

У ИЗМЕНЕННЫХ ФОРМ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА ТРАНСФОРМИРУЕТСЯ КЛЕТОЧНАЯ СТЕНКА ПОДВОЗДЕЙСТВИЕМ АНТИБИОТИКОВ

М.В. Кучвальский

Белорусский государственный университет, г. Минск;

kuchvalskimv@gmail.com;

науч. рук. – А. П. Лысенко, д-р вет. наук, проф.

Микобактерии туберкулеза при стрессовых воздействиях образуют формы с дефектной клеточной стенкой. Эти формы непатогенны, но более адаптированы к неблагоприятным условиям, например, к действию противомикробных агентов. Впервые установлен профиль антибиотикорезистентности в различных изолятах микобактерий с дефектной клеточной стенкой. Показано, что антибиотики влияют на морфологию этих изолятов.

Ключевые слова: измененные формы микобактерий; латентный туберкулез; дефектная клеточная стенка; антибиотикорезистентность; дезинфекция; плеоморфность.

ВВЕДЕНИЕ

Согласно отчету ВОЗ за 2018 год, Беларусь занимает первое место в мире по проценту новых больных туберкулезом с множественной–лекарственной устойчивостью среди всех новых пациентов[1]. В 100% случаев изоляты микобактерий, полученные от заболевших, устойчивы к рифампицину – антибиотику первой линии.

Считается, что такая адаптивность микобактерий туберкулеза (МБТ), в значительной степени, связана с их свойством трансформироваться. Они не погибают при фагоцитозе, при действии лизоцима трансформируются в формы с так называемой дефектной клеточной стенкой (CWD – cellwalldeficient)[2].

CWD–формы характеризуются устойчивостью к ряду противомикробных агентов, а также персистенцией внутри организмов. Популяционная морфологическая изменчивость и изменение клеточной стенки может рассматриваться как естественное явление, обеспечивающее адаптивную стратегию этого патогена в меняющейся окружающей среде [3].

Значительный интерес представляет структура популяций различных микобактериальных штаммов и такие ее важные характеристики, как вирулентность, морфология и лекарственная устойчивость, особенно в случае изменчивости заболевания и развитии лекарственно–устойчивого туберкулеза.

Цель работы –установить профиль антибиотикорезистентности CWD–штаммов микобактерий туберкулеза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе использовали CWD–изоляты *Mycobacterium bovis*, полученные из культур клеток больного острой Т–клеточной лейкемией («Jurkat») и лекарственно–устойчивым туберкулезом («Сеп»), из положительной контрольной сыворотки коровы, больной лейкозным вирусом («ПКС BLV») или после обработки соответствующими растворами дезинфектантов или антисептиков («Параформ», «Глутаровый альдегид», «CWDэтанол–хлоргексидин»). Контролем служил CWD–изолят *M. tuberculosis*H37Rv.

Изоляты высевали на чашки со средой МПА, сразу после посева выкладывали на поверхность среды диски индикаторные ДИ–ПЛС–50–01 (ООО «НИЦФ», Россия), пропитанные антибиотиками (см. таблицу). Через сутки измеряли диаметры зон задержки роста, а с краев этих зон отбирали бакмассу для мазков. За устойчивость к антибиотику принимали диаметр зоны задержки не более 20 мм.

Мазки окрашивали по Киньону. Кислотоустойчивые МБТ окрасились в красный цвет, а некислотоустойчивые CWD–формы – в синий цвет.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Наибольшие зоны задержки роста (25–40 мм) обнаружили вокруг дисков со фторхинолонами (левофлоксацин, ципрофлоксацин) (см. таблицу). Все изоляты устойчивы к аминогликозидам (выраженно к неомицину и стрептомицину, умеренно к канамицину), цефалоспорином (кроме «Параформ») и бензилпенициллину. Профиль устойчивости к антибиотикам почти не изменяется от изолята к изоляту.

У всех изолятов микобактерий наблюдали плеоморфную изменчивость популяции (см. рисунок). У полностью устойчивых к антибиотикам изолятов обнаружили коккоиды (номера 2, 4 и 6 в рисунке). Более того, если исходные изоляты были представлены только CWD–формами, то применение антибиотиков привело к сосуществованию как классических форм (кислотоустойчивые), так и форм с дефектной клеточной стенкой (некислотоустойчивые).

Диаметры зон задержки роста CWD–изолятов

Антибиотики и их дозировка	Изоляты						
	Па- ра- форм	Глутаровый альдегид	CWD ЭТХГ	Jurkat 402	ПКС BLV	Сеп- НО	H37Rv
Амоксициллин / клавулановая кис- лота 20/10 мкг	31	22	20	18	14	0	25
Бензилпенициллин 10 ед	31	0	14	8	0	0	0
Неомицин 30 мкг	15	15	16	16	15	20	24
Стрептомицин 30 мкг	10	17	14	11	12	18	22
Канамицин 30 мкг	18	21	20	22	17	22	21
Азитромицин 15 мкг	26	19	23	22	24	27	22
Левифлоксацин 5 мкг	26	26	31	28	31	28	37
Ципрофлоксацин 5 мкг	23	36	37	40	32	33	35
Цефалотин 30 мкг	34	0	19	0	16	0	12
Цефаклор 30 мкг	22	12	20	20	0	13	0
Тетрациклин 30 мкг	24	21	19	21	22	23	23

Реверсия CWD–форм в типичные кислотоустойчивые бактерии является важным свойством, которое индуцируется изменением условий культивирования *in vitro* или происходит самопроизвольно *in vivo* при благоприятных для патогенов условиях. Появление коккоидных форм, возможно, является одной из стадий развития CWD–форм. Считается, что за невидимой фазой CWD–конверсии (происходящей на среде MucCeIDW) следует состояние активного размножения некислотоустойчи-

вых CWD–форм, зачастую с кокковидной морфологией. различную восприимчивость к противомикробным препаратам.

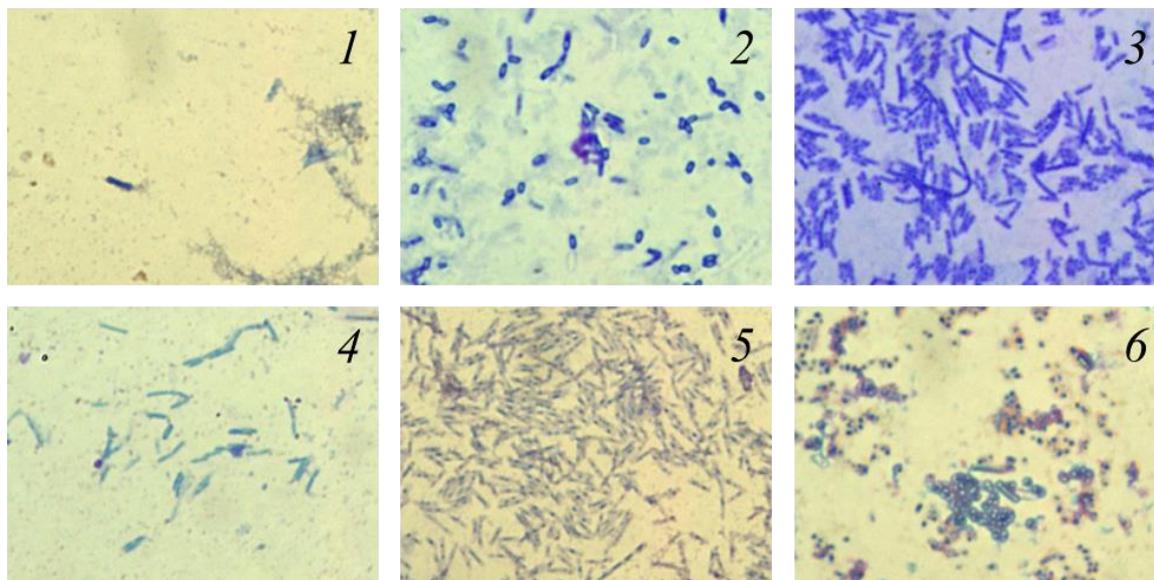


Рис. Рост изолятов на краю зоны задержки цефалотином: 1 – Параформ, 2 – Глутаровый альдегид, 3 – CWD ЭТХГ, 4 – Jurkat 402, 5 – ПКС BLV, 6 – СепНО

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Процессы трансформации CWD–форм, наблюдаемые в изолятах после обработки дезинфектантами, вызваны действием антибиотиков. Проявление плеоморфности является адаптивной стратегией CWD–форм микобактерий, которая позволяет им выживать в неблагоприятных условиях.

Библиографические ссылки

1. Global Tuberculosis Report 2019 // WHO [Electronic resource]. – 2019. – Mode of access: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/329368/9789241565714-eng.pdf>. – Date of access: 07.02.2020.
2. Willett H.P., Thacore H. The induction by lysozyme of an L–type growth in *Mycobacterium tuberculosis* // Canadian Journal of Microbiology. 1966. Vol. 12, № 1. P. 11–16.
3. Morphological variability and cell–wall deficiency in *Mycobacterium tuberculosis* «heteroresistant» strains / L. Michailova [et al.] // The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. 2005. Vol. 9, № 8. P. 907–914.
4. Evolution of extensively drug–resistant *Mycobacterium tuberculosis* from a susceptible ancestor in a single patient / V. Eldholm [et al.] // Genome Biology. 2014. Vol. 15, № 11. P. 490.