

**О. А. Журило, А. І. Барбова, П. С. Трофімова,
С. В. Миронченко, М. Т. Клименко, С. Г. Ясир, Л. В. Гайова**
**БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ M. TUBERCULOSIS, ВИДІЛЕНИХ ВІД ХВОРИХ
З ПЕРВИННОЮ МЕДИКАМЕНТОЗНОЮ СТІЙКІСТЮ**

*Інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського АМН України,
Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця*

Нині туберкульоз є найпоширенішою в світі інфекційною хворобою, яка посідає перше місце за смертністю людей від інфекційних захворювань. Сучасна епідемія туберкульозу в Україні набрала глобальних масштабів [5].

На думку деяких дослідників, причини негативних змін в епідеміології туберкульозу в останні роки пов'язані не тільки зі зниженням соціального рівня життя громадян, незабезпеченістю програм боротьби з туберкульозом, але й зі змінами біологічних характеристик людини і збудника. Інтенсивне поширення туберкульозної інфекції супроводжується наростанням агресивних властивостей збудника — високої життєздатності, медикаментозної стійкості (МС) [1, 3].

Неабиякий вплив на зростання захворюваності на туберкульоз має збільшення питомої ваги хіміорезистентних варіантів збудника, що з одного боку погіршує перебіг хвороби, а з іншого — призводить до нових випадків туберкульозу з множинною стійкістю. Встановлено, що у різних географічних територіях близько 15–30 % вперше виявлених хворих на туберкульоз заражаються мікобактеріями туберкульозу стійкими до антимікобактеріальних препаратів (АМБП) [5].

З мікробіологічної точки зору, основними причинами, що приводять до розвитку хіміорезистентності мікобактерій туберкульозу (МБТ) є неоднорідність мікобактеріальної популяції, варіабельність її складу і ступеня вірулентності МБТ, мінливість біологічних властивостей збудника з одночасною селекцією резистентних особин у результаті неадекватної хіміотерапії [2, 8].

Основне значення, безумовно, має резистентність до найбільш ефективних у даний час препаратів для лікування туберкульозу — рифампіцину та ізоніазиду. Одночасна стійкість до цих двох препаратів трактується в більшості країн як множинна медикаментозна стійкість — MDR (від Multidrug resistance). Вибіркове вивчення МС до ізоніазиду і рифампіцину за рекомендацією ВООЗ і IUATLD виявило, що MDR реєструється у 4,0–48,0 % хворих [6, 7].

Відомо, що з придбанням *M. tuberculosis* резистентності хоча б до одного з медикаментозних препаратів, змінюються біологічні властивості збудника: біохімічні (ферментативні), культуральні, а також вірулентність як прояв патогенності мікроорганізму. Вірулентність не є постійною властивістю мікроба, вона — результат великої кількості різноманітних факторів [1, 2].

Метою даного дослідження стало вивчення біологічних властивостей хіміорезистентних варіантів *M. tuberculosis*, які нами були виділені від хворих з вперше діагностованим туберкульозом легень (ВДТЛ).

Матеріали і методи

Нами була проведена робота по накопиченню штамів МБТ з МС від хворих з ВДТЛ, які знаходились в стаціо-

нарі ІФП у 2004 році. Індикація, ідентифікація та визначення медикаментозної чутливості МБТ від хворих із ВДТЛ проводили згідно з "Інструкцією з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції", затвердженій Наказом МОЗ України № 45 від 06.02.2002 р. [4].

Результати та їх обговорення

З дослідного матеріалу хворих з підозрою на туберкульоз було виділено 876 культур. Всі вони являли собою тонкі, прямі чи злегка вигнуті палички розмірами 1–10 × 0,2–0,6 мкм, зі злегка закругленими кінцями. Нерухомі, спори не утворювали, позбавлені капсул. Кислотостійкі і по Циль-Нільсену забарвлювалися в яскраво-червоний колір, фарбування аураміном давало яскраво зелене світіння на бурому тлі при люмінесцентній мікроскопії.

Виділені культури на щільному яєчному середовищі росли у вигляді шорсткуватого, зморшкуватого нальоту кремового кольору. Колонії мали піднятий центр, нагадували цвітну капусту, крихкуваті, погано знімались з середовища; на середовищі з пірватом натрію не давали росту, що безпосередньо підтверджувало їх належність до *M. tuberculosis*. Всі вони були ідентифіковані як *M. tuberculosis*.

Всі тести, які були використані для ідентифікації виділених мікобактерій, представлені в таблиці.

В результаті отриманих даних культурально-біохімічного дослідження відповідно до Bergey's Manual Determinative Bacteriology (9th Edition) виділені і відібрані для подальшого вивчення культури були віднесені до 21 групи роду *Mycobacterium* виду *Tuberculosis*.

При вивченні біологічних властивостей МБТ, виділених від хворих з ВДТЛ, була виявлена істотна залежність наявності МС у збудника туберкульозу та її частоти від швидкості росту *M. tuberculosis* на поживних середовищах та інтенсивності бактеріовиділення.

Так, у штамів *M. tuberculosis* зі збереженою чутливістю до АМБП ріст виявлявся на (20,3±2,4) добу. У вперше виявлених хворих, які виділяли монорезистентні штами, ріст спостерігався на (21,9±2,3) добу, у МБТ, стійких до 2-х препаратів, ріст спостерігався на (23,4±2,0) добу, при резистентності до 3-х АМБП — на (26,5±3,0) добу, а при наявності стійкості збудника до 4-х АМБП і більше термін виявлення росту збільшувався до (28,3±2,7) діб.

При скудному бактеріовиділенні (від 1 до 20 колоній) МС *M. tuberculosis* була виявлена у (31,6±2,3) % хворих, при помірному (від 21 до 200 колоній) — у (56,4±1,7) % випадках. При рясному бактеріовиділенні (200 — 500 колоній і більш) МС *M. tuberculosis* виявлялась у 79,3±1,4 % хворих. З 360 хворих з МС лише у 63 (17,5±2,0 %) бактеріовиділення було скудним, у 86 (23,9±2,2 %) хворих — помірним, у 211 (58,6±2,6 %) — рясним.

При скудному бактеріовиділенні в (68,2±2,7) % випадках спостерігалася монорезистентність і тільки в (31,8±2,2) % хворих була виявлена множинна МС, з них у (18,6±2,0) % виявлена МС до 2-х препаратів і у (13,2±1,7) % — до 3-х і більше АМБП. В той же час при масивному бактеріовиділенні множинна МС була виявлена

Таблиця

Культурально-біохімічні властивості виділених штамів *M. tuberculosis*

Тест	Результати тесту, характерні для виділених штамів <i>M. Tuberculosis</i>
Швидкість росту	Повільний
Утворення пігменту в темряві	—
Ріст при 22 °C	—
Ріст при 45 °C	—
Ріст на середовищі з 500 мкг/мл саліцилово-кислого натрію	—
Ріст на рідкому кров'яному середовищі по методу Прайса	Утворювали характерний для <i>M. tuberculosis</i> корд-фактор (трегалоза-6,6-диміколат), що обумовлював зближення бактеріальних клітин у мікроколоніях і ріст їх у вигляді серпантиновидних кіс, що підтверджувало вірулентність збудника.
Ріст на середовищі з додаванням жовчі	Утворювали сіруватий маслянистий наліт, сформований подовженими гіллястими паличками.
Ріст на середовищі з Твіном-80	Давали рівномірний ріст у товщі середовища, особливо при періодичному струшуванні.
Амідазна активність: — сечовина — нікотинамід — піразинамід	+ + +
Нітратредуктазна активність	+
Ніациновий тест	+
Термостабільність каталази	—

в $(84,7 \pm 2,8)$ % випадках, з них резистентність до 3-х і більше препаратів складала $(54,9 \pm 2,5)$ %.

Інтерес представляло вивчення залежності активності окисно-відновних ферментів від наявності стійкості МБТ до АМБП. Відомо, що такі ферменти, як каталаза і пероксидаза приймають активну участь у окисно-відновних процесах мікробної клітини МБТ і їх активність може служити побічним показником стійкості МБТ до АМБП, в першу чергу до ізоніазиду.

Так, з 360 досліджених штамів *M. tuberculosis*, виділених від хворих з ВДТЛ у всіх 227 чутливих культур $(63,1 \pm 2,8)$ % виявлялася активність обох ферментів. З 133 штамів *M. tuberculosis* з первинною стійкістю до препаратів активність каталази і пероксидази реєстрували у всіх 38 штамів МБТ, які мали чутливість до ізоніазиду, що склало $(28,6 \pm 3,9)$ %. У вище перерахованих культур МБТ спостерігалось швидке активне виділення пухирців кисню, яке обумовлено дією каталази і фарбування колоній у темно-коричневий колір, що обумовлено дією пероксидази. У 95 штамів МБТ, стійких до ізоніазиду $(71,4 \pm 4,6)$ % активність окисно-відновних ферментів була різко знижена.

Однією із дуже важливих властивостей вірулентних штамів *M. tuberculosis* є здатність утворення корд-фактору. Корд-фактор — це ліпоїд, екстрагований з вірулентних МБТ петролейним ефіром, має токсичні властивості, ідентифікований як трегалоза-6,61-диміколат. Наявність корд-фактору на поверхні мікробної клітини робить збудника туберкульозу більш стійким до несприятливих умов тканьового середовища, а також резистентним до АМБП. Тому цікаво було дослідити спроможність формувати збудником туберкульозу фактор вірулентності (корд-фактор) в залежності від стійкості до медикаментозних препаратів.

В наших дослідженнях корд-фактор виявляли при перегляді мазків культур, що виростили на живильних середовищах з харкотиння хворих з ВДТЛ. Мазки забарвлювали за методом Циль-Нільсена. Корд-фактор характеризувався рівнобіжним (склеєним) розташуванням бак-

теріальних клітин по відношенню один до одного і формуванням джгутів, кіс, зміжок, вусів, в тісному переплетінні окремих паличок одна з одною. Наявність корд-фактору може служити не лише диференціальною ознакою належності мікобактерій до *M. tuberculosis*, а й збереження чутливості у виділених штамів МБТ до одного з основних АМБП — ізоніазиду.

Так, серед 95 виділених штамів МБТ, стійких до ізоніазиду, 92 штама $(96,8)$ % не мали корд-фактору і лише у 3-х монорезистентних до ізоніазиду культурах — в 3,2 %, був наявним корд-фактор.

Висновки

1. Наявність у збудника туберкульозу резистентності до АМБП супроводжується затримкою росту особин мікобактеріальної популяції, що найбільш виражено при множинній МС.

2. Масивність бактеріовиділення має тенденцію до росту по мірі збільшення числа АМБП, до яких реєструється стійкість.

3. Зменшення швидкості росту, масивність бактеріовиділення та наявність корд-фактору можуть служити непрямою ознакою наявності у хворого медикаментозно-стійких варіантів МБТ.

4. Зниження активності таких ферментів, як каталаза і пероксидаза у окисно-відновних процесах мікробної клітини МБТ, може служити допоміжним показником стійкості збудника до АМБП, в першу чергу до ізоніазиду.

5. Наявність корд-фактору служить ознакою вірулентності у виділених штамів мікобактерій, а також непрямою ознакою стійкості виділених штамів мікобактерій до ізоніазиду.

ЛІТЕРАТУРА

1. Бастиан И., Порталс Ф. Туберкулёз с множественной лекарственной устойчивостью. — Москва: Медицина и жизнь, 2003. — 368 с.
2. Биологические свойства клинических изолятов *M. tuberculosis* / И. Г. Шемякин, В. Н. Степаншина, О. В. Коробова и соавт. // ЖМЭИ. — № 1. — 2002. — С. 7–11.

3. Гращенкова О. В., Вишневский Б. И. Частота и структура лекарственной устойчивости МБТ у заболевших, контактных и источников инфекции // Туберкулез сегодня: проблемы и перспективы: Матер. конф., посвященной памяти М. М. Авербаха. — Москва, 2000. — С. 194–195.
4. "Інструкція з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції", затверджена Наказом МОЗ України № 45 від 06.02. 2002 р. — Київ, 2002. — 118 с.
5. Феценко Ю. І., Мельник В. М., Кобилянська А. В. Хіміорезистентний туберкульоз. — Київ: Здоров'я, 2003. — 133 с.
6. *Anti-tuberculosis drug resistance in the world /WHO/IUATLD: Global Project on Anti-tuberculosis Drug Resistance Surveillance.* — Geneva: WHO, 2002. — 217 p.
7. *Surveillance of Tuberculosis in Europe — EuroTB: Report on tuberculosis cases notified in 2002.* — Geneva: WHO 2003. — 120 p.
8. Tower K. J. The problem of resistance M. tuberculosis // *Antimicrobial Chemotherapy.* — 2003. — V. 8. — P. 125–131.

БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ M. TUBERCULOSIS, ВИДІЛЕНИХ ВІД ХВОРИХ З ПЕРВИННОЮ МЕДИКАМЕНТОЗНОЮ СТІЙКІСТЮ

*О. А. Журило, А. І. Барбова, П. С. Трофімова,
С. В. МIRONCHENKO, М. Т. Клименко, С. Г. Ясир,
Л. В. Гайова*

Резюме

Результати проведених досліджень виявили наступні закономірності: зниження швидкості росту мікобактеріальної попу-

ляції на поживних середовищах, масивність бактеріовиділення (200–500 колоній), наявність корд-фактору у мікобактерій служить допоміжним показником наявності у хворого хіміорезистентних варіантів M. tuberculosis. Зниження активності ферментів каталази, пероксидази в окисно-відновних процесах мікробної клітини M. tuberculosis, може служити непрямою ознакою стійкості, в першу чергу до ізоніазиду.

BIOLOGICAL PROPERTIES OF M. TUBERCULOSIS, ISOLATED FROM THE PATIENTS WITH THE PRIMARY DRUG RESISTANCE

*O. A. Zhurilo, A. I. Barbova, P. S. Trophimova,
S. V. Mironchenko, M. T. Klimenko, S. G. Jasir,
L. V. Gayova*

Summary

The results of the study revealed the following peculiarities: the decreasing grows rate of the Mycobacteria' population on the nutrient mediums, the massiveness of the bacterial excretion (200–500 colonies), the presence in Mycobacteria's of the cord-factor, which serves as an indirect indicator of drug resistance. Decreased activity of catalase enzymes, peroxidase in redox processes in a microbial cell of M. tuberculosis may serve as an indirect index of resistance, mainly to isoniazid.