



УДК 616.24-002.5:576.8.093

БИОЛОГИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАМОВ МИКОБАКТЕРИЙ

Г. В. Яворська, Р. І. Сибірна*

*Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Грушевського, 4, Львів 79005, Україна
e-mail: microbio@franko.lviv.ua*

**Львівський державний університет внутрішніх справ
вул. Городоцька, 26, Львів 79000, Україна*

Мікобактерії належать до надзвичайно варіабельних мікроорганізмів. Такі властивості викликають значне занепокоєння серед фтизіатрів, оскільки зростає кількість пацієнтів, у яких клінічна картина захворювань, спричинених мікобактеріями, часто є незрозумілою. У зв'язку з цим актуальною залишається проблема дослідження біологічних властивостей мікобактерій „туберкульозної” й атипової груп. Проаналізовано біологічні властивості клінічних штамів мікобактерій, виділених від хворих на різні форми туберкульозу (легеневого та позалегеневого) і з різних закладів (диспансерних і пенітенціарних). Відзначено певні особливості досліджуваних ознак серед виділених культур мікобактерій.

Ключові слова: мікобактерії, легеневий і позалегеневий туберкульоз, мікобактеріози.

Туберкульоз – хвороба минулого, теперішнього і, очевидно, майбутнього. Вже кілька сотень років людство намагається побороти це інфекційне захворювання, але, наразі, марно [2–4, 12].

Збудник туберкульозу – *Mycobacterium tuberculosis* – один із найбільш досліджених (у плані фізіолого-біохімічних, морфолого-культуральних і молекулярно-генетичних особливостей) [10–14], і поряд з тим надзвичайно непередбачуваний у своїх проявах мікроорганізм.

Не менш небезпечними є „родичі” мікобактерій туберкульозу, які здатні спричинити захворювання – мікобактеріози. Про ці захворювання, як і про їхніх збудників, відомостей у сучасній літературі мало [4–5, 7, 9].

Востанні роки, в епоху генетично-молекулярних досліджень, вивченню мікробіологічних особливостей мікобактерій приділяють дедалі менше уваги. Але виходячи з матеріально-технічної бази більшості лабораторій наших фтизіопульмонологічних диспансерів, без таких досліджень неможливо достовірно діагностувати хворобу і призначити адекватне лікування. Тому актуальність досліджень біологічних властивостей мікобактерій є поза сумнівом.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Досліджували морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні особливості клінічних штамів мікобактерій, виділених від хворих на різні форми туберкульозу (легеневої та позалегеневої локалізації) з диспансерних і пенітенціарних закладів. Морфологічні особливості відзначали при мікроскопуванні мазків, зафарбованих загальноприйнятими методиками за Цілем-Нільсеном і Грамом. Для культивування штамів використовували середовище Левенштейна-Йнсена. Перед посівом на поживне середовище досліджуваній патологічний матеріал попередньо обробляли згідно з рекомендаціями, описаними у Наказі МОЗ України, і досліджували фізіолого-біохімічні особливості виділених штамів [8]. Чутливість ідентифікованих штамів до антимікобактеріальних препаратів визначали методом абсолютних концентрацій на твердих поживних середовищах. Культуру вважали чутливою, якщо на середовищі, яке містить препарат, виросло менше 20 колоній при рясному рості у контролі.

Отримані цифрові значення досліджень піддавали статистичній обробці [6].

РЕЗУЛЬТАТИ І ЇХНЕ ОБГОВОРЕННЯ

Досліджено морфолого-культуральні та фізіолого-біохімічні особливості 314 клінічних штамів мікобактерій, виділених від 237 (75,5±2,4%) хворих на туберкульоз легенів, 56 (17,8±2,2%) хворих на позалегеневої форми туберкульозу та 21 (6,7±1,4%) – на мікобактеріозі протягом 2007–2008 рр. Із них 75 (23,9±2,4%) штамів було виділено від хворих, що перебували у місцях позбавлення волі. Розподіл хворих, від яких виділяли культури мікобактерій, за місцем перебування і локалізації патологічного процесу представлений на рис. 1. Найбільшу частку становили пацієнти, хворі на туберкульоз легенів, найменшу – хворі на мікобактеріозі.

Клінічна структура хворих на туберкульоз легенів з бактеріовиділенням представлена на рис. 2. Відмічено, що пацієнти, які перебували у місцях позбавлення волі, частіше хворіли на вогнищевий туберкульоз легенів (54,9±6,2%). У клінічній структурі хворих із диспансерів переважала дисемінована форма туберкульозу легенів (50,9±3,8%).

Клінічні форми позалегеневого туберкульозу представлені на рис. 3. Констатовано, що у пенітенціарних закладах приблизно з однаковою частотою спостерігаються туберкульозні ураження різних органів. Поряд із тим, у диспансерах зареєстровано найвищу кількість пацієнтів із туберкульозом очеревини (75,0±6,2%).

Розподіл хворих, від яких було виділено досліджувані штами, за часом виявлення представлено на рис. 4. Як видно, серед пацієнтів, що перебували у диспансерах, крім хворих на мікобактеріозі, мікобактерії частіше висівали від осіб із вперше виявленими формами процесу (57,8±3,7% та 83,3±5,4% відповідно), тоді як у пенітенціарних закладах – частіше від хворих на хронічні форми патологічного процесу (34,4±5,9% та 50,0±17,7% відповідно).

Щодо статевої структури, то, зі значним переважанням, клінічні штами мікобактерій туберкульозу були виділені від хворих осіб чоловічої статі, незалежно від місця локалізації процесу (рис. 5).

Серед виділених штамів мікобактерій проаналізовано морфолого-культуральні особливості (табл. 1). Відомо [4, 11, 14, 16], що мікобактерії належать до поліморфних мікроорганізмів. Форма, розміри й угруповання клітин змінюються залежно від методу фарбування, середовища, на якому ростуть штами, стадії процесу, застосованої хіміотерапії. Відповідні особливості було відзначено і серед

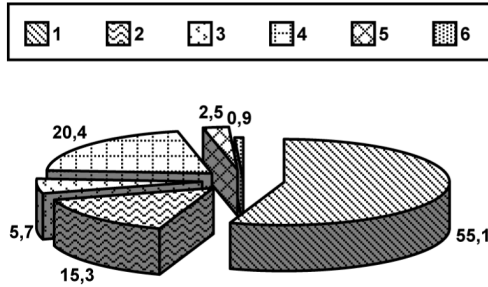


Рис. 1. Розподіл хворих за місцем перебування та локалізацією патологічного процесу.
 Хворі з диспансерів: 1 – туберкульоз легенів; 2 – туберкульоз позалегеновий; 3 – мікобактеріози.
 Хворі з пенітенціарних закладів: 4 – туберкульоз легенів; 5 – туберкульоз позалегеновий; 6 – мікобактеріози

Fig. 1. Distribution of patients on sojourn and location of pathological process.
 1, 2, 3 – from dispensary: tuberculosis of 1 – lung; 2 – being lung; 3 – mycobacteriosis;
 4, 5, 6 – from penitentiary institution: tuberculosis of 4 – lung; 5 – being lung; 6 – mycobacteriosis

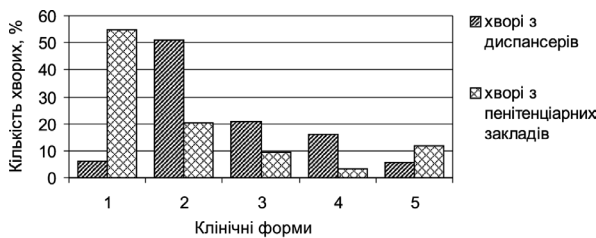


Рис. 2. Клінічні форми туберкульозу легенів:
 1 – вогнищевий; 2 – дисемінований; 3 – інфільтративний; 4 – фіброзно-кавернозний; 5 – інші форми

Fig. 2. Clinical forms of lung tuberculosis:
 1 – fiery; 2 – disseminated; 3 – infiltrative; 4 – fibrosis-cavernose; 5 – other forms

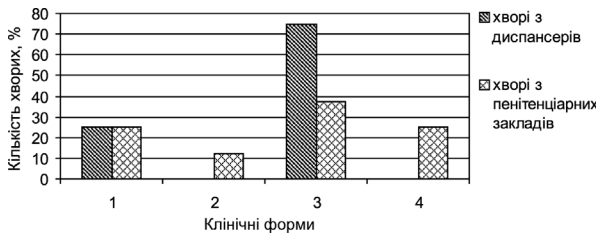


Рис. 3. Клінічні форми туберкульозу позалегенової локалізації:
 1 – сечовидільної системи; 2 – статевий системи; 3 – очеревини; 4 – шкіри

Fig. 3. Clinical forms of behindlocation tuberculosis:
 1 – urine-removae system; 2 – sexual system; 3 – stomach; 4 – skin

проаналізованих культур мікобактерій. Так, у мазках, забарвлених за Цілем-Нільсеном, *M. tuberculosis*, що були виділені від уперше виявлених хворих, мали вигляд поліморфних тонких паличок, часто зігнутих, які лежали під кутом одна до одної. Часто можна було бачити невеликі скупчення, у вигляді так званих „кіс” (часточки від мікроколоній). Мікобактерії туберкульозу, виділені від хворих на хронічний туберкульоз, були трохи потовщені, мали гетерогенну структуру, а в мазку – часто кокоподібну форму. Щодо атипових мікобактерій, то вони мали дещо інші форму і характер просторового розташування в мазку. Зокрема, *M. fortuitum* – короткі палички, розміщені поодинокі. *M. avium* – тонкі, слабогалузисті палички, розташовані хаотично. *M. kansasii* – довгі та порівняно широкі, часто розміщені стрічками. *M. scrofulaceum* – короткі округлі бактерії, що не формували угруповань.

Цікавими були культуральні ознаки серед виділених культур мікобактерій. Спостерігався різний ріст мікобактерій на твердих поживних середовищах. Зокрема, культури *M. tuberculosis* росли у вигляді негладких кремових колоній, що мали вигляд цвітної капусти чи бородавоч, незалежно від місця виділення.

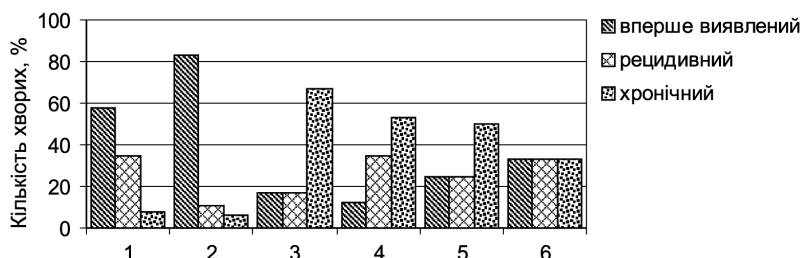


Рис. 4. Розподіл хворих за часом виявлення захворювання.
Хворі з диспансерів: 1 – туберкульоз легенів; 2 – позалегеновий туберкульоз; 3 – мікобактеріози.
Хворі з пенітенціарних закладів: 4 – туберкульоз легенів; 5 – позалегеновий; 6 – мікобактеріози

Fig. 4. Distribution of patients on revealing time.
1, 2, 3 – from dispensary: tuberculosis of 1 – lung; 2 – being lung; 3 – mycobacteriosis;
4, 5, 6 – from penitentiary institution: tuberculosis of 4 – lung; 5 – being lung; 6 – mycobacteriosis

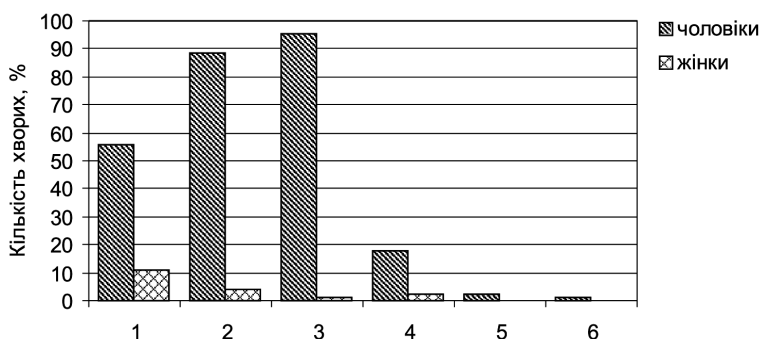


Рис. 5. Статева структура хворих.
Хворі з диспансерів: 1 – туберкульоз легенів; 2 – позалегеновий; 3 – мікобактеріози.
Хворі з пенітенціарних закладів: 4 – туберкульоз легенів; 5 – позалегеновий; 6 – мікобактеріози

Fig. 5. Sexual structure of patients
1, 2, 3 – from dispensary: tuberculosis of 1 – lung; 2 – being lung; 3 – mycobacteriosis;
4, 5, 6 – from penitentiary institution: tuberculosis of 4 – lung; 5 – being lung; 6 – mycobacteriosis

Штами *M. fortuitum* на твердому яєчному середовищі росли пишним газоном, у вигляді зморшкуватих R-колоній кремового або жовтого кольору. Часто поглинаючи барвник, набували зеленкуватого відтінку. Колонії мали припіднятий центр і нагадували цвітну капусту.

Культури *M. avium* давали ріст у вигляді кремових, напівпрозорих дрібних колоній, які мали S-форму і часто зливалися між собою.

Досліджувані штами *M. kansasii* при культивуванні на світлі давали ріст у вигляді колоній жовтогарячого кольору S- і R-форми. Спостерігався і „бородавчастий” ріст. Колонії такого типу погано вдавалося змивати водою і знімати зі середовища, а при прокалюванні петлею вони давали тріщину.

M. scrofulaceum на твердому яєчному середовищі росли поодинокими круглими колоніями, що мали жовтогарячий відтінок і S-форму.

До фізіолого-біохімічних ознак мікобактерій, які мають важливе значення для ідентифікації та впливають на клінічні прояви захворювання, належать швидкість росту, активність окисно-відновних ферментів, термостабільність каталази, здатність рости на середовищі з 500 мкг/мл саліцилового натрію і при різних температурах.

Таблиця 1. Морфолого-культуральні ознаки мікобактерій
Table 1. Morphological and cultivative characteristics of mycobacteria

Види мікобактерій	Кількість досліджених штамів	Ознаки				
		Морфологічні			Культуральні	
		При фарбуванні за Ціль-Нільсеном	Корд-фактор	Форма колоній	Колір колоній	Поверхня колоній
<i>M. tuberculosis</i>	249	Поліморфні довгі, середньої товщини	Наявний	У більшості R	Креманий	Нерівна
	44	Гетерогенні потовщені, кокоподібні	Наявний	У більшості R	Креманий	Нерівна, у 2 штамів – гладка
<i>M. fortuitum</i>	4	Товсті, короткі	Відсутній	R	Креманий зі зеленкуватим відтінком	Нерівна
	1	Товсті, короткі	Відсутній	S	Креманий	Гладка
<i>M. avium</i>	4	Тонкі, короткі	Наявний	S	Креманий	Гладка
	2	Тонкі, короткі	Наявний	R	Креманий	Нерівна
<i>M. kansasii</i>	6	Довгі, товсті	Наявний	R	На світлі жовтогарячий	Нерівна
	2	Довгі, товсті	Наявний	S	На світлі жовтогарячий	Гладка
<i>M. scrofulaceum</i>	2	Округлі короткі	Відсутній	S	Незалежно від освітлення жовтогарячий	Гладка

Важливо, що знання про наявність тих чи інших ферментних систем у мікобактерій дає змогу краще зрозуміти такі особливості мікобактерій, як вірулентність і стійкість до антимікобактеріальних препаратів.

Проводили дослідження каталазної та пероксидазної активності виділених штамів у різні терміни вирощування. Контролем служили музейні штами (колекція Львівського науково-дослідного інституту епідеміології та гігієни МОЗ України).

У результаті визначення каталазної активності встановлено, що найбільша кількість культур мала високу каталазну активність. Відзначено збільшення ступеня каталазної активності з часом культивування серед культур із низькою активністю.

При визначенні пероксидазної активності виділених штамів встановлено, що більша кількість культур мала низьку пероксидазну активність, у решти вона була відсутня. Однак ступінь пероксидазної активності дещо збільшувався з часом культивування. Це теж свідчить, що мікобактерії здатні швидко змінювати метаболічні процеси і пристосовуватися до умов оточуючого середовища.

Дослідження термостабільності каталази показали, що вона зменшується з підвищенням температури. Критичною температурою для каталази атипичних мікобактерій є +70°C, тоді як для *M. tuberculosis* – +68°C. Стосовно мікобактерій, чутливих і стійких до антимікобактеріальних препаратів, то у них термостабільність каталази була однаковою.

Фізіолого-біохімічні ознаки виділених мікобактерій представлено у табл. 2.

Серед біологічних ознак слід назвати і чутливість виділених штамів мікобактерій до антимікобактеріальних препаратів. Відомості про чутливість культур мікроорганізмів до антибактеріальних препаратів є надзвичайно актуальним питанням, особливо якщо це стосується клінічних штамів. Даному питанню приділяють багато уваги [1, 10–13, 15].

Досліджували чутливість, моно- та полірезистентність виділених 293 штамів мікобактерій туберкульозу до ізоніазиду, канаміцину, стрептоміцину, рифампіцину й етамбутолу, і 21 штаму атипичних мікобактерій до ізоніазиду, стрептоміцину, канаміцину, рифампіцину, етамбутолу, тетрацикліну, пеніциліну, еритроміцину, фторхінолонів (рис. 6).

Таблиця 2. Фізіолого-біохімічні ознаки мікобактерій

Table 2. Physiological and biochemical characteristics of mycobacteria

Ознака		Прояв ознаки	Види мікобактерій
Швидкість росту, діб	2–5	+	<i>M. fortuitum</i>
	5–10	+	<i>M. avium</i>
	14–20	+	<i>M. kansasii</i>
	15–21	+	<i>M. scrofulaceum</i>
	20–25	+	<i>M. tuberculosis</i>
Утворення пігменту	у темряві	+	<i>M. scrofulaceum</i>
		–	<i>M. fortuitum, M. avium, M. kansasii, M. tuberculosis</i>
	на світлі	+	<i>M. scrofulaceum, M. kansasii</i>
		–	<i>M. fortuitum, M. avium, M. tuberculosis</i>
Каталазна активність		+	<i>M. fortuitum, M. avium, M. kansasii, M. scrofulaceum, M. tuberculosis</i>
Пероксидазна активність		+	<i>M. tuberculosis</i>
		±	<i>M. fortuitum, M. avium, M. kansasii</i>
		–	<i>M. scrofulaceum</i>
Термостабільність каталази		+	<i>M. fortuitum, M. avium, M. kansasii, M. scrofulaceum</i>
		±	<i>M. tuberculosis</i>
Ріст на середовищі з 500 мкг/мл саліцилового натрію		+	<i>M. fortuitum, M. avium, M. kansasii, M. scrofulaceum</i>
		–	<i>M. tuberculosis</i>
Ріст при температурі	25°C	+	<i>M. kansasii, M. scrofulaceum</i>
		–	<i>M. fortuitum, M. avium, M. tuberculosis</i>
	37°C	+	<i>M. fortuitum, M. avium, M. kansasii, M. scrofulaceum, M. tuberculosis</i>
	45°C	+	<i>M. fortuitum, M. avium</i>
		–	<i>M. kansasii, M. scrofulaceum, M. tuberculosis</i>

Примітка. + – наявність ознаки; – – відсутність ознаки; ± – варіабельність ознаки.

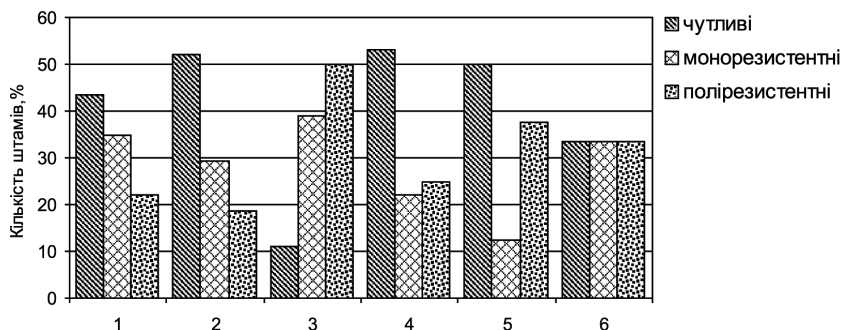


Рис. 6. Чутливість штамів мікобактерій до антимікобактеріальних препаратів, виділених від хворих. Хворих з диспансерії: 1 – туберкульоз легенів; 2 – позалегеновий; 3 – мікобактеріози. Хворих з пенітенціарних закладів: 4 – туберкульоз легенів; 5 – позалегеновий; 6 – мікобактеріози

Fig.6. Resistance of mycobacteria strains to antibiotic, isolated from patients. 1, 2, 3 – from dispensary: tuberculosis of 1 – lung; 2 – being lung; 3 – mycobacteriosis. 4, 5, 6 – from penitentiary institution: tuberculosis of 4 – lung; 5 – being lung; 6 – mycobacteriosis

Як видно з рис. 6, кількість чутливих штамів була переважаючою серед виділених мікобактерій туберкульозу незалежно від локалізації туберкульозного процесу і місця перебування хворих. Однак серед культур атипичних мікобактерій, виділених від хворих на мікобактеріози, превалювали стійкі штами – як моно-, так і полірезистентні. Серед резистентних культур, виділених від хворих, що перебували у місцях позбавлення волі, відзначено велику кількість полірезистентних форм. Така тенденція має негативні прогностичні наслідки, особливо в умовах епідемії.

Висновок. Дослідження біологічних особливостей клінічних штамів мікобактерій забезпечує чітку диференціацію культур, дає змогу правильно та своєчасно поставити діагноз захворювання і адекватно підібрати схему антимікобактеріального лікування для хворих за мінімальних матеріально-технічних затрат.

BIOLOGY OF CLINICAL MYCOBACTERIA STRAINS

H. V. Yavorska, R. I. Sybirna*

Ivan Franko National University of Lviv, 4, Hrushevskiyi St., Lviv 79005, Ukraine
e-mail: microbio@franko.lviv.ua

*Inner Affair Lviv State University, 26, Gorodotska St., Lviv 79000, Ukraine

Mycobacteria are very varied microorganisms. This peculiarity make great trouble among ftysiatres, because quantity of patients increases and clinical essence of diseases, which caused by mycobacteria, often are not understand. In connect with this, actual is the problem of biological peculiarities investigation of mycobacteria „tuberculosis” and atypic groups. Biological peculiarities of clinical mycobacteria strains, isolated from patients with different tuberculosis forms (lung and out lung) and from different institutions (dispenser and penitenciar), were analyzed. Some especialities of investigated signs among isolated mycobacteria cultures were noted.

Key words: mycobacteria, lung and out lung tuberculosis, mycobacterioses.

БИОЛОГИЯ КЛИНИЧЕСКИХ ШТАММОВ МИКОБАКТЕРИЙ

Г. В. Яворская, Р. И. Сибирная*

*Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Грушевского, 4, Львов 79005, Украина
e-mail: microbio@franko.lviv.ua*

**Львовский государственный университет внутренних дел
ул. Городецкая, 26, Львов 79000, Украина*

Микобактерии принадлежат к чрезвычайно вариабельным микроорганизмам. Эти особенности в значительной мере беспокоят фтизиатров, так как увеличивается количество пациентов с непонятной клинической картиной болезней, вызванных микобактериями. В связи с этим актуальным остается вопрос исследования биологических особенностей микобактерий „туберкулезной” и атипичной групп. Проанализированы биологические особенности клинических штаммов микобактерий, выделенных от больных легочными и внелегочными формами туберкулеза из различных заведений (диспансерных и пенитенциарных). Отмечены некоторые особенности исследованных признаков среди выделенных культур микобактерий.

Ключевые слова: микобактерии, легочный и внелегочный туберкулез, микобактериозы.

1. Билько И. П. Микроскопические методы определения чувствительности микобактерий туберкулеза. **Пробл. туберкулеза**, 1990; 9: 60–62.
2. Бобильова О. О., Бережков С. П., Ситенко М. А., Падченко А. С. Про епідемічну та санітарно-гігієнічну ситуацію в Україні в останні роки. **Сучасні інфекції**, 2000; 1: 4–12.
3. Борисов С. Е. Диагностика туберкулеза: возможности и пределы. **Пробл. туберкулеза**, 2001; 3: 5–9.
4. Вейсфеллер Ю. К. **Биология и изменчивость микобактерий туберкулеза и атипичные микобактерии**. Будапешт: Изд-во Акад. наук Венгрии, 1975. 334 с.
5. Войтова Д. Н., Оттин Т. Ф. Микобактериозы. **Пробл. туберкулеза**, 1995; 5: 11–14.
6. Деркач М. П., Гумецкий Р. Я., Чабан М. Є. **Курс варіаційної статистики**. Львів: Вид-во Львів. ун-ту, 1997. 207 с.
7. Зыков М. П., Ильина Т. Б. **Потенциально патогенные микобактерии и лабораторная диагностика микобактериозов**. Москва: Медицина, 1978. 160 с.
8. **Наказ № 45 МОЗ України** „Бактеріологічна діагностика туберкульозної інфекції” від 6 лютого 2002 року. 102 с.
9. Новожилова И. А. Микобактериозы: прошлое, настоящее и будущее. **Укр. пульмонолог. журнал**, 2004; 2: 3–7.
10. Салина Т. Ю., Морозова Т. И., Федотов Э. А. и др. Сравнительное изучение эффективности разных методов диагностики туберкулеза. **Пробл. туберкулеза**, 2000; 2: 43–44.
11. Тунгусова О. С., Марьяндышев А. О. Молекулярные механизмы формирования лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза. **Пробл. туберкулеза**, 2001; 3: 48–49.
12. Феценко Ю. І., Мельник В. М., Кобилянська А. В. **Хіміорезистентний туберкульоз**. Київ: Здоров'я, 2003. 135 с.
13. Фомичева Н. И. Первичная лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза и ее влияние на эффективность лечения. **Укр. пульмонолог. журнал**, 2001; 3: 42–43.
14. Яворська Г. Морфолого-культуральні особливості мультирезистентних штамів *Mycobacterium tuberculosis*. **Вісн. Львів. ун-ту. Сер. біол.**, 2004; 38: 165–170.
15. Яворська Г. В., Пугачевська Л. П. Стіійкість *Mycobacterium tuberculosis* до антимікобактеріальних препаратів. **Мікробіол. журнал**, 2006; 68 (5): 45–52.
16. Якимова Т. П., Якимова Д. Ю., Шевченко О. В. Морфологічна діагностика туберкульозу. **Лабораторна діагностика**, 2002; 2: 65–69.

Одержано: 21.11.2008