

Адамбекова А.Д.

НЕТУБЕРКУЛЕЗНЫЕ МИКОБАКТЕРИИ И ИХ КЛАССИФИКАЦИЯ

A.D. Adambekova

NON-TUBERCULOSIS MYCOBACTERIA AND THEIR CLASSIFICATION

УДК: 619.579:2

Род *Mycobacterium* включает огромное количество видов, которое "продолжает расти", к 2003 году охарактеризованы 95 видов [Katoch V., 2003] (сейчас - более 100). Два из них - *M. tuberculosis* и *M. leprosy* вызывают хорошо известные заболевания. Остальные микобактерии не входящие в так называемый комплекс микобактерий туберкулеза (*M.tuberculosis complex*), широко распространены в окружающей среде, как сапрофиты, но в некоторых случаях могут быть этиологическими факторами тяжелой (вплоть до смертельной) патологии [Pinner M., 1935; Duvall C., 1984; Euzeby J., 2003]. Их называют микобактериями окружающей среды (*enviromental micobacteria*), возбудителями микобактериозов, анонимными, оппортунистическими, атипичными микобактериями (последний, широко применявшийся многие годы термин, ввел М. Pinner, 1935). Однако, в настоящее время принят термин нетуберкулезные микобактерии (НТМ) [Wallace R. et al., 1990; Katoch V., Mohan Kumar T., 2001], который был признан наиболее приемлемым Американским торокальным обществом [Wallace R. et.al., 1997]. Наиболее характерным их отличием от *M.tuberculosis* комплекса является то, что они практически не передаются от человека к человеку [Wolinski E., 1979; Falkinham J., 1996].

Эти микобактерии, как уже было отмечено, широко (относительно) распространены в окружающей среде (в почве и воде) [Wolinsky E., Runearson T., 1968; Collins C. et al., 1984]. Их обнаруживают повсеместно: в естественных водоемах, водопроводной воде и т.д., вплоть до хирургических растворов [McSwiggan D., Collins C., 1974; Steadman J., 1980; Laussuq S. et al., 1988; Wenger J. et al., 1990; Maloney S. et al., 1994; von Reyn C. et al., 1994; Katoch V., 2004].

"Классифицировать" микобактерии начали еще в 1896 году, когда К. Lehmann и R. Neumann (цит. по Т.Ф.Оттен и А.В.Васильеву, 2005) предложили выделить род *Mycobacterium*. Этот род принадлежит к семейству *Actinomycetales*, по антигенной структуре ему близки роды - *Corynebacteria* и *Nocardia* [Kwapinski J., Snyder M., 1961; Cummins C., 1965; Kwapinsky J., 1966]. Род микобактерий, согласно данным определителя бактерий Берджи (1997)¹, насчитывает более 50 видов, подвидов и комплексов микобактерий (на самом деле в настоящее время их описано значительно больше - более 100).

В 1954 году А.Timple и Е.Runyon предложили классификацию НТМ (ее обычно называют

классификацией Runyon), которая (с изменениями и дополнениями) наиболее широко используется и в настоящее время. Согласно этой классификации, НТМ по скорости роста, морфологии колоний и способности к пигментообразованию делят на 4 основные группы. Группы 1, 2, 3 - это медленнорастущие микобактерии, требующие для роста колоний примерно столько же времени, сколько необходимо для получения культуры *M.tuberculosis*. Далее их дифференцируют по способности продуцировать желтый пигмент: 1) фотохромогены (образующие пигмент на свету), 2) скотохромогены (не требующие для образования пигмента света), 3) нефотохромогены (не образующие пигмент). Микроорганизмы 4-й группы - быстро-растущие (на обычных питательных средах - примерно в течение 7 дней). Эта классификация используется микробиологами и в настоящее время, хотя, конечно, в результате разработки более быстрых технологий культивирования, молекулярно-генетических методов, высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) она постепенно утрачивает свое значение. Кроме того, эта классификация не учитывает степень патогенности НТМ и клинические проявления патологии, ими вызываемой. В связи с этим, позднее были предложены варианты "группировки" НТМ, основанные на указанных признаках [Grange J., Yates M., 1986; Horsburgh C., 1996; Wallace R. et.al., 1997; Brit. Thor. Soc., 2000; Dunne A. et al., 2003; Haverkort F., 2003].

Можно сказать, что разделение на быстро- и медленно-растущие НТМ имеет практический смысл и сегодня. Однако, основным в классификации должно быть "филогенетическое родство" и степень патогенности.

Н.Tomioka (1998) классифицировал микобактерии на основании анализа их биологических, биохимических (включая анализ липидов), генетических (в том числе последовательности 16S рибосомальной ДНК) свойств:

I - *M. tuberculosis* комплекс (*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*).

II - медленно-растущие, включая фотохромогенные - (I группа Runyon) - *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. simiae*, *M. intermedium*, *M. asiaticum*; скотохромогенные (II группа Runyon) - *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. injectum*, *M. lentiflavum*, *M. gordonae* и нефотохромогенные (III группа Runyon) - *M. avium*, *M. intracellulerae*, *M. xenopi*, *M. malmoense*, *M. genavense*, *M. celatum*, *M. gastri*.

III - быстрорастущие - (IV группа Runyon) - *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. phlei*, *M. smegmatis*.

V. Brown-Elliott и R. Wallace (2002) также "сгруппировали" по таксономическому и "клиническому" статусу, "истории", географическому распределению и "отношению" к терапии род патогенных нехромогенных и поздно пигментующих быстрорастущих микобактерий следующим образом: группа *M. fortuitum* (*M. fortuitum*, *M. peregrinum*, *M. septicum*, *M. mageritense*, *M. houstonense*, *M. bonicke*), группа *M. chelonae* (*M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. mucogenicum*, *M. immunogenum*), группа *M. smegmatis* (*M. smegmatis*, *M. wolinskyi*, *M. goodii*).

По Международной классификации болезней (10-й пересмотр) инфекции, этиологическими агентами которых являются нетуберкулезные микобактерии (НТМ), включены в рубрику А-31.

Т.Ф. Оттен (1999) обращает внимание на то, что НТМ вызывают у человека заболевания, сходные с туберкулезом, и для постановки диагноза необходимо пользоваться "Клинической классификацией туберкулеза" (приложение № 8 к приказу МЗ РФ от 22.11.95 г. № 324), заменив термин "туберкулез" на "микобактериоз", вместо "МБТ+" указывать вид НТМ, выделенных от больного, как-то: *M. avium*, *M. xenopi* и др. Конечно, это годится, как временный вариант, но поскольку НТМ все чаще вызывают патологию у человека, бесспорно, необходимо разработать соответствующую методическую документацию и подготовить специальный приказ Минсоцздрава РФ.

Достаточно сложной задачей, стоящей перед исследователями, является поиск геномной мишени, при молекулярно-генетическом анализе которой будет возможна идентификация вида НТМ. Выбор мишени осложняется большим сродством геномов различных представителей рода *Mycobacterium*. В настоящее время, для этой цели используются инсерционные последовательности (IS900, IS901, IS1245, IS1561, IS2404), структурные гены (*rpoB*, *gyrB*, *hsp65*, *secA1*, *recA*, *sodA*, ген *16S rRNA*, область ITS гена *16S rRNA*) микобактериальной ДНК [Guerrero C. et al., 1995; Kim B.-J. et al., 1999; Blackwood K. et al., 2000; Kasai H. et al., 2000; Patel J. et al., 2000; Richter E. et al., 2002; Ablordey A. et al., 2005; Mohamed A. et al., 2005].

На основе изучения микобактериального генома и исследований возможных генетических мишеней, приемлемых для видовой идентификации микобактерий, были разработаны различные методы молекулярно-генетического определения вида микобактерий:

- полимеразная цепная реакция (ПЦР);
- ПЦР в сочетании с гибридизационным анализом
- гибридизация *in situ*;
- ПЦР в сочетании с рестрикционным анализом (полиморфизм длин рестрикционных фрагментов);

- секвенирование.

- Чаще всего с этой целью используют ПЦР в сочетании с гибридизационным или рестрикционным (ПДРФ) анализом, а также секвенирование.

В связи с постоянным ростом числа видов рода *Mycobacterium*, как за счет более точной идентификации с помощью современных методов (секвенирование, ВЖЭХ), так и, действительно, обнаружения новых видов, проблема создания единого генеалогического древа на основе их филогенетического родства становится все более актуальной. В литературе описано множество методических подходов для решения этой проблемы, а также схем родства микобактерий, составленных на основе детального изучения геномов заведомо известных видов и видов, которые было необходимо идентифицировать.

Процесс видовой идентификации для более точной таксономической классификации микобактерий основан как на классических методах определения вида (культуральные и биохимические тесты), так и современных высокотехнологичных методах, которые включают в себя различные варианты хроматографии (в первую очередь ВЭЖХ) и молекулярно-генетические методики (ПЦР-рестрикционный и ПЦР-гибридизационный анализ, секвенирование).

Недостатком культуральных и биохимических тестов видовой идентификации, помимо длительности исследования, которое может занимать до нескольких месяцев, является субъективная оценка исследователем результатов этих тестов, вследствие чего возможны ошибки в определении вида. Эти методы могут служить лишь дополнением к современным хроматографическим и молекулярно-генетическим технологиям, успешно применяемым для идентификации, установления новых видов НТМ и филогенетических исследований в области таксономии рода *Mycobacterium*.

Нетуберкулезные микобактерии, как это уже было сказано выше, обнаруживаются в различных источниках окружающей среды. Человек (и животные) могут заразиться НТМ при контакте с водой (в частности с аэрозолями), употреблении воды и пищи, их содержащих.

Как отмечал R. Schulze-Robbecke (1993), НТМ - свободноживущие природные сапрофиты. Строгие патогены, такие как *M. tuberculosis* и *M. leprae*, не встречаются в неживой природе. Однако, многие "свободноживущие" НТМ, такие как *M. avium*, являются потенциальными патогенами. В организм человека они чаще всего попадают через вдыхаемый воздух, содержащий аэрозоли, образующиеся над почвой (поверхностные слои), болотами, подземными водами, морской водой. Микобактериозы значительно чаще (особенно до эры ВИЧ) встречаются в теплых, чем холодных регионах земного шара, а НТМ также чаще выделяются из теплой, чем холодной воды (в естественных водоемах).

Также источниками этих НТМ могут быть водопроводная вода, сточные воды. Ряд НТМ, вызывающих кожные поражения, такие как *M. chelonae*, *M. abscessus*, *M. kansasii*, *M. simiae*, *M. xenopi*, в основном, выделяются из искусственных водных резервуаров - водопроводной, питьевой воды, бассейнов, рыбных танков [Оттен Т.Ф., Васильев А.В., 2005; Steadman J., 1980; Collins C. et al., 1985; Maloney S. et al., 1994; Grossey M. et al., 1994; Von Reyn C. et al., 1994; Bennett S. et al., 1994; Portaels F., 1995; Falkinham J., 2003; Torvinen E. et al., 2004].

В литературе имеется очень большое число работ, в которых изучена частота обнаружения НТМ в разных объектах внешней среды.

Так, E.Wolinsky и T.Rynearson (1968) в 72 образцах земли обнаружили, по крайней мере, 1 вид НТМ, из них *M. fortuitum* - в 64%, скотохромогены - в 54% и медленнорастущие НТМ - в 42% случаев. S.Coslee и E.Wolinsky (1976) при изучении 321 образца воды из природных и других источников обнаружили, что от 6% до 67% из них содержат НТМ.

При исследовании 18 образцов моха с прибрежного региона Юго-Западного Мадагаскара неожиданно обнаружено большое количество кислотоустойчивых микобактерий (83,3%). Помимо "специфических" для данной местности НТМ (таких, как *M. sfagnum*, *M. gordonae*, *M. madagascariense*) были обнаружены и такие виды, как *M. avium*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. marinum*, *M. simiae*. То есть, мох может быть природным источником многих патогенных НТМ для человека и животных [Schroder K. et al., 1992].

M.Casal с соавт. (1998) провели исследование в 15 странах Европы. Более 5 видов НТМ было выделено из объектов окружающей среды в Бельгии, Дании, Финляндии, Германии, Норвегии, Шотландии, Швеции и Испании, менее 5 видов - в Италии, Греции, Хорватии и Чехии; в Португалии и Турции встречались только *M. fortuitum* и *M. abscessus*. В целом, чаще всего это были *M. abscessus* (50,7%), реже *M. fortuitum* (12,4%) и *M. kansasii* (7,4%). *M. malmoense* чаще обнаруживались в Шотландии (29,0%), Швеции (13,0%), Италии (10,0%) и Финляндии (4,5%).

J.Falkinham (2002) отметил, что важным источником НТМ является водопроводная вода. Дезинфицирующие средства, находящиеся в ней, не убивают НТМ. Так, *M. abscessus* во много раз резистентнее к хлорированию воды, чем другие микроорганизмы, эта процедура даже способствует их селекции. Такая вода также содержит гидрокарбонаты и биоциды, которые являются субстратами для роста микобактерий.

В различных регионах США на наличие НТМ были обследованы водонапорные башни (в полученных из них образцах определяли последовательности гена 16S rRNA и сравнивали с последовательностями, имеющимися в банке генов) [Black W., Berk S., 2003]. Установлено, что 75% образцов

воды и аэрозолей содержали НТМ. Большинство излятов были близки к известным НТМ-патогенам - *M. intracellulare*, *M. szulgai*, *M. bohemicum*, *M. gordonae*, *M. nonchromogenicum* и др. Поэтому нужно учитывать, что водонапорные башни являются потенциальным источником НТМ.

В Финляндии в системах питьевой воды в существенном числе случаев обнаруживаются НТМ - главным образом *M. lentiflavum*, *M. tusciae*, *M. gordonae* и ранее неидентифицированные микобактерии [Torvinen E. et al., 2004].

По данным T.Primm и соавт. (2004) при хлорировании водопроводной воды преимущественно выживают микобактерии окружающей среды. Широкое применение хлорирования способствует селекции более устойчивых штаммов и, возможно, объясняет смену штаммов от *M. scrofulaceum* до *M. avium*, которые, например, являются основной причиной цервикальных лимфоаденитов у детей. Таким образом, "человеческая активность" воздействует на экологию микобактерий.

Нетуберкулезные микобактерии вызывают различную патологию у животных. По крайней мере, такие данные имеются в отношении *M. marinum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. porcinum*, *M. farcinogenes*, *M. smegmatis*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. kansasii*, *M. simiae*, *M. genavense* (и ряда других) [Berlcovier H., Vincent V., 2001].

О возможности заражения НТМ свидетельствует ряд экспериментальных моделей, воспроизведенных на животных и рыбах.

Были разработаны также модели НТМ инфекций на мышах: *M. fortuitum* [Parti R. et al., 2005], *M. ulcerans* [Oliveira M. et al., 2003], *M. avium* [Roque S. et al., 2007], *M. abscessus* [Ordway D. et al., 2008] и др.

Инфекцию *M. ulcerans* удается воспроизвести на крысах, морских свинках, броненосцах, обезьянах [Oliveira M. et al., 2005; Walsh D. et al., 2007].

Так описана модель инфекции, вызванной *M. paratuberculosis*, на овцах [Begg D. et al., 2005]. Экспериментальная инфекция *M. paratuberculosis* воспроизведена также на козах [Munjaj S. et al., 2005]. D.Gauthier и соавт. (2004), L.Swaim и соавт. (2006), M.Harriff и соавт. (2007), G.Broussard, D.Ennis (2007), C.Whipps и соавт. (2007) успешно испытали модели инфекций *M. haemophilum*, *M. marinum* и *M. peregrinum* на рыбах [Zebrafish, *Danio rerio*]. *M. triplex* вызывали поражения при введении угрям [Herbst L. et al., 2001]. НТМ (*M. massiliensae*, *M. peregrinum*) удается культивировать в простейших (амебе) [Adekambi T. et al., 2004].

Имеется ряд работ, в которых сделаны попытки диагностики и дифференциальной диагностики патологии, вызываемой НТМ, у животных.

Так, J.Bottcher, A.Gangl (2004) для выявления инфицирования животных, находящихся как в индивидуальных хозяйствах, так и в стадах, использовали серологические тесты. С их помощью были обследованы 2 748 бычьих сывороток из 119 хозяйств (в Баварии). В частности, для иммуно-

логического обнаружения инфекции, вызванной *M. avium/paratuberculosis* (болезнь Джонса) у крупного рогатого скота, был применен метод проточной цитометрии; он имел чувствительность 95,2% и специфичность 96,7% [Eda S. et al., 2005].

Z.Cvetnic и соавт. (2007) за период с 2000 по 2004 гг. поставили туберкулиновые пробы у 74 342 свиней. Из них положительные реакции определяли (в 7 из 13 ферм) у 248 (0,33%), а у 91 (0,12%) особи они были "сомнительными". "Большие" патологические изменения, характерные для туберкулеза, были обнаружены у туберкулиноположительных свиней и свиней с "сомнительной" туберкулиновой реакцией. Микобактерии выделены из лимфатических узлов у 183 из 234 обследованных свиней (78,2%). При молекулярно-генетическом типировании 175 (95,7%) изолятов были отнесены к MAC, 6 (3,3%) - к *M. fortuitum*, 1 (0,5%) - *M. chelonae* и 1 (0,5%) - *M. peregrinum*. Среди изолятов, отнесенных к MAC, 37 (21,1%) были идентифицированы как *M. avium*, а 138 (78,9%) - *M. hominissuis*.

Считается, что "специфические" белки (ESAT-6, CFP-10, MPB-83) можно использовать с гораздо большей эффективностью для обнаружения туберкулеза крупного рогатого скота, вызванного *M. bovis* (в кожных тестах и по продукции in vitro ИЛ-1),

чем "видоспецифический" PPD. Однако, гены, кодирующие эти белки, имеются и в *M. kansasii*. Инфицирование *M. kansasii* телят приводит к развитию у них гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ - выявляется кожными пробами и продукцией in vitro ИЛ-1 под действием PPD) к *M. avium* и *M. bovis*. Аналогичные перекрестные реакции имеют место и при использовании вышеуказанных антигенов [Waters W. et al., 2006].

Вместе с тем, вопрос о передаче НТМ от животных человеку трактуется неоднозначно. Так, проведенные серологические исследования позволили предположить, что передачи НТМ-инфекций от животных человеку не происходит [Meissner G., Anz W., 1977; Thorel M. et al., 2001]. Некоторые молекулярно-генетические исследования также показали, что штаммы одних и тех же видов НТМ, вызывающие заболевания у животных, рыб и людей, разные [Ahrens P. et al., 1995; Guerrero C. et al., 1995; Ucko M., Colomi A., 2002]. Однако имеются и другие данные. В частности, было продемонстрировано значительное генетическое сходство штаммов *M. avium/paratuberculosis*, полученных от пациентов с болезнью Крона и от животных с болезнью Джонса [Mishina D. et al., 1996; Harris N., Barletta R., 2001; Ghadiali A. et al., 2004].

Рецензент: д.м.н., профессор Китаев М.И.