

УДК 619:616.982.2

Власенко В.В., Власенко І.Г.

Вінницький національний аграрний університет (Україна)

Лисенко О.П., Архипов І.Н.

РУП «Інститут експериментальної ветеринарії
ім. С.Н. Вишелесського» (Беларусь)

РАННЯ ДІАГНОСТИКА ТУБЕРКУЛЬОЗУ З ВИКОРИСТАННЯМ СЕРЕДОВИЩА ВЛАКОН*

Порівнюються результати виявлення мікобактерій туберкульозу з використанням бактеріоскопії за Ціль-Нільсоном, культурального дослідження на яєчних середовищах та прискореного методу (з використанням середовища ВЛАКОН).

Показано, що використання запропонованого поживного середовища має свої переваги: підвищується чутливість та результативність досліджень, з'являється можливість диференціації культур різних видів мікобактерій за допомогою методики реакції аглютинації (РА) на склі з наступним фарбуванням та мікроскопуванням, значно скорочується термін діагностики туберкульозу.

Ключові слова: туберкульоз, мікобактерії, методи виявлення мікобактерій, поживні середовища.

Незважаючи на широкомасштабну профілактику, біля 2 млн. людей щорічно помирає від туберкульозу і половина населення планети інфіковано збудником туберкульозу [7]. Відомо, що для багатьох антропозоонозних захворювань існує біологічний ланцюг "тварина - м'ясопродукти - людина", тобто в разі недостатнього контролю продукти харчування тваринного походження, уражені збудником туберкульозу, можуть передавати збудник (інфекцію) людям [4].

Ситуація із здоров'ям населення України набуває загрозливого стану, загострилась і епідеміологічна ситуація з туберкульозу. Щороку в Україні виявляється 30-40 тис. хворих на туберкульоз, загальна кількість тих, хто перебуває під наглядом лікувально-профілактичних закладів, становить близько 700 тис. осіб, у т.ч. хворих на активні форми туберкульозу - 140 тисяч. За період з 1990 по 2005 рік захворюваність на туберкульоз органів дихання зросла в 2,4 раза [3]. В 1995 році рішенням ВООЗ в нашій країні було оголошено про епідемію туберкульозу. Слід зазначити, що від цього захворювання щорічно в Україні помирає 10-12 тис. людей [1].

До теперішнього часу прийнято, що "золотим" стандартом лабораторної діагностики туберкульозу залишається мікробіологічне дослідження, яке включає бактеріоскопію і посів на поживні середовища. Дослідження мазків діагностичного матеріалу методом люмінесцентної мікроскопії і фарбування за Ціль-Нільсоном на кислотостійкі бактерії - найбільш швидкий спосіб отримання результатів. Але специфічність і чутливість бактеріоскопії достатньо низька і культуральна діагностика матеріалу займає не менше 4-8 тижнів, а негативними вважаються результати при

* У статті використані матеріали наукових досліджень, які проводились в рамках договору про міжнародне співробітництво учених України і Беларусі.

відсутності росту протягом 12 тижнів. Технології діагностики, які існують за кордоном дороги, і, поки що, малодоступні для широкого використання в Україні [2, 5].

З метою покращення діагностики туберкульозу в Україні розроблено «Живильне середовище зі стимулятором росту для прискореного виявлення збудників туберкульозу», яке отримало назву „ВЛАКОН”.

Метою нашої роботи була перевірка заявлених властивостей і якості живильного середовища ВЛАКОН для прискореної детекції туберкульозу.

Матеріали та методи досліджень. Для визначення ефективності середовища використовували культури мікобактерій: *M. tuberculosis H37 Rv* (з колекції РИСК ім. Л.А.Тарасевича), *M. bovis 8*, *M. bovis BCG*, *M. avium 2282* (з колекції ВГНКИ), які висівали з ліофілізованого стану спочатку на середовище Левенштейна-Йенсена, потім - на середовище Павловського. Отримані культури на середовищі Павловського знімали в кількості 1 мг по загальноприйнятій методиці і додавали їх в 1 мл стимулятора росту мікобактерій, а отриману суспензію гомогенізували електромагнітною мішалкою протягом 15 хв. Таким чином була отримана робоча суспензія. В подальшому з робочої суспензії готували розведення в стимуляторі росту (1:10) і ставили в термостат при температурі 37-38°C на 48 год. Для визначення ростових якостей контрольних середовищ МПБ, МПА використовували стафілококову тест-культуру *S. epidermitidis* (1225).

Використання живильного середовища зі стимулятором росту для прискореного виявлення збудників туберкульозу - „ВЛАКОН”. Живильне середовище розфасовано по 100,0 , 250,0 , 500,0 г. Стимулятор росту розлито по 5,0, 100,0, 200,0 мл. Зберігали середовище ВЛАКОН у герметично закритій упаковці з відносною вологістю не більше 60,0% при температурі від 5 до 25°C. Термін придатності середовища ВЛАКОН 18-24 місяців.

Середовище ВЛАКОН призначене для прискореного виявлення мікобактерій туберкульозу: стимулятор - для прискорення росту, живильне середовище - для культивування мікобактерій. Стимулятор росту - стерильна, прозора, безбарвна рідина, що містить мікро та макроелементи (допускається жовтуватий відтінок). Живильне середовище (дрібнодисперсний, гігроскопічний порошок кремового кольору) Для приготування середовища „ВЛАКОН” брали наважку у кількості, зазначеній на етикетці, розмішували в 1,0 л стерильної дистильованої води, кип'ятили 2-3 хвилини до повного розплавлення агару, фільтрували через ватно-марлевий фільтр, розливали у відповідний посуд, стерилізували при (121,0±1,0)°C протягом 15 хвилин у автоклаві.

Готове середовище жовтого забарвлення з рН 7,2±0,2, використовували протягом 1 місяця за умови зберігання його при (6,0±2,0)°C.

Перед посівом живильне середовище розплавляли на водяній бані і розливали в асептичних умовах у стерильні чашки Петрі шаром 6-8 мм (доза 18-20 мл).

До 5,0 мл стимулятора росту додавали у асептичних умовах за допомогою стерильного шприця 1,0-1,5 мл підготовленого інфікованого матеріалу (відбір і підготовка матеріалу здійснюється за загальноприйнятною методикою бактеріологічних досліджень згідно Наказу МОЗ України №45-2002р. та чинної методичної рекомендації МОЗ - 2001р. [5]. Стимулятор росту забезпечує виділення мікобактерій із крові без її попередньої обробки. Отриману суспензію інкубували у термостаті при температурі (37,0±1,0)°C протягом 24-48 годин і висівали на живильне середовище.

В чашку Петрі зі свіжорозплавленим живильним середовищем вносили 1,5 мл суспензії (інфікованого матеріалу у стимуляторі росту), рівномірно розподіляючи її по всій поверхні. Чашки Петрі *не перевіряли!*, герметизували прозорою липкою стрічкою та інкубували при $(37,0 \pm 1,0)^\circ\text{C}$ протягом 10 діб. Посіви прориваються щоденно. Візуально можна виявити характерний ріст мікобактерій уже через 24-48 годин.

З отриманих культур готували мазки і фарбували їх за методом Ціль-Нельсена. Для визначення видової належності збудників туберкульозу, вирощених на середовищі ВЛАКОН, використовували метод зараження лабораторних тварин - морських свинок і кроликів. Для контролю зараження тварин застосовували культури *M. tuberculosis H37 Rv*, *M. bovis* 8, які вирощували на середовищі ВЛАКОН, а також на середовищі Павловського (контрольні культури).

Через 71 добу після зараження провели забій і патологоанатомічний розтин тварин. У тварин із серця відбирали проби крові в стерильні пробірки з гепарином, додавали рівний обсяг стимулятора росту й поміщали в термостат при $37-38^\circ\text{C}$ на 24 години, потім висівали на живильні середовища ВЛАКОН, МПА і МПБ. З культури, що виросла на середовищі ВЛАКОН, готували мазки й фарбували їх за Ціль-Нельсеном. Для подальшого дослідження від морських свинок відбирали пахові лімфовузли, печінку, селезінку й легені, а від кролів – лише печінку, селезінку та легені. Потім проводили обробку патологічного матеріалу за А. Алікаєвою і посів суспензії кожного органу на живильні середовища Левентітейна-Йенсена, МПА, МПБ. Також суспензію кожного органу, обробляли стимулятором росту, після чого висівали на середовище ВЛАКОН, як указано вище. Облік росту культур на середовищах проводили щодня протягом перших 5 діб, а далі регулярно з інтервалом 5 діб до закінчення терміну інкубації. З отриманих культур готували мазки і фарбували їх за методом Ціль-Нельсена.

Для диференціації культур різних видів мікобактерій, що виросли на середовищі ВЛАКОН, ми апробували методику - реакцію аглютинації (РА) на склі з наступним фарбуванням і мікроскопуванням запропоновану професором А.Лисенко [6].

Як антиген використовували культури мікобактерій із середовища ВЛАКОН, сироватки - антисироватки до *M. bovis* Vallee, до антигенів атипичних мікобактерій, а також негативну сироватку крові великої рогатої худоби. Результат реакції враховували протягом 4 хв., після чого скло фарбували за Ціль-Нельсеном, але без дофарбовування метиленовим синім і мікроскопували.

Результати та їх обговорення. Вивчення ростових якостей запропонованого середовища проводили в порівнянні з ячним середовищем Левенштейна-Йенсена, МПА, МПБ (контрольні середовища). Результати досліджень наведені в таблиці 1.

Як видно з результатів досліджень, що на середовищі ВЛАКОН ріст культур референтних штамів *M. tuberculosis H37Rv*, *M. bovis* 8, *M. avium* 2282, *M. bovis* BCG з'являвся на 2-4 добу у вигляді круглих напівпрозорих колоній сіро-білих кольорів, іноді з жовтуватим відтінком, що зливалися до 5-6 доби в «газон». При зворотному пересіванні із середовища ВК на середовище Левентітейна-Йенсена без малахітового зеленого було отримано ріст культур всіх штамів з характерною для них морфологією. При мікроскопії мазків, приготованих з культур *M. tuberculosis H37Rv*, *M. bovis* 8., *M. bovis* BCG, *M. avium* 2282, які виросли на середовищі ВЛАКОН протягом 2-4 доби й пофарбованих за Ціль-Нельсеном, спостерігали коки, овоїди, прямі й вигнуті палички

різної величини, груше-, амебоподібні форми з порожнім центром і зернистістю - рожевого або червоно-фіолетового кольору.

Таблиця 1. Результати досліджень росту тест-штамів мікобактерій на контрольних та дослідному середовищах

Назва дослідного матеріалу	Кількість проб на одне середовищ.	Результати росту культур на поживних середовищах							
		МПБ		МПА		Середовище Левенштейна-Йенсена		Середовище «Влаконт» (дослідне)	
		Факт	%	Факт	%	Факт	%	Факт	%
<i>M. tuberculosis H37 Rv</i> ,	10	Немає росту	-	Немає росту	-	$\frac{42 \pm 0,4}{10}$	100	$\frac{3 \pm 0,58^*}{10}$	100
<i>M. bovis</i> 8	20	Немає росту	-	Немає росту	-	$\frac{40 \pm 0,93}{20}$	100	$\frac{4 \pm 0,88^*}{20}$	100
<i>M. avium</i> 2282	10	Немає росту	-	Немає росту	-	$\frac{41 \pm 0,49}{10}$	100	$\frac{2 \pm 0,58^*}{10}$	100
<i>M. bovis BCG</i>	12	Немає росту	-	Немає росту	100	$\frac{35 \pm 0,9}{12}$	100	$\frac{2 \pm 0,56}{12}$	100
<i>S. epidermitidis</i> (1225)	10	$\frac{1 \pm 0,49}{10}$	100	$\frac{1 \pm 0,53}{10}$	100	Немає росту	-	Немає росту	-

Примітка: 1)* – $P < 0,001$ порівняно з показниками середовищем Левеншт.-Йенс. (контрольне). 2) Знаменник кількість проб, а чисельник через який період (днів) отримано ріст на всіх посівах.

У мазках цих же культур 1,5-місячного росту на середовищі ВЛАКОН виявляли червоного кольору клітини розсіпу коків, дипло-, тетракоки, овоїди, велику кількість паличок різної величини із зернистістю. Таким чином, при тривалому культивуванні мікобактерій на середовищі ВЛАКОН підтверджена їх здатність трансформуватися в класичні форми збудників.

У морських свинок, заражених культурами *M. tuberculosis H37Rv*, *M. bovis* 8, 11-добового росту на середовищі ВЛАКОН і культурами тих же штамів, вирощених на загальноприйнятих живильних середовищах й убитих через 71 добу, виявлені патолого - анатомічні зміни, характерні для туберкульозу.

При мікроскопії мазків гомогенатів патматеріалу спостерігали клітини рожево-червоного кольору коки дрібні й великі з порожнім центром, палички короткі й довгі і зернами по полюсах, прямі й вигнуті та палички рубіно-червоного кольору. При посіві гомогенатів патматеріалу від морських свинок і кролів на середовище ВЛАКОН спостерігали ріст на 2-4 добу у вигляді дрібних круглих напівпрозорих колоній сіро-білих кольорів, іноді з жовтуватим відтінком, що зливаються до 5-6 діб в «газон». При мікроскопії мазків культур 6-15 добового росту, що виростили з патматеріалу на середовищі ВЛАКОН, спостерігали червоні дрібні й великі коки, диплококи, овоїди з порожнім центром, фуксинофільні дрібні прямі й вигнуті палички. При посіві крові з дослідних лабораторних тварин на

середовище ВЛАКОН спостерігали на 2-4 добу ріст культур із всіх зразків у вигляді дрібних круглих колоній біло-сірого кольору, що злилися в «газон». При мікроскопії мазків, приготовлених з культур, що вирости на середовищі ВЛАКОН протягом 5 діб, спостерігали клітини рожево-червоного кольору: товсті вигнуті палички, прямі тонкі палички із зернистістю й інші форми. Встановлено, що культури мікобактерій людського й бичачого видів із середовища ВЛАКОН чітко агглютинувались антисироваткою до *M. bovis*, і не агглютинувались негативною сироваткою крові КРС. Демонстративність РА на склі підвищувалася при фарбуванні (по Ціль-Нельсену, але без дофарбовування метиленовим синім) і наступному мікроскопуванні.

Таким чином середовище ВЛАКОН призначене для прискореного виявлення мікобактерій туберкульозу: стимулятор - для прискорення росту, живильне середовище-для культивування мікобактерій, а сукупність усіх складових середовища ВЛАКОН, які об'єднані єдиним творчим задумом, дозволяє одержати технічний результат, а саме скоротити бактеріологічні дослідження, підвищити чутливість методу. За рахунок нових ознак у способі виділення збудника туберкульозу: попередньої обробки підготовленого патматеріалу стимулятором та нового складу живильного середовища для виділення збудника туберкульозу створюється синергічний ефект, який обумовлює скорочення тривалості інкубування матеріалу з одночасним підвищенням чутливості методу, і як результат - значне скорочення тривалості бактеріологічних досліджень. Рахується, що стимулятор росту активізує натрій-калеві насоси і деякі ферменти мікобактерій, що стимулює адаптивні структури і спонукає швидкому проростанню в вигляді поліморфних клітин, що мають загальні антигени з бацилярними формами збудника туберкульозу та ідентичні ділянки ДНК. Напевно, слід визнати, що відомі ультрадрибні, коковидні, не кислотостійкі та інші форми - не лише результат адаптації збудника до факторів імунної системи чи дії хіміотерапевтичних препаратів, але і закономірні етапи, в яких класична «бацила Коха» - лише одна з стадій життєвого циклу збудника туберкульозу.

Висновок. 1. Застосування середовища ВЛАКОН зі стимулятором росту дозволяє на 2-4 добу виявити ріст культур збудників туберкульозу людського, бичачого видів як референтних штамів, так і з патматеріалу й крові тварин, заражених збудником туберкульозу.

2. Не встановлено чітких розходжень у морфології культур збудників туберкульозу людського, бичачого й пташиного видів, вирощених на середовищі ВЛАКОН і Ленвенштейна-Йенсена, а також у морфології клітин при мікроскопії мазків, пофарбованих за Ціль-Нельсеном.

3. Для диференціації культур різних видів мікобактерій, що вирости на середовищі ВЛАКОН може бути використана методика реакції аглютинації (РА) на склі з наступним фарбуванням і мікроскопуванням, що дозволяє диференціювати культури людського й бичачого видів, які вирости на середовищі ВЛАКОН від пташиного виду й атипичних мікобактерій.

Література

1. Власенко В.В., Власенко И.Г., Василенко С.П., Колодій С.А., Лысенко А.П. Патоморфологические реакции, вызванные артроспорами микобактерий туберкулеза// Вісник морфології. - 2006. - №12(1). - С. 46-48.
 2. Власенко В.В. Туберкулез в фокусе проблем современности. - Винница: Наука, 1998. - 223 с.
 3. Колос Ю., Стець В., Титаренко В., Зелінський М., Якубчак О., Хоменко В. До питання діагностики туберкульозу в тварин// Ветеринарна медицина України - 2006. - №11. - С. 10-12.
 4. Овдиенко Н. П., Найманов А. Х., Солодова И.В. // Ветеринарная патология. - 2004. - № 1-2. - С. 51-54.
 5. Мікробіологічні методи обстеження хворих на туберкульоз: Методичні рекомендації МОЗ (на підставі нових даних про особливості біологічного розвитку *M.tuberculosis*). - Київ, 2001. - 23 с.
 6. Лысенко А.П., Лемиш А.П., Власенко В.В., и др. Изучение термической устойчивости микобактерий туберкулеза. // Проблемы туберкулеза и болезней легких . - 2007. - № 2. - С. 42-45.
 7. Raviglione M. // Intern. J. Tubercul. Lung Dis. - 2001. - Vol. 5, N 11. - Suppl. 11. - P. 7-8.
-

Summary

Results of comparative analysis of detection of mycobacteria of tuberculosis using bacterioscopy by Cil-Nilson, cultural examination on Lovenshtein-lensen eggs-environs and expeditious method (VLAICON environ). It was estimated better results of VLAICON environ using: decreasing the time of analysis, increasing effectiveness comparatively with Lovenshtein-lensen environ, decreasing the period of extralungs forms of tuberculosis verification, increasing sensitivity and decreasing period of bacteriology diagnostics in oligo- and abacillus tuberculosis patients.