроскопічного помутніння середовища нерівномірної оптичної густини готували нативні препарати, які досліджували за допомогою фазово-контрастної мікроскопії. В тих випадках, коли в нативному мазку при фазово-контрастній мікроскопії виявлялись типові L-колонії, посів на L-форми вважався позитивним.

Необхідно підкреслити, що при оцінці та інтерпретації результатів культурального дослідження патологічного матеріалу на L-форми МБТ вирішальну роль в питанні визначення видової належності виділених L-форм має та обставина, що посів матеріалу на живильні середовища проводився після попередньої обробки 3 % H_2SO_4 , що повністю виключає можливість розвитку L-форм інших (некислотостійких) мікроорганізмів та значній мірі полегшує доказ видової належності виділених L-форм до мікобактерій.

На основі проведеного різнобічного вивчення виділені штами L-форм МБТ були розподілені на 2 основні категорії: нестабільні, схильні до реверсії в бактеріальну форму МБТ, яка реалізувалася на 1–3 пасажах *in vitro* та умовно-стабільні, які не реверсували в бактеріальну форму навіть після 3-х пасажів *in vitro*.

Нами були обстежені на L-форми різні групи хворих на туберкульоз легень, всього 358 пацієнтів. Результати представлені в таблиці.

Як видно із таблиці, L-форми виділяли у 30,7 % обстежених, найчастіше у хворих на хронічний деструктивний туберкульоз (46,5 %) та при рецидивах туберкульозного процесу (40,6 %). Найчастіше L-форми були

Таблиця

Виділення L-форм МБТ від хворих на туберкульоз легень

Група хворих на туберкульоз	n	Виявлено L-форми		Із них нестабільні	
		абс.	%	абс.	%
Вперше виявлений	81	26	32,1	19	73,1
Хронічний деструктивний	86	40	46,5	29	72,5
Рецидив	64	26	40,6	20	76,9
Великі залишкові зміни	50	14	28,0	6	42,8
Малі залишкові зміни	77	4	5,2	0	0
Всього	358	110	30,7	74	67,3

виділені у пацієнтів, у яких після завершення антибактеріальної терапії спостерігалися залишкові туберкульозні зміни. При цьому виявилася цікава закономірність: при великих залишкових змінах L-форми виділяли у 28,0 % обстежених, а при малих змінах — всього у 5,2 %. Знаходження L-форм майже у третини пацієнтів з великими залишковими туберкульозними змінами свідчать про активність цих змін, і потребує продовження специфічного лікування.

Схильність до реверсії L-форм в бактеріальну форму збудника проявилася у 67,3 % обстежених, найчастіше — при рецидивах захворювання (76,9 %), найрідше — при великих залишкових змінах (42,8 %). При малих залишкових змінах реверсії взагалі не спостерігали, а всі виділені L-форми були віднесені до умовно-стабільних.

Нестабільні L-форми представляли для вивчення їх біологічних властивостей особливий інтерес, оскільки саме ці змінені форми збудника являються найбільш небезпечними, реверсуючи в бактеріальну форму МБТ в організмі хворого. Крім того, існує реальна можливість вивчити їх властивості, досліджуючи біологічні особливості ревертантних культур: їх морфологічні, культуральні, тинкторіальні та ферментативні властивості, чутливість до АБП, вірулентність для лабораторних тварин.

Нами детально були вивчені біологічні особливості 87 ревертантних штамів, отриманих з нестабільних L-форм МБТ. Ці властивості були порівняні з такими у типових МБТ, виділених у тих самих хворих.

Морфологія колоній ревертантних штамів МБТ на щільних живильних середовищах повністю співпадала з морфологією типових МБТ — білувато-жовтуваті колонії, шершаві, легко знімаються бактеріологічною лопаткою з поверхні щільного середовища та з певним зусиллям розтираються в ступці. Фарбуються за Ціль-Нільсеном в червоний колір, грам + (грампозитивні). Під іммерсійною системою світлового мікроскопу — поліморфні палички такого ж розміру, як і типові МБТ. В мікрокультурі мають вигляд джугутів, які утворені паличками, що щільно прилягають одна до одної (корд-фактор). Тобто морфологічно і тинкторіально ревертантні культури не відрізняються від типових МБТ.

Для культуральних властивостей ревертантних штамів характерна відсутність росту при посівах на звичайні живильні середовища (цукровий бульйон та кров'яний агар).

Оптимальний температурний режим при культивуванні — 37 °C і відсутність росту при підвищених та низьких температурах (не ростуть при кімнатній температурі і при 42–45 °C, при якій ростуть кислотостійкі сапрофіти та деякі атипіві мікобактерії). Як і типові МБТ, ревертантні штами не ростуть на щільних живильних середовищах, які містять саліциловокислий натрій. Цей тест дає можливість диференціювати збудника туберкульозу від кислотостійких сапрофітів та атипіві мікобактерій. Як і

типів МБТ, ревертантні штами ростуть повільно: при пересівах на щільні живильні середовища макроскопічно видимий ріст з'являється після 10–12 днів інкубації і до 14–20 днів формуються добре видні неозброєним оком колонії.

Ферментативні властивості, про які ми робили висновки на основі каталазної активності, у ревертантних штамів та у типових МБТ також співпадали. Якщо ревертантний штам був чутливим до АБП, то він проявляв помірну каталазну активність. Якщо ж він був стійким до ізоніазиду в невисокій концентрації (1 мкг/мл), каталазна активність його була знижена. Якщо ж ступінь стійкості до ізоніазиду була високою (5 мкг/мл) каталазна активність його була різко знижена, а іноді навіть негативна. Саме така активність каталази властива типовим МБТ, резистентним до ізоніазиду.

Таким чином, при порівнянні морфологічних, культуральних, тинкторіальних та ферментативних властивостей ревертантних культур і типових МБТ, виділених у тих самих хворих, відмічався повний паралелізм.

Вірулентність 15 ревертантних культур була досліджена на морських свинках. Вона цілком співпадала з такою у типових МБТ.

Була також досліджена чутливість до антибактеріальних препаратів (АБП) у 87 ревертантних штамів МБТ, отриманих з нестабільних L-форм, та порівняна з такою у типових МБТ, отриманих у того самого хворого, якщо L-форми були виділені паралельно з типовими МБТ, або з останнім виділенням штамом МБТ перед припиненням типового бактеріовиділення. При цьому з'ясувалося, що в більшості випадків ця чутливість (або спектр стійкості) повністю співпадає, якщо L-форми і типові МБТ були виділені одночасно або в близькі строки (до 2-х міс.). Якщо ж L-форми були виділені через значний час після виділення типових МБТ (2–5 міс.), то у ревертантних штамів в ряді випадків спостерігається поява стійкості до нових препаратів, якими лікувався хворий, і до яких типові МБТ були раніше чутливими, або ж підсилюється ступінь уже раніше встановленої стійкості.

Можна припустити, що процес формування стійкості МБТ до АБП знаходиться у прямому зв'язку з тривалістю антибактеріальної терапії, це в рівній мірі можна віднести як до типових форм збудника, так і до його L-трансформованих варіантів.

Все сказане сприяє припущенню, що L-трансформація являється закономірним етапом розмноження МБТ в процесі їх онтогенетичного розвитку, а виділення типових МБТ після тривалого часу їх відсутності — результат реверсії L-форм в організмі хворого. Персистенція збудника туберкульозу в організмі людини очевидно здійснюється саме в його L-трансформованому варіанті (в умовно-стабільній L-формі).

Дослідження чутливості ревертантних штамів L-форм МБТ допоможе клініцистам скорегувати етіотропну терапію хворого на туберкульоз.

ВИСНОВКИ

Виділені від хворих на туберкульоз легень L-форми МБТ в 67,3 % випадків являються нестабільними і реверсують в типову бактеріальну форму МБТ. Ревертантні штами, отримані з нестабільних L-форм, мають всі властивості, притаманні збудникові туберкульозу, включаючи вірулентність для морських свинок. Чутливість до АБП ревертантних штамів співпадає з такою у типових МБТ, виділених у тих самих хворих, якщо L-форми були виділені паралельно з типовими МБТ або через невеликий термін (до 2-х міс.) після припинення бактеріовиділення. Визначення чутливості до АБП у

ревертантних штамів можна використати для корекції етіотропної терапії хворого на туберкульоз.

Виявлення L-форм в період після припинення виділення типових МБТ свідчить про те, що процес зберігає ознаки активності, та служить показником необхідності продовження специфічної хіміотерапії. Великі залишкові зміни є серйозним резервуаром туберкульозної інфекції з потенційною небезпкою реактивації специфічного процесу.

Тривала персистенція МБТ в організмі у вигляді L-форм має велике епідеміологічне значення як можливий механізм ендемічної туберкульозної інфекції.

ЛІТЕРАТУРА

1. А. с. № 1604841 СССР. Способ ускоренной реверсии L-форм микобактерий /Дорожкова И.Р., Николаева Г.М. //Открытия.- 1990. — № 12. — С.45.
2. Выделение L-форм микобактерий туберкулеза из патологического материала: Метод. рекомендации /Под ред. Дорожковой И.Р., Кочемасовой З.Н., Дыхно М.М.- Москва: Б.И., 1984. — 19 с.
3. Дорожкова И.Р. Современные возможности повышения эффективности микробиологической диагностики туберкулеза //6-й съезд фтизиатров Беларуси 10 сентября 1998 г. Тезисы докладов. — Минск, 1998. — С.179–180.
4. Значение L-трансформации и реверсии возбудителя в эпидемиологии туберкулеза / Хоменко А.Г., Кочемасова З.Н., Дыхно М.М. и др. // Журн. микробиол., эпидемиол. и иммунол. — 1994. — № 3. — С. 9–14.
5. Клинические значения L-трансформированных микобактерий у больных впервые диагностированным туберкулезом легень /Новожилова И.О., Сахелашвили М.И., Капраль О.Я. //Укр. пульмон. журн.- 2001. — №4. — С.49–52.
6. L-формы микобактерий туберкулеза /Под ред. Кочемасовой З.Н. — Москва: Медицина, 1980. — 176 с.
7. Приказ МЗ СССР №558 "Об унификации микробиологических методов исследования при туберкулезе". Москва, 1978. — 72 с.
8. Хоменко А.Г. Туберкулез вчера, сегодня, завтра // Пробл. туберкулеза. — 1997. — № 6. — С. 9–11.
9. Хоменко А.Г., Муратов В.В. Эпидемиологическая опасность очагов туберкулезной инфекции с наличием лиц, выделяющих L-формы микобактерий туберкулеза //Пробл. туберкулеза.- 1993. — № 2. — С. 2–5.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ L-ФОРМ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА, ВЫДЕЛЕННЫХ ОТ БОЛЬНЫХ ТУБЕРКУЛЕЗОМ ЛЕГКИХ

**Е.Ф. Чернушенко, А.А. Журило,
М.Т. Клименко, А.И. Барбова,
С.Г. Ясырь, Ж.Э. Вялых, П.С. Трофимова**

Резюме.

Изучение биологических свойств L-форм микобактерий туберкулеза, выделенных у больных деструктивным туберкулезом легких, показало, что в 67,3 % случаев L-формы оказались нестабильными и реверсировали в бактериальную форму возбудителя. Ревертантные штаммы обладают всеми свойствами, присущими типичным микобактериям туберкулеза, включая вирулентность для морских свинок.

BIOLOGICAL FEATURES OF L-FORMS OF M. TUBERCULOSIS ISOLATED FROM PULMONARY TUBERCULOSIS PATIENTS

**E.F. Chernushenko, O.A. Zhurilo,
M.T. Klimenko, A.I. Barbova,
S.G. Yasir, Zh.E. Vyalykh, P.S. Trofimova**

Summary

Studying biological features L-forms M. tuberculosis isolated from patients with destructive pulmonary tuberculosis we demonstrated, that L-forms were non-stable and reversed to bacterial forms in 67,3 % of cases. Reversed strains had all features in character of typical M. tuberculosis, including virulent for guinea pigs strains.