

НЕКОТОРЫЕ ФАКТОРЫ ЕСТЕСТВЕННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ЧЕЛОВЕКА К ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

¹О. И. АЛЬХОВИК, ²Е. В. КУЛЬЧАВЕНЯ, ¹А. Г. ЧЕРЕДНИЧЕНКО

SOME FACTORS OF HUMAN NATURAL RESISTANCE TO TUBERCULOSIS INFECTION

¹O. I. ALKHOVİK, ²E. V. KULCHAVENYA, ¹A. G. CHEREDNICHENKO

¹ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт туберкулеза» Минздрава России

²ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России

Проведено определение потенциальной бактерицидной противотуберкулезной активности и активности против условно-патогенных энтеробактерий мочи здоровых людей с использованием автоматизированной системы Bactec MGIT 960 для культивирования и определения лекарственной устойчивости микобактерий и посева на плотные питательные среды. Установлено, что моча здоровых людей не обладает бактерицидной активностью по отношению к *M. tuberculosis in vitro*.

Ключевые слова: микобактерия, бактерицидность, моча.

The potential bactericidal activity against tuberculosis and the activity against urinary opportunistic Enterobacteriaceae were determined in healthy individuals, by using the Bactec MGIT 960 automatic system for cultivation and determination of drug resistance in mycobacteria and inoculating to dense nutrient media. The urine of healthy individuals was found to have no bactericidal activity against *M. tuberculosis in vitro*.

Key words: mycobacterium, bactericidal action, urine.

По сообщениям Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в 2012 г. заболели туберкулезом 8,6 млн человек, включая 1,1 млн инфицированных вирусом иммунодефицита человека, 170 тыс. умерших от туберкулеза выделяли возбудитель, имеющий множественную лекарственную устойчивость к противотуберкулезным препаратам [6].

Однако, несмотря на то, что треть населения Земли инфицирована микобактерией туберкулеза (МБТ), заболевают не все [3, 6]. Человек может обладать врожденной невосприимчивостью к туберкулезу. Наглядным примером этого явилась так называемая «Любекская трагедия». С 10 декабря по 30 апреля 1930 г. каждый из 251 ребенка, родившегося в округе г. Любек, получил с целью иммунопрофилактики по три дозы вакцины БЦЖ перорально в течение первых десяти дней жизни. В результате 207 детей заболели туберкулезом, причем 72 из них умерли в течение ближайших 2-5 мес. после вакцинации. Но 135 (49,8%) детей полностью выздоровели от туберкулеза, а 44 (17,5%) ребенка вообще не заболели, остались здоровыми, несмотря на получение такой же дозы той же вакцины, как и другие новорожденные. Дальнейшее расследование показало, что вакцинный штамм БЦЖ был контаминирован вирулентной *M. tuberculosis* [7]. Тем не менее 49,8% детей продемонстрировали частичную, а 17,5% – полную устойчивость к туберкулезной инфекции.

Иммунная система 90-95% взрослых людей способна контролировать туберкулезную инфекцию, и, будучи инфицированным, человек в большинстве случаев, тем не менее, не заболевает [3].

Причины врожденной устойчивости к туберкулезу до конца не ясны, как и нет понимания, почему развивается та или иная форма органного туберкулеза. Почему у некоторых больных туберкулезом почек развивается туберкулез мочевых путей, а у других они остаются интактными, несмотря на ипсилатеральный поликавернозный нефротуберкулез? Известно, что в ответ на уропатоген в уротелии секретируются IgA, цитокины, лизоцим, ряд других факторов, препятствующих адгезии микробов, формированию биопленки и способствующих естественной элиминации микроорганизмов. Цель – определить наличие в моче здоровых людей природных защитных факторов против *M. tuberculosis in vitro* с использованием автоматизированной системы Bactec MGIT 960 для культивирования и определения лекарственной устойчивости микобактерий и посева на плотные питательные среды.

Материалы и методы

Учитывая влияние большого числа факторов на заболеваемость урогенитальными инфекциями, бактерицидность мочи оценивали в четырех группах здоровых людей:

1-я – женщины репродуктивного возраста, не живущие половой жизнью и, соответственно, не применяющие контрацепцию (образец 1);

2-я – женщины репродуктивного возраста, живущие половой жизнью и принимающие оральные комбинированные контрацептивы (образец 2);

3-я – женщины в менопаузе, живущие половой жизнью и не применяющие контрацепцию (образец 3);

4-я – молодые мужчины (образец 4).

Такой подбор исследуемых групп обусловлен доказанным влиянием половых гормонов на восприимчивость урогенитального тракта к инфекции [2]. Критериями включения являлись соответствие указанным группам и отсутствие признаков воспаления и бактериурии в общем анализе мочи, критериями исключения – урологические заболевания в анамнезе и/или в настоящее время, жалобы на нарушение мочеиспускания, менструация, патологические изменения в общем анализе мочи.

Потенциальную бактерицидность средней порции дневной мочи оценивали по влиянию *in vitro* на клинический изолят *M. tuberculosis* с множественной лекарственной устойчивостью и референс-штамм *M. tuberculosis* H37Rv (NCDC).

Применяли следующие питательные среды и растворители:

1) жидкая питательная среда Middelbrook 7H9 BBL™ MGIT™ (Becton Dickinson),

2) обогатительная добавка Bactec MGIT Growth Supplement OADC (Becton Dickinson) (10%),

3) кровяной питательный агар 5% (нативный),

4) питательная среда Финн II (яичная, нативная),

5) физиологический раствор,

6) дистиллированная вода,

7) фосфатный буфер pH 7,8.

Ход исследования

Двухнедельные микобактериальные культуры музейного штамма и клинического образца, выделенного от больного, выросшие на среде Левенштейна – Йенсена, в количестве не менее 50 колоний переносили в пробирку со стерильным физиологическим раствором и со стеклянными бусами. Содержимое пробирки гомогенизировали на вортексе в течение 1-2 мин, оставляли на 10-15 мин для осаждения частиц. Супернатант переносили в другую пробирку, мутность суспензии корректировали в соответствии со стандартом 5 Ед ГИСК им. Л. А. Тарасевича. Далее делали пять последовательных десятикратных разведений; для исследования использовали два последних разведения (5×10^4 , 5×10^3).

Инкубацию и детекцию роста выполняли по следующей методике. Микобактериальные суспензии музейного штамма и клинического образца, выделенного от больного, в разведениях 5×10^4 ,

5×10^3 смешивали с испытуемыми образцами мочи в соотношении 1 : 1. После часовой экспозиции проводили стандартную предпосевную обработку фосфатным буфером с последующим центрифугированием 20 мин 3 000g.

В качестве контроля использовали физиологический раствор, который смешивали с микобактериальными культурами в соотношении 1 : 1. После часовой экспозиции так же проводили стандартную предпосевную обработку фосфатным буфером с последующим центрифугированием 20 мин 3 000g.

Кроме того, выполняли посев микобактериальных культур в разведениях 5×10^4 , 5×10^3 на плотные и жидкие среды до обработки биологическими жидкостями и физиологическим раствором (контроль ростовых свойств). Посев осадка проводили на среду Финн II и бульон Middelbrook 7H9 BBL™ MGIT™ (Becton Dickinson) в количестве 0,5 мл. Засеянные пробирки с плотной питательной средой инкубировали в термостате при температуре 37°C. Проводили ежедневный просмотр засеянных пробирок.

Засеянные пробирки MGIT инкубировали в системе Bactec MGIT 960 до автоматической индикации наличия роста, которая подтверждается путем микроскопии мазков с окраской по Цилю – Нельсону. Пробирки с положительным результатом извлекали, пробирки с отсутствием роста продолжали инкубировать до 42 дней.

Результаты

Образец 1 оказался контаминированным энтеробактерией (клинически незначимый титр 10^2 КОЕ/мл), и рост МБТ не получен. Сравнение степени и скорости роста микобактерий в культуре с добавлением мочи людей исследуемых групп показало некоторые различия в степени и скорости роста, не имеющие системы и достоверного подтверждения протекторных свойств изучаемых факторов. Совокупные данные представлены в таблице.

Таким образом, при экспозиции 45 сут при ежедневном контроле роста и подсчете КОЕ не установлена бактерицидная активность мочи здоровых людей по отношению к *M. tuberculosis in vitro*. Даже незначительная контаминация энтеробактериальной флорой препятствует идентификации МБТ.

Заключение

Проведенное исследование не подтвердило гипотезу о природном защитном факторе уротелия от инфекции посредством мочи, однако показало одну из причин резкого снижения выявления микобактериурии у больных урогенитальным туберкулезом. Во всем мире сегодня широко распространены как урогенитальные инфекции [1, 4, 5], для которых характерна бактериурия, так и асим-

Бактерицидная активность мочи по отношению к микобактерии туберкулеза

Образец	H37Rv 10×3	H37Rv 10×3	H37Rv 10×4	H37Rv 10×4	Кл. шт. 10×3	Кл. шт. 10×3	Кл. шт. 10×4	Кл. шт. 10×4
	Вастес	Плотные среды	Вастес	Плотные среды	Вастес	Плотные среды	Вастес	Плотные среды
№ 1	Контам	Контам	Контам	Контам	Контам	Контам	Контам	Контам
№ 2	Рост 15 сут	Рост 31 сут 21 КОЕ	Рост 17 сут	Рост 34 сут > 50 КОЕ	Рост 16 сут	Рост 52 сут 30 КОЕ	Рост 19 сут	Рост 44 сут > 50 КОЕ
№ 3	Рост 13 сут	Рост 35 сут 12 КОЕ	Рост 17 сут	Рост 36 сут > 50 КОЕ	Рост 15 сут	Рост 57 сут 19 КОЕ	Рост 18 сут	Рост 44 сут > 50 КОЕ
№ 4	Рост 16 сут	Рост 31 сут 16 КОЕ	Рост 19 сут	Рост 36 сут > 50 КОЕ	Рост 17 сут	Рост 36 сут > 50 КОЕ	Рост 22 сут	Рост 36 сут > 50 КОЕ
Контроль (фин. р-р)	Рост 14 сут	Рост 31 сут 18 КОЕ	Рост 18 сут	Рост 36 сут > 50 КОЕ	Рост 16 сут	Рост 36 сут > 50 КОЕ	Рост 14 сут	Рост 36 сут > 50 КОЕ
Без обработки	Рост 12 сут	Рост 22 сут 28 КОЕ	Рост 10 сут	Рост 21 сут > 50 КОЕ	Рост 14 сут	Рост 18 сут 24 КОЕ	Рост 10 сут	Рост 14 сут > 50 КОЕ

птомная бактериурия. Таким образом, в моче людей нередко присутствуют неспецифические микроорганизмы, которые препятствуют выявлению роста МБТ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Шевченко С. Ю., Кульчаева Е. В., Зулин Я. В. Инфекции мочевыводящих путей в структуре поликлинического приема уролога // Мед. и образов. в Сибири: эл. ресурс. – 2013. – № 5. (http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=1140).
2. Luthje P., Lindén Hirschberg A., Brauner A. Estrogenic action on innate defense mechanisms in the urinary tract. *Maturitas*. 2013 Nov 5. pii: S0378-5122(13)00329-0. doi: 10.1016/j.maturitas.2013.10.018. [Epub ahead of print]
3. Rook G. A. W., Seah G., Ustanowski A. M. Tuberculosis: immunology and vaccination // *Eur. Resp. J.* – 2001. – Vol. 17. – P. 537-557.
4. Wagenlehner F. M., Münch E., Pilatz A. et al. Urinary concentrations and antibacterial activity of Nitroxoline 250mg versus Trimethoprim 200mg against uropathogens in healthy volunteers //

Antimicrob Agents Chemother. – 2013. – Nov. 11. [Epub ahead of print].

5. Walters M. S., Lane M. C., Vigil P. D. et al. Kinetics of uropathogenic *Escherichia coli* metapopulation movement during urinary tract infection // *MBio.* – 2012. – Feb. 7, 3(1). – pii: e00303-11. doi: 10.1128/mBio.00303-11. Print 2012.
6. WHO. Global tuberculosis report 2012. Geneva: World Health Organization, 2012. http://www.who.int/th/publications/global_report/en/index.html (accessed Dec 27, 2012).
7. Wilson G. The Lubeck disaster // *Am. J. Public Health Nations. Health.* – 1931. – Vol. 21, № 3. – P. 282.

ДЛЯ КОРРЕСПОНДЕНЦИИ:

Альховик Ольга Ивановна

ФГБУ «ННИИТ» Минздрава России,

врач-бактериолог.

630040, г. Новосибирск, Охотская, д. 81а.

Тел.: 8 (383) 203-79-89.

Поступила 10.02.2014

Молекулярно-генетическая диагностика туберкулеза за 1 день

от выделения ДНК до оценки результата

Дозирующее оборудование
и расходные материалы Brand



Центрифуги Hermle



Автоматизация процесса

Комплексное оснащение ПЦР-лаборатории

Качество, проверенное
временем



Ламинарно-потокосые
шкафы и ПЦР-боксы Kojair



Сканер для интерпретации
результатов GenoScan Hain



Прибор для выделения
ДНК/РНК GenoXtract Hain



Процессор для гибридизации
продуктов амплификации
GT-Blot 48 Hain

**Технология
диагностики туберкулеза,
рекомендованная ВОЗ,
Женева 2013:**

http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/78099/1/WHO_HTM_TB_2013.01.eng.pdf

Реклама

Компания «БиоЛайн» – эксклюзивный дистрибьютор Hain Lifescience (Германия) в России и Украине.
Компания «БиоСистемы» – эксклюзивный дистрибьютор Kojair Tech Oy, Hermle Labortechnik GmbH в России и авторизованный дистрибьютор продукции Brand GmbH в России.

197101, Россия, Санкт-Петербург
Петроградская наб., 36 А
тел.: (812) 320 49 49
факс: (812) 320 49 40
e-mail: main@bioline.ru
www.bioline.ru

Москва, тел.: (800) 555 49 40
Новосибирск, тел.: (383) 227 09 63
Екатеринбург, тел.: (343) 287 32 49
Нижний Новгород, тел.: (831) 278 61 47
Ростов-на-Дону, тел.: (863) 268 99 32
Казань, тел.: (843) 570 66 88

ДП «БиоЛайн Украина»
Украина, Киев
тел.: +38 (044) 200 89 37

ООО «БиоЛайн-БС»
Республика Беларусь, Минск
тел.: +37 (517) 399 43 79

Единый бесплатный
номер сервисной
службы для всех
регионов России:
8 800 333 00 49



Группа компаний **БиоЛайн**