

О. А. Журило, А. І. Барбова, С. В. Миронченко  
ВИЗНАЧЕННЯ ОСНОВНИХ ТЕСТІВ ІДЕНТИФІКАЦІЇ МІКОБАКТЕРІЙ

ДУ "Національний інститут фтизіатрії і пульмонології імені Ф. Г. Яновського АМН України"

На сьогоднішній день на тлі високої захворюваності туберкульозом спостерігається різке зростання питомої ваги захворювань, викликаних нетуберкульозними мікобактеріями (НТМБ), які є збудниками мікобактеріозів [1, 2].

Мікобактеріози є актуальною проблемою, оскільки частіше за все виникають у хворих на СНІД та ВІЛ-інфікованих (від 10 % до 53 %). Високий рівень природної резистентності НТМБ призводить до розвитку хронічних деструктивних або десимінованих процесів у хворих з імунодефіцитами та скорочує термін їх життя. Своєчасне виявлення хворих на мікобактеріози є дуже важливим для вибору правильної тактики їх лікування. Діагностика мікобактеріозів потребує наявності надійних, стандартизованих та інформативних диференціальних тестів, які б могли відокремити НТМБ від мікобактерій туберкульозного комплексу (МБТ), які є збудниками туберкульозу [3, 4].

Відомо, що до комплексу МБТ належать наступні види мікобактерій: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*. Група НТМБ включає 45 видів. Для їх систематизації користуються класифікацією Раньона, заснованою на двох ознаках — швидкості росту і пігментоутворенні. За цим угрупованням всі атипіві мікобактерії розділені на 4-и групи. Представники перших 3-х груп ростуть повільно, 4-ї групи ростуть швидко. Найбільш патогенні для людини мікобактерії I-ї і III-ї груп. Для клініки особливе значення мають наступні види НТМБ: *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum* [5].

Диференціація мікобактерій має особливо значення також для проведення епідмоніторингу та визначення епідпрогнозу щодо циркуляції окремих видів мікобактерій.

Однак, до останнього часу в мережі практичних бактеріологічних лабораторій використовуються нестандартизовані методики ідентифікації, які потребують багато часу для підготовки реагентів, але останні не завжди відповідають високій якості [6].

Тому нами була проведена робота щодо удосконалення та стандартизації тестів диференційної діагностики мікобактерій з метою зручності їх виконання у рутинній діагностиці туберкульозу та мікобактеріозів.

#### Модифікація ніацинового тесту

Найбільш важливим тестом біохімічної диференціації мікобактерій є ніациновий тест, оскільки *M. tuberculosis* синтезує у 10–20 разів ніацину більше, ніж нетуберкульозні мікобактерії. Але все ж у 2,0–4,0 % випадків можуть спостерігатися ніациннегативні культури МБТ, а серед ізоніазидрезистентних штамів їх кількість досягає 7,2 %.

Серед нетуберкульозних мікобактерій, які, як правило, являються ніациннегативними, циркулюють деякі штами, що завжди синтезують ніацин: *M. simiae*, іноді його утворюють *M. kansasii*, *M. borstelense* та мають слабко-

позитивні тести на ніацин — *M. marinum*, *M. ulcerans* та іноді *M. intracellulare* [7].

Ніациновий тест, заснований на виявленні ніацину у щільному поживному середовищі, на якому ростуть мікобактерії, а не в самих мікобактеріях. Для цього проводиться екстракція ніацину з мікобактерій і визначення його за допомогою ціанистих або роданистих сполук калію по кольоровій реакції. Наявність яскравожовтого забарвлення свідчить про наявність ніацину. Дана методика дозволяє визначати концентрацію ніацину від 5,0 мкг/мл і вище.

На сьогоднішній день в практичних лабораторіях України при проведенні ніацинового тесту використовують смужки фільтровального паперу, який самостійно просочують відповідними реагентами. В даному випадку результати досліджень залежать від якості реагентів, якості фільтрувального паперу, з якого виготовлені смужки, кількості нанесених реагентів, тобто дана процедура не є стандартизованою.

Робота, що була нами проведена, мала мету стандартизувати та удосконалити дослідження щодо синтезу ніацину мікобактеріями. Було проведено порівняльне вивчення результатів ніацинового тесту за допомогою традиційного методу паперових смужок та запропонованого нами методу.

Для визначення синтезу ніацину досліджували водяний екстракт мікобактерій, який одержували шляхом додавання в пробірку з 3–4 тижневою культурою, яка виросла на щільному поживному середовищі, дистильованої води в кількості 1,0–1,5 мл і витримання пробірок у горизонтальному положенні 2–3 години у термостаті. Потім 0,6 мл екстракту мікобактерій досліджують на наявність ніацину.

Паперову смужку, яка просочена за методом Kilburn та Kubica 60,0 % розчином тіоціанату калію на 8,0 % розчині лимонної кислоти, 50,0 % хлораміном та 20,0 % розчином ПАСК, занурювали у пробірку з екстрактом мікобактерій тим кінцем, на який нанесені реактиви. Пробірку закривали та струшували. При позитивному тесті через 15 хвилин рідина забарвлювалася в яскравожовтий колір.

При проведенні ніацинового тесту за допомогою запропонованого нами крапельного методу застосовували також 0,6 мл екстракту мікобактерій, але після високошвидкісного центрифугування екстракту бактеріальної рідини при 3500 об/хв. — 15 хв. Після цього в пробірку з 0,6 мл конденсаційного екстракту послідовно додавали по 1 краплі вищезазначених реактивів. Після додавання кожного реактиву пробірку струшували. Потім пробірку закривали і стежили за ходом кольорової реакції. Утворення жовтого забарвлення свідчить про наявність ніацину. Відсутність забарвлення свідчить про негативну реакцію.

Обома методами нами було вивчено 816 штамів 3 — 4 тижневих культур мікобактерій з інтенсивністю росту більше, ніж 50 колоній. В табл. 1 наведені результати досліджень.

За результатами крапельного тесту, який був нами запропонований, 791 культура (96,9 %) із 816 синтезувала ніацин. При цьому 116 культур (14,2 %) були ніацин-позитивними лише за допомогою крапельного методу. Позитивна реакція на ніацин за методом паперових смужок завжди співпадала з позитивною реакцією при проведеному дослідженні за крапельним методом.

Таким чином, крапельний метод є дуже простим та зручним у використанні, специфічним та чутливим і може бути широко використаним у практичних лабораторіях.

**Модифікація визначення нітратредуктазної активності**

Безумовно, визначення ніацину є основним тестом для диференціації мікобактерій. Однак, існують випадки, коли ніациновий тест є позитивним у нетуберкульозних мікобактерій, і тому він не завжди може допомогти у складних випадках диференціальної діагностики. Тому важливо застосування інших тестів, які б у співвідношенні могли б дати чітку відповідь про належність мікобактерій до туберкульозного комплексу [8].

Одним із таких тестів є визначення редукції нітратів. 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. Це дозволяє використовувати даний тест у сполученні з ніациновим тестом для диференціальної діагностики *M. tuberculosis* та мікобактерій інших видів [9, 10].

Варто пам'ятати, що цей тест є основним для визначення *M. kansasii* і особливо *M. szulgai*, тобто *M. kansasii* (I група за Runyon), *M. fortuitum*, а також всі мікобактерії IV групи (швидкоростучі) у більшості випадків дають позитивний тест редукції нітратів. Таким чином, за допомогою ніацинового тесту і редукції нітратів можна з великою впевненістю припустити, що штами мікобактерій із позитивними результатами обох тестів являються *M. tuberculosis*, і, навпаки, мікобактерії з негативними результатами обох тестів не відносяться до МБТ [11].

Принцип методу полягає у визначенні активності нітратредуктази за кількістю відновленого нітриту з нітрату, що супроводжується кольоровою реакцією з парадиметиламінобензальдегідом.

Присутність нітриту в середовищі виявляється утворенням слабкого рожевого, темно-рожевого чи фіолетового кольору при введенні нітрит-реагенту, який абсорбовано на стрипі. Відсутність зміни забарвлення стрипу з нітрит-реагентом вказує на те, що в середовищі нітриту немає. Це може бути обумовлено двома причинами:

- нітрат не був редукований і штам дав негативну реакцію на нітрит;

Таблиця 1

**Результати порівняльного вивчення синтезу ніацину штамми мікобактерій методом паперових смужок та крапельним методом (M ± m), %**

Методи	Кількість штамів мікобактерій	
	Абс.	%
Крапельний "+" Паперовий "+"	675	82,7 ± 1,3
Крапельний "+" Паперовий "-"	116	14,2 ± 1,2
Крапельний "-" Паперовий "+"	0	0
Крапельний "-" Паперовий "-"	25	3,1 ± 0,6
Всього	816	100

Примітки: "+" — позитивний результат, "-" — негативний результат.

- можливо, нітрат перетворився в нітрит, а той у свою чергу — в закис азоту чи просто азот, які не дають позитивної реакції на нітрит-реагент, але сам штам — нітрат позитивний [11].

Нами було проведено визначення належності виділених від хворих культур мікобактерій до *M. tuberculosis* за допомогою одночасного використання ніацинового тесту і редукції нітратів. Було досліджено 711 культур. Результати представлені в табл. 2.

Позитивні результати ніацинового і нітратредуктазного тестів співпадали у 92,1 % випадків. Штами з такими результатами були віднесені до *M. tuberculosis*. При цьому кількість ніацинопозитивних штамів (98,3 %) в 1,1 разів перевищували кількість штамів, що редукували нітрати (p < 0,01). Негативний результат тесту редукції нітратів, при позитивному результаті ніацинового тесту, може бути пов'язаний з тим, що нітрат міг перетворитися в нітрит, а той в свою чергу — в закис азоту чи просто азот, що не дало кольорової реакції на нітрит-реагент, але сам штам є позитивним. Для виключення таких випадків негативного тесту нами було запропоновано додатково внесення цинку в кожне середовище, яке дало негативну нітратредуктазну реакцію при позитивному ніациновому тесті. Для цього в негативний тест додається невелика кількість порошкоподібного цинку. Він каталізує перетворення нітрату в нітрит хімічним способом. Якщо нітрат не був редукований мікобактерією, тобто якщо штам є дійсно нітрат-негативним, він буде виділений порошком цинку і червоний колір з'явиться протягом 15 хв. Якщо ж після додавання порошку цинку

Таблиця 2

**Порівняльне вивчення результатів ніацинового тесту та редукції нітратів у штамів мікобактерій (M ± m), %**

Тести	Кількість штамів					
	позитивних		негативних		всього	
	Абс.	%	Абс.	%	Абс.	%
Ніациновий	699	98,3 ± 0,5*	512	1,7 ± 0,5	711	100
Редукція нітратів	655	92,1 ± 1,0*	56	7,9 ± 1,0	711	100

Примітка. \* — p < 0,01 при порівнянні результатів ніацинового і нітратредуктазного тестів.

ніякого кольору не утворюється в середовищі, що інкубується, то це означає, що мікобактерії не тільки перетворили нітрат у нітрит, але і дали азотовмісні гази. Ці мікобактерії вважаються нітрат-позитивними.

Для проведення цих досліджень у пробірки, де після проведення класичного нітратредуктазного тесту при додаванні нітрат-реагенту не спостерігалось забарвлення, засипали дозатором порошок цинку. Результати досліджень представлені в табл. 3.

За даними табл. 3, серед 56 штамів мікобактерій, які в тесті редукції нітратів були негативними, 39 були зареєстровані як нітрат-позитивні, оскільки при подальшому вивченні вони змінили колір при додаванні цинку.

Таким чином, загальна кількість нітратпозитивних штамів мікобактерій із кількості 711 досліджених склала 694 штама (97,6 %). Отже 98,3 % штамів мікобактерій дали позитивний результат ніацинового тесту та 97,6 % були нітрат-позитивними, тому в повній мірі без додаткових тестів можна стверджувати, що 97,6 % штамів мікобактерій (694) належать до *M. tuberculosis*. Тобто додаткове застосування цинку при визначенні нітратредуктазної активності дозволяє проводити найбільш повну диференціацію мікобактерій у практичних лабораторіях.

### Обґрунтування використання тесту з паранітробензойною кислотою в практиці бактеріологічних лабораторій

Диференціація мікобактерій туберкульозу і нетуберкульозних мікобактерій базується на здатності рости на щільних поживних середовищах із хімічними реагентами. Мікобактерії туберкульозного комплексу не ростуть на середовищах з додаванням саліциловокислого натрію або паранітробензойної кислоти. Відомо, що на сьогоднішній день біля 20,0 % культур *M. tuberculosis*

мають незначний ріст на середовищі з 0,5 мг/мл саліциловокислого натрію, а 3,0 % культур МБТ мають ріст на середовищі з 1,0 мг/мл саліциловокислого натрію [9, 12].

З метою запобігання діагностичних помилок необхідно використовувати середовище з саліциловокислим натрієм у двох розведеннях — 0,5 мг/мл і 1,0 мг/мл, збільшувати термін інкубації у деяких випадках до 4 – 6 тижнів і більш прискіпливо переглядати поверхню середовища. Використання двох концентрацій ускладнює роботу, тобто використання більшої концентрації робить результат менш достовірним при наявності стійкості до меншої концентрації.

Безумовно, на сьогоднішній день, під впливом різних факторів, мікобактерії змінюють свої біологічні властивості. Тому поряд із медикаментозною резистентністю існує і стійкість до хімічних сполук, яку мікобактерії придбали в ході еволюційного розвитку.

Резистентність до саліциловокислого натрію є певною проблемою щодо використання культуральних тестів у диференціальній діагностиці туберкульозу та мікобактеріозів.

Відомо, що паранітробензойна кислота також може бути використана для культуральної ідентифікації, але її застосування було до останнього часу в Україні обмеженим. Тому нами було проведено порівняльне вивчення здатності рости мікобактерій на середовищі Левенштейна-Єнсена з саліциловокислим натрієм в концентраціях 0,5 мг/мл і 1,0 мг/мл та з паранітробензойною кислотою в концентрації 0,5 мг/мл (табл. 4).

Всього досліджено 1102 штами мікобактерій. Був виявлений ріст 266 штамів (24,1 %) на середовищі Левенштейна-Єнсена з 0,5 мг/мл саліциловокислого натрію. При збільшенні концентрації саліциловокислого натрію вдвічі в середовищі кількість штамів, що давали ріст, зменшилось більше, ніж в 2,6 разів ( $p < 0,01$ ).

На середовищі з паранітробензойною кислотою дали ріст лише 68 штамів (6,1 %), що у 3,9 разів менше, ніж на середовищі з 0,5 мг/мл саліциловокислого натрію та в 1,5 рази, ніж на середовищі з 1,0 мг/мл саліциловокислого натрію ( $p < 0,01$ ;  $p < 0,05$ ).

Подальша ідентифікація штамів мікобактерій показала, що на середовищі з 0,5 мг/мл саліциловокислого натрію дали ріст 198 штамів МБТ (17,1 %), які виявилися резистентними до такої концентрації реактиву та 68 штамів (6,2 %) нетуберкульозних мікобактерій.

На середовищі з 1,0 мг/мл саліциловокислого натрію вирости 34 штами мікобактерій туберкульозу (3,1 %)

Таблиця 3

#### Аналіз результатів нітратредуктазного тесту ( $M \pm m$ ), %

Штами мікобактерій, які:	Кількість штамів мікобактерій	
	Абс.	%
дали колір при додаванні порошку цинку	17	30,4 ± 6,1
не дали кольору при додаванні порошку цинку	39	69,6 ± 6,1
Всього	56	100

Таблиця 4

#### Порівняльне вивчення ростових здібностей мікобактерій на середовищі Левенштейна-Єнсена з різним вмістом саліциловокислого натрію та з паранітробензойною кислотою ( $M \pm m$ ), %

Середовище Левенштейна-Єнсена	Кількість штамів мікобактерій, що дали ріст	
	Абс.	%
з вмістом:		
саліциловокислого натрію 0,5 мг/мл	266	24,1 ± 1,3*
саліциловокислого натрію 1,0 мг/мл	102	9,3 ± 0,8*
паранітробензойної кислоти 0,5 мг/мл	68	6,2 ± 0,7**
Всього досліджено штамів МБТ	1102	100

Примітки: \* —  $p < 0,01$  при порівнянні ростових здібностей МБТ на середовищі з вмістом саліциловокислого натрію 0,5 мг/мл та 1,0 мг/мл.

\*\* —  $p < 0,05$  при порівнянні ростових здібностей МБТ на середовищі з вмістом 0,5 мг/мл саліциловокислого натрію та 0,5 мг/мл паранітробензойної кислоти

Таблиця 5

Тести для диференціації мікобактерій

Диференціальні Тести	Мікобактерії	
	M. tuberculosis	нетуберкульозні, що повільно ростуть
Основні біохімічні тести на наявність		
Нікотинової кислоти	+	– (крім M. simiae)
Нітратредуктази	+	±
Термостабільної каталази	–	+
Ріст на середовищі з натрієм саліциловокислим (500 мкг/мл) або паранітробензойною кислотою (500 мкг/мл)	–	+ / ±
Додаткові тести: ріст на середовищах, що містять		
Натрію хлориду 5,0 %	–	+ (крім M. marinum, M. terre)

та 68 штамів (6,2 %) нетуберкульозних мікобактерій. Збільшення концентрації саліциловокислого натрію в середовищі Левенштейна-Єнсена у 2 рази з 0,5 до 1,0 мкг/мл призвело до зменшення кількості нітрат-негативних штамів МБТ в 5,8 разів (p < 0,01). На середовищі Левенштейна-Єнсена з вмістом 0,5 мг/мл паранітробензойної кислоти дали ріст 68 штамів лише нетуберкульозних мікобактерій.

Таким чином, на всіх досліджених середовищах виростала однакова кількість нетуберкульозних мікобактерій — 68 штамів. Оскільки концентрація паранітробензойної кислоти 0,5 мг/мл сприяє росту лише нетуберкульозних мікобактерій, її застосування необхідне і є дуже інформативним при проведенні диференціації мікобактерій.

Зазначені тести виконуються одночасно з тестом медикаментозної стійкості, облік результатів тесту роблять одночасно з урахуванням тесту медикаментозної стійкості при рясному рості культури в контролях.

Таким чином, для диференціації мікобактерій нами було використано мінімальний набір біохімічних експрес-тестів:

- тест на наявність здатності продукувати нікотинову кислоту (ніациновий тест);
- тест на наявність нітратредуктазної активності (нітратредуктазний тест);
- тест на наявність термостабільної каталази;
- тест на наявність росту на середовищі з паранітробензойною кислотою.

Як додатковий тест можна використовувати ріст на середовищі, що містить 5,0 % хлориду натрію.

Первинна ідентифікація мікобактерій бактерій здійснюється за такими культуральними характеристиками: швидкість росту на щільних живильних середовищах, пігментоутворення, морфологія колоній, наявність кислотостійкості, температура росту.

За результатами проведеної роботи, ми зупинилися на наступних основних біохімічних тестах, які зведені нами в таблиці 5.

Таким чином, дані тести дозволяють проводити якісну диференціальну діагностику виділених мікобактерій, що має дуже важливе значення для лікування та моніторингу за розповсюдженістю мікобактерій.

ЛІТЕРАТУРА

1. Kirschner, R. A. Epidemiology of infection by nontuberculosis mycobacteria [Text] / R. A. Kirschner, B. S. Parkes, J. O. Falkinham //

Amer. Rev. resp. Dis. — 2007. — Vol. 145. — № 2. — P. 271 — 276.  
 2. Оттен, Т. Ф. Микобактериоз [Текст] / Т. Ф. Оттен, А. В. Васильев. — Санкт-Петербург. : Мед. пресса, 2005. — 218 с.  
 3. Нетуберкулезные микобактерии как возбудители заболеваний человека [Текст] / Т. Ф. Оттен // Сборник научных трудов. — Санкт-Петербург, 2002. С. 24—28.  
 4. Jenkins, P. A. Nontuberculosis micobacteria and disease [Text] / P. A. Jenkins // Europ. J. resp. Dis. — 2004. — Vol. 62. — P. 69—71.  
 5. Видовая принадлежность микобактерий [Текст] / Н. П. Овдиенко [и др.] // Сборник научных трудов. — Санкт-Петербург, 1996. — С. 46 — 48.  
 6. Мікробіологічні основи проведення моніторингу за медикаментозною стійкістю штамів M. Tuberculosis в Україні [Текст] : методичні рекомендації / Інститут фтизіатрії і пульмонології ім. Ф. Г. Яновського АМН України. — К., 2004. — 24 с.  
 7. Niacin-negative Mycobacterium tuberculosis isolated from patients with AIDS [Text] / N. Irving [et al] // J. Clin. Microbiol. — 2001. — Vol. 30. — № 5. — P. 1344—1346.  
 8. Griffith, D. E. Nontuberculosis micobacteria [Text] / D. E. Griffith // Curr. Open. Pulm. Med. — 203. — Vol. 3. — № 2. — P. 139—145.  
 9. Shinnick, T. M. Diagnostic mycobacteriology laboratory practices [Text] / T. M. Shinnick, R. S. Good // Clin. Infect. Dis. — 2005. — Vol. 20. — P. 291—299.  
 10. Бактериологическая и биохимическая идентификация микобактерий [Текст] : методические рекомендации / сост. Т. Ф. Оттен. — Санкт-Петербург, 2001. — 20 с.  
 11. Інструкція з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції [Текст] / Ю. І. Фещенко, О. А. Журило, А. І. Барбова // Наказ МОЗ України № 45. — К., 2002. — 118 с.  
 12. Оттен, Т. Ф. Клинико-бактериологические критерии диагностики микобактериоза легких [Текст] / Т. Ф. Оттен // БЦЖ о туберкулезе. — 1999. — № 3. — С. 16—19.

ВИЗНАЧЕННЯ ОСНОВНИХ ТЕСТІВ ІДЕНТИФІКАЦІЇ МІКОБАКТЕРІЙ

О. А. Журило, А. І. Барбова, С. В. Миронченко

Резюме

В результаті проведених досліджень запропонована модифікація тестів ідентифікації мікобактерій та визначено алгоритм її проведення за допомогою ніацинового та нітратредуктазного тестів, термостабільної каталази, тесту з саліцилатом або паранітробензойною кислотою.

DETERMINATION OF BASIC MYCOBACTERIA IDENTIFICATION TESTS

A. A. Zhurilo, A. I. Barbova, S. V. Myronchenko

Summary

As a result of the studies there was proposed a modification of Mycobacteria identification tests and the algorithm of identification using niacin and nitrate-reduction tests, thermo-stable catalase test, salicylate test or PNB acid test.