

УДК 616 – 093:577.1:616 – 002.5

**ВИКОРИСТАННЯ І МОДИФІКУВАННЯ БІОХІМІЧНИХ ТЕСТІВ
ДЛЯ ПІДТВЕРДЖЕННЯ ПРИНАЛЕЖНОСТІ ВИДІЛЕНИХ КУЛЬТУР
ДО МІКОБАКТЕРІЙ ТУБЕРКУЛЬОЗУ**

Н. Кондратюк*, Р. Сибірна**

**Волинське обласне дитяче територіальне медичне об'єднання
Централізоване відділення клінічної мікробіології
пр. Відродження, 30, Луцьк 43000, Україна*

***Львівський державний університет внутрішніх справ
вул. Городоцька, 26, Львів 79000, Україна
e-mail: sybandriy@dr.com*

Застосування біохімічних тестів для доведення приналежності виділеної культури до мікобактерій туберкульозу має діагностичне значення в клініці туберкульозу і дає можливість виявляти вірулентність досліджуваної культури. Модифікований тест на редукцію нітратів за Бараускене як простий і доступний у виконанні рекомендовано для підтвердження приналежності виділених культур до мікобактерій туберкульозу в бактеріологічних лабораторіях фтизіатричного профілю.

Ключові слова: редукція нітратів, каталазна активність, пероксидазна активність *Mycobacterium tuberculosis*, позалегеневий туберкульоз.

Сьогодні не існує конкретного лабораторного методу, що дозволив би з достовірністю відрізнити мікобактерії туберкульозу від інших кислотостійких мікобактерій та ідентифікувати мікобактерії всередині комплексу *Mycobacterium tuberculosis complex* [1–3, 6]. Мікобактерії ідентифікують, спираючись на їх фенотипові особливості: швидкість росту, морфологію колоній, пігментоутворення та біохімічні властивості. Протягом багатьох років набір тестів для ідентифікації мікобактерій удосконалювався і стандартизувався, тому використання недорогих і добре відпрацьованих методик має велике значення у практичних умовах. Щоб диференціювати мікобактерії туберкульозного комплексу від атипичних мікобактерій, рекомендують проводити субкультивування кожної досліджуваної культури на середовищі з 500 мкг/мл саліцилового натрію (на цьому середовищі ростуть тільки атипичні мікобактерії). У лабораторній практиці треба диференціювати *Mycobacterium tuberculosis* і *Mycobacterium bovis*, що входять до основних представників мікобактерій туберкульозного комплексу. Для цього рекомендовано застосовувати ніациновий тест, тест на редукцію нітратів і тест на здатність рости на середовищі з 5 мкг/мл ТСН (Thiophene-2-carboxylic acid hidrazide), а також ряд допоміжних тестів, у тому числі таких, як встановлення наявності пероксидазної та каталазної активності [3–8]. В окисно-відновних процесах антиоксидантного захисту мікробної клітини активну участь беруть такі ферменти, як каталаза і пероксидаза. Встановлено, що мікобактерії туберкульозу, стійкі до препаратів ГНК (тубазиду, фтівазиду та інших), втрачають здатність синтезувати ендогенну каталазу і розщеплювати перекис водню. Тому активність цих ферментів різко знижена, що проявляється в утворенні одиничних пухирців кисню, або у відсутності їх при визначенні каталазної активності. При визначенні пероксидазної активності колонії ледь забарвлюються, на відміну від нетуберкульозних мікобактерій, незалежно від стійко-

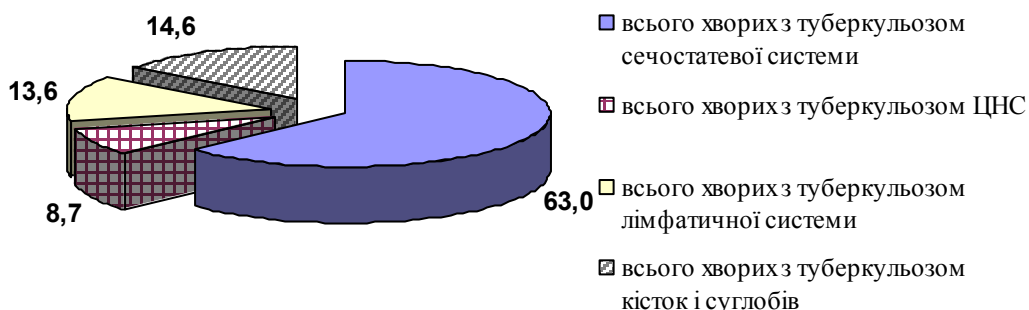
сті до ГІНК. У *Mycobacterium tipus humanus* і *M. bovis*, чутливих до ГІНК, виявляється активність обох ферментів паралельно. При цьому у чутливих культур іде активне виділення пухирців кисню, що зумовлене діяльністю каталази, а також забарвлення колоній у темно-коричневий колір, що обумовлене діяльністю пероксидази. Поява коричневого кольору пояснюється переходом пірогалолу в пурпурогалин у присутності перекису водню під впливом пероксидази [3, 6].

Оскільки ніациновий тест є досить складним при використанні його у практичній лабораторії, а також токсичним, а визначення редукції нітратів для ідентифікації мікобактерій, згідно з глобальною проблемою боротьби з туберкульозом та наказом МОЗ України № 45 від 06.02.2002 р. передбачає використання буферних систем, які потребують допоміжних реагентів і затрат часу, заслуговує уваги модифікований тест на редукцію нітратів за Бараускене, який полягає у використанні недорогих хімічних реагентів та дешевого обладнання. Цей метод придатний для ідентифікації мікобактерій туберкульозу всередині *Mycobacterium tuberculosis complex*. Отримані результати свідчать про високу чутливість запропонованого методу.

Проаналізовано клінічну структуру хворих на позалегеневий туберкульоз різної локалізації у Волинській області. На рисунку представлено розподіл хворих за різними формами позалегеневого туберкульозу, які були обстежені протягом 2001–2003 рр. Встановлено, що 63,0% хворих уражені туберкульозом сечостатевої системи, 14,6% – туберкульозом кісток і суглобів, відповідно 8,7% і 13,6% – туберкульозом центральної нервової системи та периферичних лімфатичних вузлів.

Було виділено 14 штамів збудника від хворих на позалегеневі форми туберкульозу, а також проведено їх ідентифікацію з використанням біохімічних тестів. Дослідження редукції нітратів проводили із застосуванням стандартного і модифікованого методів. Як контроль приймали пробірку з нітратом натрію без культури мікобактерій. Позитивний результат зареєстровано в усіх випадках – поява малинового забарвлення, у контрольній пробірці забарвлення було відсутнє.

Нами встановлено, що збудники позалегеневого туберкульозу мають ряд особливостей. Так, при туберкульозі центральної нервової системи модифікований тест на редукцію нітратів за Бараускене був слабовираженим, тоді як при туберкульозі периферичних лімфатичних вузлів, туберкульозі кісток і суглобів та туберкульозі сечостатевої системи штами мікобактерій туберкульозу посилено редукували нітрати і спостерігалася яскраво виражена реакція. Жодна з культур не дала росту на поживному середовищі з натрієм саліциловокислим. При цьому досліджені культури при позалегеневих формах



Розподіл хворих за клінічними формами позалегеневого туберкульозу.

туберкульозу мали слабовиражену каталазну і пероксидазну активність, хоча після дослідження їх чутливості було встановлено стійкість до препарату ізоніазиду. Це свідчить про те, що не завжди культури МБТ, стійкі до препаратів ГІНК, втрачають здатність синтезувати ендogenous каталазу і розщеплювати пероксид водню (див. таблицю).

Біохімічні особливості виділених мікобактерій туберкульозу при позалегеновій локалізації процесу

Локалізація процесу	Кількість штамів	Редукція нітратів				Пероксидаза	Каталаза	Термостабільність каталази	Ріст на середовищі зі саліциловокислим натрієм
		Класичний метод		Удосконалений метод					
		контроль	дослід	контроль	дослід				
Туберкульоз сечостатевої системи	7	–	+++	–	+++	+++	++	–	–
Туберкульоз кісток і суглобів	2	–	+++	–	+++	+++	++	–	–
Туберкульоз ЦНС	3	–	++	–	++	+	+	–	–
Туберкульоз периферичних лімфатичних вузлів	2	–	+++	–	+++	++	+	–	–
Всього	14								

Примітка. +++ реакція сильно виражена; ++ реакція помірно виражена; + реакція слабо виражена; – реакція відсутня.

Отже, застосування модифікованих біохімічних тестів для доведення приналежності виділеної культури до мікобактерій туберкульозу має також діагностичне значення в клініці туберкульозу і дає можливість виявляти вірулентність досліджуваної культури. Модифікований тест на редукцію нітратів за Бараускене як простий і доступний у виконанні рекомендовано для підтвердження приналежності виділених культур до мікобактерій туберкульозу в бактеріологічних лабораторіях фтизіатричного профілю.

1. Андросов М. В., Владимирский М. А., Алексеев Л. И. Иммунологический метод идентификации *Mycobacterium tuberculosis* и *Mycobacterium bovis* BCG на основе применения моноклональных антител // Пробл. туберкулеза. 1989. № 6. С. 12–16.
2. Грядунов Д. К., Лана С. А., Соколов А. Ю. и др. Разработка диагностических систем на основе биологических микрочипов для идентификации и определения лекарственной чувствительности возбудителя туберкулеза – *Mycobacterium tuberculosis* // Науч. труды к 75-летию ведущего противотуберкулезного учреждения г. Москвы. М., 2001. С. 233–236.
3. Дорожкова И. Р., Попов С. А., Мартынова Л. П. Руководство по культуральным методам выявления и идентификации микобактерий туберкулеза: Методические рекомендации. М., 2000. С. 2–50.

4. *Иртуганова О. А., Смирнова Н. С.* Культуральное определение микобактерий туберкулеза // Лаб. диагностика туберкулеза. М., 2001. С. 25–35.
5. Лабораторная служба в программах борьбы с туберкулезом. Часть 3. Культуральное исследование. ВОЗ Для глобальной программы по туберкулезу. Оригинал англ. Перевод. Женева: Швейцария, 1998. 95 с.
6. Наказ МОЗ України № 45 від 06.02.2002 р. Про затвердження інструкції з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції. К., 2002.
7. *Яценко Т. Н., Мечева И. С.* Руководство по лабораторным исследованиям при туберкулезе. М.: Медицина, 1973. 106 с.
8. PAHO/WHO Advisory Committee on Tuberculosis Bacteriology Manual of Technical Standards and Procedures for Tuberculosis Bacteriology. Part 2: The culture of Mycobacterium tuberculosis. Pan American Health Organization, Montevideo, Argentina. 1998. 85 p.

USAGE AND MODIFICATION OF BIOCHEMICAL TESTS CONFIRMING THE BELONGING OF ISOLATED CULTURES TO TUBERCULOSIS MYCOBACTERIA

N. Kondratyuk*, R. Sybirna**

**Volyn Regional Children's Territorial Medical Association
Centralized Department of Clinical Microbiology
30, Vidrodzhennya Ave., Lutsk 43000, Ukraine*

***Lviv State University of Domestic Affairs
26, Horodotska St., Lviv 79000, Ukraine
e-mail: sybandriy@dr.com*

Usage of biochemical tests to prove the belonging of isolated cultures to tuberculosis mycobacteria has diagnostic meaning in the tuberculosis clinic and gives the opportunity to identify the virulence in the examined culture. Modification test on the nitrates reduction by Brauskene, considered as simple and available in usage, is recommended to confirm the belonging of isolated cultures to tuberculosis mycobacteria in the bacteriological laboratories profiled in phthisiology.

Key words: nitrates reduction, catalase activity, peroxidase activity of *Mycobacterium tuberculosis*, extrapulmonary tuberculosis.

Стаття надійшла до редколегії 12.05.08

Прийнята до друку 23.05.08