

О. А. Журило, А. І. Барбова, С. В. Миронченко, О. Р. Сметаніна, О. В. Юнацька РОЛЬ НЕТУБЕРКУЛЬОЗНИХ МІКОБАКТЕРІЙ В ЗАХВОРЮВАННІ ЛЕГЕНЬ В СУЧАСНИХ УМОВАХ

ДУ «Національний інститут фіззіатрії і пульмонології імені Ф. Г. Яновського АМН України»

В останні роки в країнах світу спостерігається збільшення випадків захворювань, які викликаються нетуберкульозними мікобактеріями, які є збудниками мікобактеріозів та туберкульозоподібних захворювань легень [3, 7]. З одного боку, це пов'язано з поширенням імундепресивних захворювань, насамперед СНІДу, який є причиною появи опортуністичних інфекцій — туберкульозу та мікобактеріозів, з другого боку, з удосконаленням методів діагностики туберкульозу, впровадженням нових технологій та розширенням спектру фено- та генотипічних методів ідентифікації, що призвело до більш ретельної розшифровки етіології захворювання [2, 4, 5, 6]. Ще однією причиною є закономірність життєдіяльності самої циркулюючої мікобактеріальної популяції — хоча б мінімальне зниження рівня захворюваності на туберкульоз призводить до поступового збільшення захворюваності на мікобактеріоз [1].

Мета роботи: вивчення наявності нетуберкульозних мікобактерій (НТМБ) у циркулюючій мікобактеріальній популяції серед хворих, що були госпіталізовані в стаціонар інституту з підозрою на туберкульоз легень, з'ясування етіологічної ролі НТМБ, їх біологічні та біохімічні властивості, морфологічні особливості та профіль медикаментозної чутливості.

Матеріали та методи дослідження

Для досягнення поставленої мети в лабораторії мікробіології НІФП були проведені бактеріологічні дослідження зразків клінічного матеріалу від хворих з підозрою на туберкульоз легень за стандартними методиками, згідно з Наказом МОЗ України № 45. Всього було обстежено 927 хворих, що знаходилися на стаціонарному лікуванні в НІФП з 2007 до 2009 року та отримано культури від 833 хворих, які були бактеріовиділювачами.

Видова ідентифікація отриманих культур складалась з двох етапів: первинної та остаточної.

При первинній ідентифікації відмічали такі властивості мікобактерій: морфологію колоній, швидкість росту, здібність до утворення пігменту, кислотостійкість, ріст при різних температурах, ріст на середовищі з саліциловокислим натрієм або паранітробензойною кислотою. Остаточна ідентифікація складалась з культуральних та деяких біохімічних тестів: ніацинового тесту, нітратредуктазного тесту, термостабільної каталази, гідролізу твіну-80 та ріст на середовищі з хлористим натрієм.

Хід досліджень щодо первинної ідентифікації НТМБ представлений на рис. 1.

При проведенні первинної ідентифікації мало значення відокремити мікобактерії туберкульозного комп-

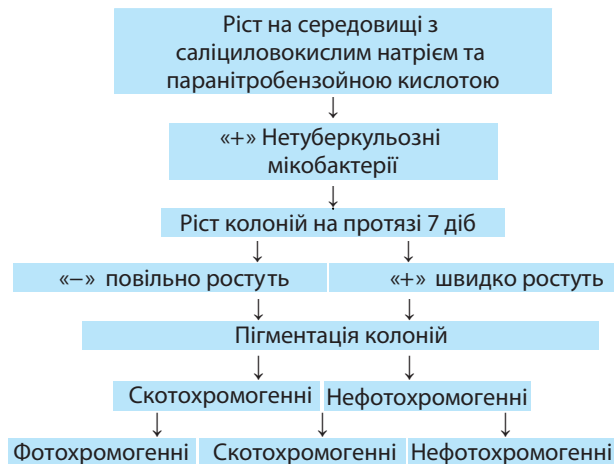


Рис. 1. Схема первинної ідентифікації нетуберкульозних мікобактерій: «+» — наявність властивості, «-» — відсутність властивості

лексу від НТМБ. Відомо, що на яєчних живильних середовищах МБТ ростуть у вигляді кольорової капусти (R-форма), колонії мають слабкий кремовий відтінок, ріст починається з 21–24 доби, в середньому складає 35 діб, оптимальна температура росту — 35–37 °С. На теперішній час до комплексу МБТ відносяться *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis-BCG*, *M. microti*, *M. africanum*, *M. caprae*.

За швидкістю росту та здатністю утворювати пігмент НТМБ (за Раньоном) поділяють на 4 групи:

1-ша група — фотохромогенні мікобактерії (утворюють пігмент жовтого або помаранчевого кольору під впливом світла);

2-га група — скотохромогенні мікобактерії (утворюють пігмент яскраво-жовтого кольору в темряві);

3-тя група — нефотохромогенні мікобактерії (не забарвлені, або мають слабкий кремовий колір);

4-та група — мікобактерії, що швидко ростуть (утворюють колонії на протязі 7 діб).

Пробірки з посівами передивлялись кожний тиждень, щоб не пропустити появи мікобактерій, які швидко ростуть. Пробірки, в яких відмічали ріст культури, виймали з термостату, залишали при кімнатній температурі та денному світлі на добу. Це було необхідно для з'ясування спроможності мікобактерій утворювати пігмент при світлі, тобто потрібно було вирішити, чи можна буде їх в подальшому віднести до фотохромогенних мікобактерій.

Серед 833 культур, які були виділені від хворих з підозрою на туберкульоз, спостерігався повільний ріст.

При дослідженні форми та морфології колоній було відмічено, що в 16-ти пробірках від 8-ми хворих одночасно спостерігався ріст колоній з кремовим і жовтим забарвленням при культивуванні в темряві. Зовнішньо колонії були сухими, шорохуватими, товстими з нерівни-

ми краями (R-форма). В інших пробірках було відмічено ріст колоній тільки з кремовим кольором, але по морфології колонії розрізнялися, в деяких пробірках спостерігався ріст в вигляді R-форми, в інших — колонії росли у вигляді S-форми, були гладкими та блискучими. При подальшому спостереженні за можливістю утворення пігменту було відмічено, що після 24 годин знаходження пробірок з посівами на світлі при кімнатній температурі в 12-ти пробірках з культурами від 6-ти хворих з'явилось жовто-помаранчеве забарвлення деяких колоній на тлі колоній з кремовим кольором.

При більш ретельному вивченні морфології колоній, що вирости в цих 12-ти пробірках, було виявлено, що серед грубих R-колоній з кремовим кольором на середовищі одночасно росли дрібні, випуклі колонії з гладкою блискучою поверхнею яскраво-жовтого кольору. З цих колоній готували окремі препарати. З усіх отриманих культур були зроблені препарати для світлової бактеріоскопії, фарбування проводилося за методом Циля-Нільсена. Всі культури були кислотостійкими. Це є підтвердженням того, що всі виділені культури були мікобактеріями.

Особливу увагу ми звернули на вивчення методом бактеріоскопії препаратів, які зроблені з культур, що містили різні за морфологією та забарвленням колонії. В культурах, що утворювали пігмент на світлі, при бактеріоскопії палички були великими, розташовувалися хрестоподібно. Культури, що утворювали пігмент в темряві, при бактеріоскопії були довгими, ниткоподібними паличками, розташовувалися паралельно між собою, тобто у них був виражений корд-фактор. Мікобактерії, що росли у вигляді пігментованих колоній, корд-фактору не утворювали. Колонії з кремовим кольором, що одночасно росли в пробірках з пігментованими колоніями, мали вигляд тонких паличок, розташованих під кутом.

В подальших дослідженнях було розглянуте питання щодо наявності атипичних мікобактерій 3-ої групи серед виділених мікобактерій. Це є складним завданням, оскільки нефотохромогенні мікобактерії за морфологією колоній, відсутністю забарвлення колоній, швидкістю росту, оптимальною температурою росту та за бактеріоскопічною характеристикою практично не відрізняються від мікобактерій туберкульозу.

В ході проведених досліджень було зроблено припущення, що в деяких пробірках вирости мікст-культури *M. tuberculosis/bovis complex* і НТМБ 1-ої та 2-ої груп. Безсумнівно, що популяція мікобактерій, яка виділяється з організму хворого, є неоднорідною та в деяких випадках може містити мікст-культури мікобактерій туберкульозу й нетуберкульозних мікобактерій, тому цілком можливо серед виділених культур очікувати ріст мікстів культур туберкульозного комплексу та нефотохромогенних мікобактерій.

Для підтвердження цього припущення були здійснені дослідження із застосуванням методу ДНК-гібридизації, який був нами запропонований для проведення скринінгу матеріалу від хворих з метою виявлення мікобактерій туберкульозного комплексу. Подальші дослідження були спрямовані також на більш ретельне вивчення усіх виділених культур, роз'єднання мікст-культур, отримання окремих атипичних культур міко-

бактерій та проведення остаточної ідентифікації виділених мікобактерій.

Для цього всі виділені культури мікобактерій досліджували методом прямої ДНК-гібридизації та застосовували методику культуральної ідентифікації мікобактерій за допомогою середовища Левенштейна-Єнсена з саліциловокислим натрієм (500 мкг/мл). Ця хімічна речовина інгібує ріст мікобактерій туберкульозного комплексу, а інші мікобактерії в його присутності добре ростуть.

З культур, що вирости в кожній пробірці, готували бактеріальну суспензію в ізотонічному розчині хлориду натрію. Потім одну частину бактеріальної суспензії з кожної культури застосовували для прямої ДНК-гібридизації, а другу — засівали по 0,3 мл на 2 пробірки з саліциловокислим натрієм та на 2 пробірки з паранітробензойною кислотою. Посіви інкубували при 37 °С до появи росту. Посіви переглядали один раз на тиждень.

В результаті дослідження бактеріальних суспензій культур від 833 хворих методом прямої ДНК-гібридизації було встановлено, що всі зразки містили мікобактерії туберкульозного комплексу. Це є підтвердженням нашого припущення, що серед виділених культур 14 були мікст-мікобактеріями туберкульозного комплексу і нетуберкульозних мікобактерій. При аналізі результатів культуральних тестів ідентифікації, був виявлений ріст в 48-ми пробірках на обох середовищах від 24-х хворих.

Для подальшого дослідження було зроблено пересів культур з середовища з саліциловокислим натрієм на свіжу серію середовища Левенштейна-Єнсена. На 10 — 15 добу був зафіксований ріст мікобактерій на середовищі від 24-х хворих. В 6-ти пробірках (від 3-х хворих) спостерігався ріст однакових колоній, що були яскраво-жовтого кольору. Колонії були дрібними, випуклими з гладкою блискучою поверхнею. При бактеріоскопічному дослідженні виділені культури мали вигляд довгих, ниткоподібних кислотостійких паличок, які розташовувалися паралельно між собою, корд-фактору не утворювали.

При ретельному вивченні морфології колоній в пробірках, що дали ріст, було виявлено, що в 12-ти пробірках (від 6-ти хворих) вирости сухі кремові колонії, в інших 36-ти пробірках (від 18-ти хворих) ріст спостерігався у вигляді плівки, був дуже ніжним. При подальшому культивуванні цих 36 пробірок протягом 24 годин під впливом світла, в 16-ти пробірках була зафіксована поява жовтого забарвлення колоній. Результати проведених досліджень представлені в табл. 1.

Культури, що утворювали пігмент на світлі, при бактеріоскопічному дослідженні мали вигляд великих кислотостійких паличок, які розташовувалися хрестоподібно, корд-фактору не утворювали. Культури, що не утворювали пігменту на світлі, при бактеріоскопічному дослідженні мали поліморфізм: були виявлені і короткі кислотостійкі палички, і кислотостійкі кокові форми. Результати ідентифікації виділених культур НТМБ за допомогою середовищ з саліциловокислим натрієм та паранітробензойною кислотою представлені в табл. 2.

Таким чином, було зроблено висновок, що за результатами первинної ідентифікації, враховуючи такі ознаки, як швидкість росту, морфологія колоній, здібність утворювати пігмент, наявність кислотостійкості, характер

Таблиця 1

Результати первинної ідентифікації виділених культур мікобактерій

Властивості культури	Виділені культури мікобактерій			
	МБТ	мікст-культури		
		МБТ «+» фотохромогенні НТМБ	МБТ «+» скотохромогенні НТМБ	МБТ «+» нефотохромогенні НТМБ
Швидкість росту	П	П	П	П
Пігментація колоній	К	К + Ж (на світлі)	К + Ж (в темряві)	К
Ріст при 37 °С	«+»	«+»	«+»	«+»

Примітки: П — повільний ріст; К — кремовий колір колоній; Ж — жовтий пігмент колоній; «+» — наявність росту колоній.

Таблиця 2

Результати визначення груп (за Раньоном) нетуберкульозних мікобактерій після первинної ідентифікації

Групи НТМБ	Кількість виділених НТМБ		
	абс	М ± m, % від загальної кількості культур	М ± m, % від кількості культур НТМБ
Фотохромогенні	6	0,7 ± 0,2	25,0 ± 8,8 *
Скотохромогенні	8	0,9 ± 0,3	33,3 ± 9,6*
Нефотохромогенні	10	1,2 ± 0,4	41,7 ± 10,1*
Всього культур нетуберкульозних мікобактерій	24	2,8 ± 0,6	100
Всього виділено культур мікобактерій	833	100	–

Примітка. * – p > 0,05 при порівнянні між собою показників виділення НТМБ різних груп.

розташування паличок у бактеріоскопічних препаратах, ріст на середовищах з саліциловокислим натрієм та з паранітробензойною кислотою, культури, які були виділені від 833 хворих були ідентифіковані як мікобактерії, з них у 809 хворих були виділені мікобактерії туберкульозного комплексу, від 24 хворих були виділені нетуберкульозні мікобактерії, які склали 2,8 % від загальної кількості виділених мікобактерій. Виділення кожної з цих культур було підтверджено двічі. Найбільшу кількість серед НТМБ склали нефотохромогенні мікобактерії — 41,7 %. Фотохромогенні мікобактерії склали мінімальну кількість — 25,0 %, скотохромогенні мікобактерії виділялись на рівні 33,3 %. При цьому достовірної різниці між розповсюдженістю усіх груп НТМБ не спостерігалось.

Подальші дослідження були спрямовані на проведення ретельної біохімічної ідентифікації.

Для проведення остаточної ідентифікації застосовували наступні біохімічні диференціальні тести: ніациновий тест, тест редукції нітратів, визначення термостабільної каталази 68° С, гідроліз твіну-80. Методики досліджень здійснювали згідно нормативних документів МОЗ та АМН України. Результати досліджень представлені в табл. 3.

Дані табл. 3, які відображають результати ключових біохімічних тестів, що були нами застосовані як для

Таблиця 3

Тести біохімічної ідентифікації нетуберкульозних мікобактерій

Тести ідентифікації	Групи нетуберкульозних мікобактерій		
	фотохромогенні	скотохромогенні	нефотохромогенні
Ніациновий	–	–	–
Нітратредуктазний	+	–	–
Термостабільна каталаза 68 °С	+	+	+
Гідроліз твіну-80	+	–	–
Ріст на середовищі з тибоном	–	+	+

Примітки: «+» – позитивний результат тесту; «–» – негативний результат тесту.

диференціації мікобактерій туберкульозного і нетуберкульозного комплексу, так і для диференціації груп НТМБ, дозволили нам визначити вид НТМБ, які були виділені з мокротиння хворих. Результати видової ідентифікації виділених мікобактерій представлені в табл. 4.

Таблиця 4

Результати остаточної ідентифікації мікобактерій

Примітка. * – p > 0,05 при порівнянні між собою показників виділення

Вид НТМБ	Кількість виділених НТМБ		
	абс	М ± m, % від загальної кількості виділених мікобактерій	М ± m, % від загальної кількості НТМБ
M. kansasii	6	0,7 ± 0,2	25,0 ± 8,8*
M. xenopi	8	0,9 ± 0,3	33,3 ± 9,6*
M. avium-complex	10	1,2 ± 0,4	41,7 ± 10,1*
Всього культур НТМБ	24	2,8 ± 0,6	100
Всього виділено культур мікобактерій	833	100	–

окремих видів НТМБ.

З даних табл. 4 видно, що нами були виділені наступні НТМБ: M. kansasii (фотохромогенні мікобактерії), M. xenopi (скотохромогенні мікобактерії), M. avium-complex (нефотохромогенні мікобактерії).

Результати досліджень довели, що, частіше за все, з мокроти хворих на туберкульоз легень виділялись M. avium-complex (MAC) — 41,7 %, рідше – M. xenopi (33,3 %), мінімальною була питома вага виділення M. kansasii — 25,0 %. При цьому достовірної різниці між розповсюдженістю виділених видів НТМБ не спостерігалось (p > 0,05). Всі виділені НТМБ є чинниками туберкульозоподібних захворювань легень.

Подальші дослідження були спрямовані на визначення МС виділених штамів НТМБ та мікст-культур з МБТ. Визначення чутливості до АМБП 1-го та 2-го ряду проводили за методом пропорцій на щільному середовищі Левенштейна-Єнсена за стандартною методикою.

Тест медикаментозної чутливості ставили із застосуванням чистої культури НТМБ, що виростала на пробір-

Таблиця 5

Результати тесту медикаментозної чутливості нетуберкульозних мікобактерій та мікст-культур мікобактерій

Культури мікобактерій	Кількість штамів мікобактерій з медикаментозною стійкістю						
	монорезистентні		полірезистентні		мультирезистентні		всього
	абс	M ± m, %	абс	M ± m, %	абс	M ± m, %	абс
НТМБ	5	20,8 ± 8,3* °	4	16,7 ± 6,86** °	15	62,5 ± 9,8* °	24
Мікст: НТМБ + МБТ	0	0	7	29,2 ± 9,3** #	17	70,8 ± 9,3* #	24

Примітки: * — $p < 0,001$ при порівнянні між собою показників виділення монорезистентних та мультирезистентних штамів НТМБ, ° — $p < 0,001$ при порівнянні між собою показників виділення монорезистентних та полірезистентних штамів НТМБ, ** — $p > 0,05$ при порівнянні між собою показників виділення полірезистентних штамів НТМБ та мікст-культур, • — $p < 0,001$ при порівнянні між собою показників виділення мультирезистентних штамів НТМБ та мікст-культур, # — $p < 0,001$ при порівнянні показників виділення полірезистентних штамів НТМБ та мікст-культур.

ках із свіжим середовищем Левенштейна-Єнсена. Одночасно тестували на чутливість до АМБП відповідну мікст-культуру. Результати тесту медикаментозної чутливості представлені в табл. 5.

При аналізі даних табл. 5 видно, що в структурі МС НТМБ переважали мультирезистентні штами, які склали 62,5 %, їх рівень виділення в 3 рази перевищував показник розповсюдження монорезистентних штамів НТМБ та в 3,7 рази — показник виділення полірезистентних варіантів НТМБ, який був найнижчим в структурі МС нетуберкульозних мікобактерій — 16,7 %.

При аналізі показників мультирезистентності виявлено, що в структурі МС мікст-культур цей показник був максимальним — 70,8 %, він в 2,4 рази був вищим за рівень виділення полірезистентних мікст-культур мікобактерій та на 8,3 % перевищував питому вагу виділених мультирезистентних штамів НТМБ.

Циркуляція мікст-культур мікобактерій в організмі хворого безсумнівно обтяжує стан пацієнтів, потребує призначення лікування з урахуванням найгірших результатів МС. Хворі таким чином довгий час залишаються бактеріовиділювачами, що призводить до подальшого погіршення дуже несприятливої епідеміологічної ситуації з туберкульозу.

Висновки

1. Проведені дослідження показали, що з мокротини хворих з підозрою на туберкульоз, які були госпіталізовані в стаціонар НІФП в 2007 — 2009 роках, крім типових МБТ виділялись мікст-культури мікобактерії туберкульозного комплексу і НТМБ. Рівень виділення останніх склав 2,8 %. В структурі штамів НТМБ більшість склали мікобактерії МАС — 41,7 %, на другому місці були *M. xenopi* — 33,3 %, мінімальною була питома вага виділення *M. kansasii* — 25,0 %, нетуберкульозних мікобактерій, що швидко ростуть, виділено не було.

2. В структурі МС НТМБ та мікстових культур мікобактерій переважали мультирезистентні штами, їх питома вага складала 62,5 % та 70,8 % відповідно. Цей факт безсумнівно обтяжує стан хворих і потребує призначення лікування з урахуванням найгірших результатів МС.

ЛІТЕРАТУРА

1. Макарова, М. В. Нетуберкульозные микобактерии: классификация, эпидемиология, патология у людей и животных, лабораторная диагностика [Текст] / М. В. Макарова // Проблемы туберкулеза и болезней легких. — 2007. — № 10. — С. 7–17.
2. Макарова, М. В. Изучение чувствительности нетуберкульозных микобактерий, выделенных на плотных и жидких питательных средах, к противотуберкулезным препаратам [Текст] / М. В.

Макарова, Г. Е. Фрейман // Туберкулез и болезни легких. — 2009. — № 8. — С. 49–51.

3. Частота обнаружения разных видов нетуберкульозных микобактерий в Москве [Текст] / М. В. Макарова [и др.] // Туберкулез и болезни легких. — 2009. — № 9. — С. 29–32.
4. Заболевания легких, вызванные нетуберкульозными микобактериями: клиника и диагностика [Текст] / Л. Д. Гунтупова [и др.] // Туберкулез и болезни лёгких: IX съезд фтизиатров России. — Москва, 2011. — № 4. — С. 112–113.
5. Дорожкова, И. Р. Ускоренный скрининг туберкулеза и микобактериозов в централизованной микобактериологической лаборатории мегаполиса [Текст] / И. Р. Дорожкова, М. В. Макарова, Г. Е. Фрейман // Туберкулез и болезни лёгких: IX съезд фтизиатров России. — Москва, 2011. — № 4. — С. 131.
6. Черных, М. В. Нетуберкульозные микобактерии в бактериологической диагностике туберкулеза [Текст] / М. В. Черных, Н. Г. Павлов // Туберкулез и болезни лёгких: IX съезд фтизиатров России. — Москва, 2011. — № 5. — С. 225–226.
7. Значение нетуберкульозных микобактерий в инфекционной патологии в Гомельской области [Текст] / Т. Д. Борисенко [и др.] // Интегративный подход к проблемам туберкулеза и ВИЧ-инфекции: Сборник материалов II Международной научно-практической конференции 12–13 мая. — Гомель, 2011. — С. 35–38.

РОЛЬ НЕТУБЕРКУЛЁЗНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ В ЗАБОЛЕВАНИИ ЛЕГКИХ В СОВРЕМЕННЫХ УСЛОВИЯХ

А. А. Журило, А. И. Барбова, С. В. Миронченко, О. Р. Сметанина, О. В. Юнацкая

Резюме

Исследованы биологические и биохимические свойства, морфологические особенности и профиль медикаментозной чувствительности нетуберкульозных микобактерий. Установлено, что уровень циркуляции выделенных штамов нетуберкульозных микобактерий составил 2,8 %. В их структуре преобладали *M. avium* clx — 41,7 %, *M. xenopi* составляли 33,3 %, *M. kansasii* — 25,0 %. Быстро растущих нетуберкульозных микобактерий выделено не было. В структуре нетуберкульозных микобактерий и микстовых культур микобактерий преобладали мультирезистентные штаммы, их процент составлял 62,5 % и 70,8 % соответственно.

THE ROLE OF NON-TUBERCULOSIS MYCOBACTERIA IN PULMONARY DISEASES AT PRESENT

O. A. Zhurylo, A. I. Barbova, S. V. Myronchenko, O. R. Smetanina, O. V. Yunatska

Summary

The biological and biochemical properties, morphology and drug susceptibility profile of non-tuberculosis mycobacteria were studied. It was established that the level of circulating strains of isolated non-tuberculosis mycobacteria reached 2,8 %. Most frequently isolated were the following species: *M. avium* clx — 41,7 %, *M. xenopi* — 33,3 %, *M. kansasii* — 25,0 %. Fast-growing non-tuberculosis mycobacteria had not been allocated. Fast-growing strains were not isolated. The multidrug resistant strains dominated both in non-tuberculosis mycobacteria cultures and mixed cultures — 62,5 % and 70,8 % respectively.