

# ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

© Колодій С.А., 2013  
УДК 619:616.982.2

С.А. Колодій

## ДЕТЕКЦІЯ ЗБУДНИКА ТУБЕРКУЛЬОЗУ ПРИСКОРЕНИМ МЕТОДОМ

Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова

Наведені результати виявлення мікобактерій туберкульозу з використанням бактеріоскопії за Ціль-Нільсеном, культурального дослідження на яєчних середовищах і прискореного методу (використання середовища Влакон).

Доведено, що використання запропонованого поживного середовища має такі переваги: підвищується чутливість і результативність діагностики, диференціація культур різних видів мікобактерій за допомогою реакції аглютинації на склі з наступним фарбуванням і мікроскопією, скорочується тривалість діагностики туберкульозу.

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

На початку XXI століття у зв'язку зі зміною умов та способу життя людей, розвитком медико-санітарної допомоги виросли темпи еволюції мікроорганізмів і спричинених ними у людей захворювань. Не став винятком збудник туберкульозу. Властивості збудника постійно змінюються під впливом різноманітних несприятливих чинників, тому існує гостра потреба в поліпшенні методів діагностики, профілактики та лікування туберкульозу. Безконтрольне вживання хіміотерапевтичних препаратів привело до селекції і поширення антибіотикостійких варіантів з множинною лікарською стійкістю.

Туберкульоз, на жаль, залишається глобальною небезпекою. Ця недуга займає перше місце в структурі смертності від інфекційних хвороб. З 1995 р. епідемія цього захворювання була зареєстрована в Україні [1]. У нашій країні туберкульоз багатьма авторами вважається не тільки медичною, але і соціальною проблемою, і становить національну небезпеку. Ця недуга руйнує суспільний устрій країни, охоплюючи найбільш та найуразливіші прошарки населення [2].

Вдосконалення методів діагностики і лікування хворих на туберкульоз залежить від подальшого розвитку бактеріологічних методів дослідження. Виявлення мікобактерій туберкульозу має вирішальне зна-

чення при бактерійному підтвердженні діагнозу туберкульозу [3, 4].

Велике значення надається виявленню не лише типових, але і змінених форм мікобактерій, розкриттю біологічних властивостей збудника і особливостей його взаємовідношення з макроорганізмом [4, 5].

Отже, використання сучасних методів у вивченні біології мікобактерій туберкульозу, їх застосування у поєднанні рутинних та найновіших експрес-методів допоможе покращити мікробіологічну діагностику туберкульозу.

З метою покращення діагностики туберкульозу розроблено поживне середовище зі стимулятором росту для прискореного виявлення збудників туберкульозу під назвою Влакон.

### Матеріали і методи

Для визначення ефективності середовища використовували культури мікобактерій: *M. tuberculosis H37 Rv* (колекція ПІСК ім. Л.А. Тарасевича), *M. bovis 8*, *M. bovis BCG*, *M. avium 2282* (колекція 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 за загальноприйнятою методикою і додавали їх в 1 мл стимулятора росту мікобактерій, а отриману суспензію гомогенізували електромагнітною мішалкою протягом 15 хв. У подальшому з робочої суспензії готували розведення в стимуляторі росту (1:10) і термостатували при температурі 37 °С 48 год. Для визначення ростових якостей контрольних середовищ МПБ, МПА використовували *S. epidermidis* (1225).

Поживне середовище Влакон зі стимулятором росту використовували для прискореного виявлення збудника туберкульозу. Середовище розфасовано по 100,0; 250,0; 500,0 г. Стимулятор росту розлито по 5,0; 100,0; 200,0 мл. Середовище Влакон зберігали у герметично закритій упаковці з відносною вологістю не більше 60,0 % при температурі від 5 до 25 °С. Термін придатності середовища Влакон 18-24 місяці.

## ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Середовище Влакон використовували 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.

Поживне середовище – дрібнодисперсний, гігроскопічний порошок кремового кольору. Для приготування середовища Влакон готували наважку у кількості, зазначеній на етикетці, розмішували в 1,0 л стерильної дистильованої води, кип'ятили 2-3 хв до повного розплавлення агару, фільтрували через ватно-марлевий фільтр, розливали у відповідний посуд, стерилізували при  $(121,0 \pm 1,0)$  °C протягом 15 хв шляхом автоклавовання.

Готове середовище жовтого забарвлення з рН  $7,2 \pm 0,2$ , використовували протягом одного місяця за умови зберігання його при  $(6,0 \pm 2,0)$  °C. Перед посівом живильне середовище розплавляли на водяній бані, розливали в асептичних умовах у стерильні чашки Петрі шаром 6-8 мм (доза 18-20 мл).

До 5,0 мл стимулятора росту додавали в асептичних умовах за допомогою стерильного шприця 1,0-1,5 мл підготовленого інфікованого матеріалу. Відбір і підготовку матеріалу здійснювали за загальноприйнятою методикою бактеріологічних досліджень згідно Наказу МОЗ України № 45-2002 та чинної методичної рекомендації МОЗ [2]. Стимулятор росту забезпечував виділення мікобактерій з крові без її попередньої обробки. Отриману суспензію інкубували у термостаті при температурі  $(37,0 \pm 1,0)$  °C протягом 24-48 год і висівали на поживне середовище.

В чашку Петрі зі свіжорозплавленим живильним середовищем вносили 1,5 мл суспензії (інфікований матеріал у стимуляторі росту), рівномірно розподіляючи її по всій поверхні. Чашки Петрі не перевертали, герметизували прозорою липкою стрічкою та інкубували при  $(37,0 \pm 1,0)$  °C протягом 10 діб. Посіви вивчали щоденно. Візуально виявляли характерний ріст мікобактерій через 48-72 години.

З отриманих культур готували мазки і фарбували їх за методом Ціль-Нільсена. Для визначення видової належності збудників туберкульозу, вирощених на середовищі Влакон, використовували метод зараження гвінейських 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 (контроль).

Через 71 добу після зараження проводили забій і патологоанатомічний розтин тварин. У тварин із серця відбирали проби крові в стерильні пробірки з гепарином, додавали рівний обсяг стимулятора росту й по-

міщали в термостат при 37-38 °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-Нільсеном. 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 органа на живильні середовища Левенштейна-Йенсена, МПА, МПБ. Також суспензію кожного органа 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-Нільсена.

Для диференціації культур різних видів мікобактерій, що виросли на середовищі Влакон, ми апробували методику реакції аглютинації (РА) на склі з наступним фарбуванням і мікроскопуванням, запропоновану А. Лисенко [5]. 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-Нільсеном, але без дофарбовування метиленовим синім, і мікроскопували.

### Результати досліджень та їх обговорення

Вивчення ростових якостей запропонованого середовища проводили в порівнянні з яєчним середовищем Левенштейна-Йенсена, МПА, МПБ (контроль) (табл. 1).

З результатів досліджень видно, що на середовищі Влакон ріст культур референтних штамів *M. tuberculosis H37Rv*, *M. bovis 8*, *M. avium 2282*, *M. bovis BCG* спостерігали на 2-4-у добу у вигляді круглих напівпрозорих колоній сіро-білих кольорів, іноді з жовтуватим відтінком, що зливалися на 5-6-у добу. При зворотному пересіванні із середовища Влакон на середовище Левенштейна-Йенсена без малахітового зеленого було отримано ріст культур усіх 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 досліджуваному середовищі протягом 2-4 діб й пофарбованих за Ціль-Нільсеном, спостерігали коки, овоїди, прямі й вигнуті палички різної величини, груше-, амебоподібні форми з порожнім центром і зернистістю – рожевого або червоно-фіолетового кольору. У мазках цих культур

## ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

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 даному середовищі підтверджена їх здатність трансформуватися в класичні форми збудника.

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 і інактивованих через 71 добу, виявлені патологоанатомічні зміни, характерні для туберкульозу.

Таблиця 1

Результати досліджень росту тест-штамів мікобактерій на контрольних і дослідному середовищах (M±m)

Вид бактерій	К-ть проб на одне середовище	Результати росту культур на поживних середовищах							
		МПБ		МПА		середовище Левенштейна-Йенсена		середовище Влакон (дослідне)	
		факт.	%	факт.	%	факт.	%	факт.	%
<i>M. tuberculosis</i> H37 Rv	10	немає росту	-	немає росту	-	$42,0 \pm 0,4$ 10	100	$3,0 \pm 0,58^*$ 10	100
<i>M. bovis</i> 8	20	немає росту	-	немає росту	-	$40,0 \pm 0,93$ 20	100	$4,0 \pm 0,88^*$ 20	100
<i>M. avium</i> 2282	10	немає росту	-	немає росту	-	$41,0 \pm 0,49$ 10	100	$2,0 \pm 0,58^*$ 10	100
<i>M. bovis</i> BCG	12	немає росту		немає росту	100	$35,0 \pm 0,9$ 12	100	$2,0 \pm 0,56^*$ 12	100
<i>S. epidermidis</i> (1225)	10	$1,0 \pm 0,49$ 10	100	$1,0 \pm 0,53$ 10	100	немає росту	-	немає росту	-

Примітки: \* –  $p < 0,001$  порівняно з показниками середовища Левенштейна-Йенсена (контроль). Чисельник – кількість діб, коли отримали ріст на посівах; знаменник – кількість проб.

Мікроскопія мазків-гомогенатів показала в препаратах клітини рожево-червоного кольору, коки дрібні, великі з порожнім центром; палички короткі й довгі із зернами по полюсах, прямі й вигнуті та палички рубіно-червоного кольору. При посіві гомогенатів від гвінейських свинок і кролів на середовище Влакон спостерігали ріст на 2-4-у добу у вигляді дрібних круглих напівпрозорих колоній сіро-білих кольорів, іноді з жовтуватим відтінком, що зливалися до 5-6 діб у газон.

При мікроскопії мазків культур 6-15 добового росту, що виростили з патматеріалу на даному середовищі, 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 досліджуване середовище 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 виростили 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 бичачо-

го типів із середовища Влакон чітко аглютинувались антисироваткою до *M. bovis* і не аглютинувались негативною сироваткою крові ВРХ. Демонстративність РА на склі підвищувалася при фарбуванні за Ціль-Нільсеном, 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. Сукупність усіх складових середовища Влакон, які об'єднані єдиним творчим задумом, дозволяє одержати технічний результат, а саме скоротити тривалість бактеріологічного 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 синергійний ефект, який обумовлює скорочення тривалості інкубування матеріалу з одночасним підвищенням чутливості методу, і як результат – значне скорочення тривалості бактеріологічних досліджень.

## ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Стимулятор росту активізує натрій-калієві насоси і деякі ферменти мікобактерій, що стимулює адаптивні структури і сприяє швидкому проростанню у вигляді поліморфних клітин, що мають загальні антигени з бацилярними формами збудника туберкульозу та ідентичні ділянки ДНК. Слід визнати, що відомі ультрадрібні, кокоподібні, не кислотостійкі та інші форми – не лише результат реакції збудника до факторів імунної системи чи дії хіміотерапевтичних препаратів, але і закономірні етапи, в яких класична бацила Коха є лише одною з стадій життєвого циклу збудника туберкульозу.

### Висновки

1. Середовище Влакон із стимулятором росту дозволяє на 2-4-у добу виявити ріст збудника туберкульозу людського, бичачого типів як референтних штамів, так і з досліджуваного матеріалу, крові тварин, заражених збудником туберкульозу.

2. Морфологія клітин у культурах збудника туберкульозу людського, бичачого й пташиного типів, вирощених на середовищі Влакон і Левенштейна-Йенсена, не має відмінності.

3. Для диференціації різних типів мікобактерій, що виростили на середовищі Влакон, доцільно в подальшому використовувати реакцію аглютинації на склі з наступним фарбуванням і мікроскопуванням, що дозволяє диференціювати людський і бичачий типи.

### Література

1. Визначення ефективності середовища Влакон для діагностики туберкульозу / [В.В. Власенко, Г.К. Палій, І.Г. Власенко та ін.] // Biomedical and Biosocial Anthropology. – 2012. – № 18. – С. 8-12.

2. Патоморфологические реакции, вызванные артроспорами микобактерий туберкулеза / [В.В. Власенко, И.Г. Власенко, С.П. Василенко и др.] // Вісник морфології. – 2006. – № 12 (1). – С. 46-48.

3. Баранов Б.Б. Применение методов молекулярной биологии для исследования микобактерий туберкулеза / Б.Б. Баранов, А.О. Марьяндышев // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2008. – № 4. – С. 3-7.

4. Мікробіологічне обґрунтування методу прискороного виявлення збудника туберкульозу / [Ю.Л. Волянський, І.Г. Власенко, С.А. Колодій та ін.] // Biomedical and Biosocial Anthropology. – 2010. – № 15. – С. 91-95.

5. Изучение термической устойчивости микобактерий туберкулеза / [А.П. Лысенко, А.П. Лемиш, В.В. Власенко и др.] // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2007. – № 2. – С. 42-45.

## DETECTION OF TUBERCULOSIS AGENT BY SPEED-UP METHOD

S.A. Kolodiy

*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 ( VLACON environ). It was estimated better results of VLACON 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.*

**Key words:** tuberculosis, mycobacteria, methods of detection.

Отримано 17.06.2013 р.