

IDENTYFIKACJA MYKOBAKTERII ATYPOWYCH NA PODSTAWIE ICH BIOTYPU

Edwin Paryski

Sanatorium Przeciwgruźlicze im. dr T. Chałubińskiego w Zakopanem

W latach 1968—1970 przebadaliśmy kolekcję 150 szczepów mykobakterii atypowych (innych niż gruźlicze) wyhodowanych z dróg oddechowych ludzi.

Z każdym szczepem wykonano ok. 30 różnych testów, głównie odnoszących się do własności morfologicznych, biochemicznych, enzymatycznych i fizjologicznych. W ten sposób uzyskano charakterystykę każdego szczepu w zakresie wykonanych testów. Sumę cech każdego szczepu nazwaliśmy jego biotypem.

Tak dużą ilością testów trudno posługiwać się w praktyce, dlatego też wybrano 10 cech posiadających największą siłę dyskryminacyjną. Przez cechę dyskryminacyjną należy rozumieć taką, którą można oznaczyć przy pomocy odpowiednich testów jednoznacznie i powtarzalnie jako dodatnią albo ujemną i która dzieli wszystkie szczepy badanej populacji na dwie równe grupy.

Zróznicowania według intensywności wyniku testowego nie brano pod uwagę, natomiast duże znaczenie przypisywano powtarzalności wyników jakościowych testów, co zależy oczywiście od ściśle określonej techniki testów i kryteriów ich odczytania.

Porównanie biotypów wszystkich szczepów wykonane przy pomocy kart perforowanych, umożliwiło wydzielenie 9 głównych grup i 26 podgrup.

Identyfikacja nowych szczepów polegała na porównaniu ich biotypu (uwzględniających 10 cech) z poprzednio poznanymi biotypami.

Aczkolwiek podział na biotypy ma pewne znamiona klasyfikacji naturalnej, nie jest on propozycją rozstrzygnięcia tego ważnego problemu.

Celem pracy było: 1) określenie gatunków atypowych najczęściej występujących w badanej kolekcji szczepów, 2) ocena i weryfikacja metody opartej na powyższych zasadach dla identyfikacji (diagnostyki) szczepów atypowych (metodę tę można by nazwać charakterystyką dyskryminacyjną).

Przebadano kolekcję 150 szczepów atypowych, na którą składało się

115 szczepów „dzikich”, wyhodowanych przeważnie z płwociny chorych leczonych na gruźlicę płuc, oraz 35 szczepów wzorcowych tj. otrzymanych z rozpoznaniem (głównie z PCM we Wrocławiu od doc. Szulgi, i z IG w Warszawie od prof. Janowca).

Wstępny, orientacyjny podział 150 szczepów tworzących kolekcję na grupy Runyona był następujący:

- I. Fotochromogenne — 16 (11⁰/o).
- II. Skotochromogenne — 56 (37⁰/o).
- III. Niefotochromogenne — 40 (27⁰/o).
- IV. Szybko rosnące — 38 (25⁰/o).

Początkowo oznaczano 30 cech każdego szczepu. Następnie wybrano 10 najbardziej dyskryminujących cech dla analizy. W tabeli 1 podano 10 wybranych cech oraz częstość dodatnich wyników odpowiednich 10 testów w kolekcji 150 szczepów atypowych.

Technikę i kryteria testów opisano w poprzedniej pracy (Gruźlica 1965, 5 i Pol. Medical Journal, 1970, 3). Wszystkie testy wykonywano wielokrotnie na nowo posianych hodowlach na pożywce L-J.

Wyniki przebadania każdego szczepu wyrażano 10-miejscowym kodem, w którym dodatni wynik testu oznaczono „1”, ujemny „0”. Kolejne pozycje kodu odnoszą się do 10 wybranych cech dyskryminacyjnych (tab. 1).

Tabela 1

Dodatnie wyniki cech dyskryminujących

Kod	Cecha	Szczepy	
		liczba (n)	%
1	reduktaza NO ₃	69	46
2	utlenianie Fe	40	27
3	wzrost w temp. 45°	64	43
4	hydroliza Tween 80°	121	81
5	arylsulfataza	134	81
6	PAS rozbudowa	11	7
7	ureaza	53	35
8	nikotinamidaza	74	49
9	pyrazinamidaza	45	30
10	formamidaza	35	25

Tabela 2 przedstawia „matrycę” biotypów grupowych, oraz liczby *n* szczepu każdego biotypu. Na przykład biotyp zakodowany jako 100, 110, 1100 odpowiada *M. kansassi*; 001, 000, 0110 *M. avium* itd. Nazwy nadane

biotypom są częściowo nazwami dobrze znanymi z literatury (np. *M. kansasii*, *M. aquae*, itd.), w braku odpowiednich nadano je prowizoryczne w nawiasach (np. *M. flavum*, *M. formamidasicum* itd.).

Należy zaznaczyć, że w celu identyfikacji niektórych gatunków mogą być potrzebne dodatkowo inne testy poza baterią wybranych 10 (np. fotochromogeneza, niacyna, katalaza itd.). Badanie lekooporności szczepów dla celów identyfikacji miało najmniejszą wartość dając często tylko międzyszczepowe różnice i dlatego zostało pominięte.

Dodatkowe informacje zebrane o każdym szczepie dotyczyły następujących zagadnień: 1) czy szczep wyhodowano tylko jeden raz od chorego (sporadycznie), czy więcej razy, i 2) czy chory wydalął równocześnie prątki gruźlicy. Szczepy spełniające oba warunki uznano za potencjalnie chorobotwórcze, tj. stanowiące czynnik etiologiczny schorzenia zwanego *mycobacteriosis*.

Wśród 115 szczepów dzikich odróżniono 26 biotypów, z których każdy składał się z 2—16 szczepów lub z 9 grup na podstawie tylko pierwszych podstawowych cech (NO_3 , Fe i 45°).

Potencjalnie chorobotwórczych szczepów (wyhodowanych wielokrotnie i wyłącznie od tego samego chorego) było 34 na 115 dzikich szczepów — ok. 30%. Pozostałe (81) szczepy dzikie (ok. 70%) występowały tylko sporadycznie.

Wśród potencjalnie chorobotwórczych gatunków przeważały zdecydowanie 2: *M. kansasii* (15 szczepów) i *M. xenopei* (15 szczepów). Znacznie rzadziej występowały szczepy potencjalnie chorobotwórcze (*M. fortuitum*) i ptasio-podobne (po 2 szczepy).

Szczepy niechorobotwórcze atypowe, występujące sporadycznie, stanowiące 70% dzikich szczepów, należały do wielu gatunków, najczęściej: *M. aquae* i odmiany (30 szczepów), *M. flavum* (16 szczepów), grupa skotochromogenów termofilnych (10 szczepów), grupa „Radish” (11 szczepów) i grupa *M. fortuitum* (13 szczepów).

Z powodu selekcjonowanego charakteru kolekcji, nie można obliczyć częstości występowania szczepów atypowych. Na ogólną liczbę 1087 chorych leczonych sanatoryjnie w latach 1968—1970 wydalających kwasoporne prątki w czasie pobytu w sanatorium, od 76 (ok. 7%) — wyhodowano jednokrotnie i wielokrotnie mykobakterie atypowe. W tym ok. 2% stanowiły szczepy potencjalnie chorobotwórcze, a 5% saprofity (sporadyczne).

Mycobacteriosis, tj. chorobę spowodowaną przez mykobakterie atypowe stwierdzono u 24 chorych (łącznie z leczonymi w innych sanatoriach). U chorych tych wyhodowano ten sam szczep wielokrotnie i wyłącznie (przy nieobecności prątków gruźlicy). U jednego chorego wyhodowano szczep *M. xenopei* kilkanaście razy z płwociny, a następnie po wykonaniu resekcji tkanki płucnej również ze specimenu chirurgicznego (Gruźlica,

Biotypy mykobakterii atypowych

Grupa	Reduk- taza	Fe	45°	Tween	AS	PAS	Urea- za	Nicotynami- daza	Pyrazinami- daza	Formami- daza	Nazwa	Liczba (n)
0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	<i>M. tuberculosis</i>	—
	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	<i>M. bovis</i>	—
1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	<i>M. kansasii</i>	15
	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	<i>M. aquae</i>	16
2	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	<i>M. aquae</i> var. <i>ureolyticum</i>	9
	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	<i>M. amidasicum</i>	2
	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	<i>M. formamidasicum</i>	2
	1	1	0	1	1	0	v	v	v	0	<i>M. flavum</i> I-V	14
3	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	<i>M. flavum</i> VI	2
	1	0	1	1	1	0	v	v	v	v	<i>a Thermophilum</i>	4
4	0	0	1	1	1	0	v	0	0	0	<i>b Thermophilum</i>	2
	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	<i>M. avium</i>	11
5	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	<i>M. battey</i>	3
	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	<i>M. xenopei</i>	15
6	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	<i>M. terrae</i> (Radish)	11
	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	<i>M. borstelense</i> (?)	5
7	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	<i>M. fortuitum</i> A	4
	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	<i>M. fortuitum</i> B	2
	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	<i>M. fortuitum</i> C	2
	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	<i>M. parafortuitum</i>	
8	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	Saprophyty (szybko rosnące)	9
9	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	<i>M. phlei</i>	4
	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	<i>M. smegmatis</i>	10

1969, 2). Dwa szczepy *M. kansasii* wykonano z materiału sekcyjnego, otrzymanego z innego laboratorium.

Dotychczas wyodrębniono 26 gatunków mykobakterii atypowych tj. podgrup z identycznymi biotypami.

Podział na 9 grup na podstawie tylko 3 cech podstawowych przedstawionych w pierwszych 3 pozycjach kodu biotypu (NO_3 , Fe, 45°) wydaje się wystarczający w większości przypadków dla celów klinicznych.

Wyróżnienie potencjalnie chorobotwórczych szczepów od saprofitów i komensalów, poza określeniem przynależności szczepu do jednego ze znanych gatunków chorobotwórczych (głównie *M. kansasii*, *M. xenopei*, *M. fortuitum* i *M. avium*) powinno być poparte wyhodowaniem danego szczepu wielokrotnie i wyłącznie od tego samego chorego (ewentualnie wyhodowaniem z materiału operacyjnego lub sekcyjnego).

Weryfikacja metody jest w toku. Polega ona na zastosowaniu powyższej matrycy biotypów jako klucza dla identyfikacji nowych szczepów otrzymanych do badania.

Dotychczas udało się zidentyfikować ok. 85% spośród przebadanych 205 szczepów atypowych. Pozostałe 15% są to biotypy reprezentowane dotychczas przez jeden tylko szczep.

E. Paryski

IDENTIFICATION OF ATYPICAL MYCOBACTERIA ON THE BASIS OF THEIR BIOTYPE

Summary

In the course of 3 years (1968/1970) acidfast mycobacteria other than *M. tuberculosis* (MOT) were isolated from about 7% of 1087 patients excreting acidfast bacteria, including about 2% pathogenic strains („significant”), the remainder being considered casual saprophytes.

In a collection of 150 MOT strains, biotypes were determined, consisting of 10 selected discriminatory characters (biochemical, enzymatic and microbiological tests). The biotypes of all the strains were then compared „each with each”.

On the basis of three key characters (NO_3 reductase, oxidation of it on salts and growth at 45°), the strains were divided into 9 main groups. On the basis of all 10 characters, 26 subgroups were distinguished a majority belonging to known species of „atypical” mycobacteria, but some representing new types. Newly isolated strains of MOT were identified by comparing their biotype with those of previously studied strains.

Out of 115 „wild” strains of MOT, 83 (72,2%) were casual saprophytes among which most frequent were *M. aquae* and its varieties, *M. flavum* (*flavescens*) „thermophilic scotochromogens”. Radish bacilli and rapid growers.

Out of 115 „wild” strains, 24 belonged to known pathogenic species and were isolated exclusively and repeatedly from the same patients (20,9% of patients excreting MOT, or 2,2% of all patients excreting acid-fast bacilli). In these 24 patients mycobacteriosis was postulated. In one case, the same strain (*M. xenopei*)

was isolated from surgically resected pulmonary lesions as well as sputum. Two strains (received from another laboratory) were isolated from autopsy material.

The most frequent pathogenic strains were *M. kansasii* (15) and *M. xenopei* (15), and *M. avium* and *M. fortuitum* were less frequent (2 each).