

УДК 619:576.8.078:616-025

Власенко В.В., д.б.н., професор**Войціцька О.М.**, аспірант ©

E-mail: vlasenkovanya@mail.ru

Вінницький національний аграрний університет, м. Вінниця

**КОНСТРУЮВАННЯ НОВОГО ЖИВИЛЬНОГО СЕРЕДОВИЩА
ДЛЯ ПРИСКОРЕНОГО ВИДІЛЕННЯ ЗБУДНИКА ТУБЕРКУЛЬОЗУ**

Вважається, що одним з найбільш чутливих методів виділення збудника туберкульозу з матеріалу є культуральний, тому що дає можливість отримати результат навіть при малій кількості мікобактерій у досліджуваному матеріалі.

Термін появи росту культури збудника на класичних середовищах становить від 3-х тижнів до 3-х місяців. Тому створення нових поживних середовищ, які б дозволили скоротити термін інкубації, являється актуальним завданням, тому що прискорює кінцеву постановку діагнозу шляхом виділення збудника, що надзвичайно важливо для подальших дій стосовно профілактики та лікування хвороби.

Наведено результати розробки нового щільного середовища та порівняльного дослідження ростових якостей розробленого поживного середовища зі стимулятором росту та традиційного середовища Левенштейна-Єнсена. Встановлено, що швидкість росту мікобактерій на розробленому середовищі вища порівняно з традиційними середовищами, що дає змогу скоротити термін інкубації матеріалу у 30-90 разів. Культури мікобактерій під час культивування на запропонованому середовищі зберігають тинкториальні, культуральні та патогенні властивості.

Розроблене нами середовище застосовують для прискореного виявлення мікобактерій туберкульозу. Додатково до нього у наборі додається стимулятор росту мікобактерій, який являє собою стерильну, прозору, безбарвну рідину, що містить макро- та мікроелементи.

Ключові слова: мікобактерії, поживні середовища, бактеріоскопія, прискорені методи виявлення мікобактерій, культуральна діагностика, конструювання поживних середовищ, прискорений ріст збудника туберкульозу, терміни інкубації, ростові властивості.

УДК 619:576.8.078:616-025

Власенко В.В., д.б.н., професор**Войцицкая О.М.**, аспірантка

Вінницький національний аграрний університет, г. Вінниця

**КОНСТРУИРОВАНИЕ НОВОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ ДЛЯ
УСКОРЕННОГО ВЫДЕЛЕНИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗ**

Считается, что одним из наиболее чувствительных методов выделения возбудителя туберкулеза из материала является культуральный, так как дает

возможность получить результат даже при малом количестве микобактерий в исследуемом материале.

Срок появления роста культуры возбудителя на классических средах составляет от 3-х недель до 3-х месяцев. Поэтому создание новых питательных сред, позволяющих сократить срок инкубации, является актуальной задачей, так как ускоряет конечную постановку диагноза путем выделения возбудителя, что чрезвычайно важно для дальнейших действий в отношении профилактики и лечения болезни.

Приведены результаты разработки новой плотной среды и сравнительного исследования ростовых качеств разработанной питательной среды со стимулятором роста и традиционной среды Левенштейна - Йенсена. Установлено, что скорость роста микобактерий на разработанной среде выше по сравнению с традиционными средами, что позволяет сократить срок инкубации материала в 30-90 раз. Культуры микобактерий при культивировании на предложенном среде сохраняют типичные, культуральные и патогенные свойства.

Разработанную нами среду применяют для ускоренного выявления микобактерий туберкулеза. Дополнительно к ней в наборе прилагается стимулятор роста микобактерий, представляющий собой стерильную, прозрачную, бесцветную жидкость, содержащую макро- и микроэлементы.

Ключевые слова: микобактерии, питательные среды, бактериоскопия, ускоренные методы выявления микобактерий, культуральная диагностика, конструирование питательных сред, ускоренный рост возбудителя туберкулеза, сроки инкубации, ростовые свойства.

UDC 619:576.8.078:616-025

Vlasenko V.V., Doctor of Biological Sciences, Professor

Voitsitskaya O.M., graduate student

Vinnitsia National Agrarian University, Vinnitsa, Ukraine

DEVELOPMENT OF A NEW BREEDING GROUND FOR RAPID RELEASE MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS

It is believed that one of the most sensitive methods for the isolation of Mycobacterium tuberculosis material is cultural, as well as an opportunity to get results even with a small number of mycobacteria in the test material. Release date culture growth of the pathogen in classical environments ranging from 3 weeks to 3 months. The creation of new culture media that would allow shorten the incubation is an urgent task because the faster the final diagnosis by isolating the pathogen, which is extremely important for further action in relation to the prevention and treatment of disease.

The results of developing a new dense medium and a comparative study of growth characteristics developed culture medium with growth promoters and conventional Lowenstein- Jensen medium. It was established that the rate of growth of mycobacteria in developed environment is higher in comparison to traditional media, so you can shorten the incubation material in 30-90 times. Culture of mycobacteria during cultivation on the proposed store tynktoryalni environment, cultural and pathogenic properties.

We have developed an environment is used for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis. In addition to it enclosed in a set of mycobacterial growth stimulator , which is a sterile , clear, colorless fluid containing macro and micronutrients.

Key words: *mycobacteria, culture media, bacterioscopy, accelerated methods for detection of mycobacteria culture diagnosis, construction of culture media, rapid growth of Mycobacterium tuberculosis, the timing of incubation, growth properties.*

Вступ. На сьогоднішній день існує велика кількість бактеріологічних прийомів для виявлення мікобактерій туберкульозу в біологічному матеріалі. Однак мікробіологічна діагностика займає одне з головних місць і є основою для подальших методик в процесі постановки діагнозу [1].

Вважається, що одним з найбільш чутливих методів виділення збудника туберкульозу з матеріалу є культуральний, бо дає можливість отримати результат навіть при малій кількості мікобактерій в досліджуваному матеріалі.

Деякі дослідники [2] висказали гіпотезу, відповідно до якої швидкість росту збудника туберкульозу залежить від його генотипу і його прискорення можливе тільки при його штучній зміні, що мало ймовірно. Перспективним напрямом в даній ситуації може бути конструювання нових поживних середовищ, які б завдяки своєму складу давали можливість прискорити ріст збудника.

Термін появи росту культури збудника на класичних середовищах становить від 3-х тижнів до 3-х місяців. Тому створення нових поживних середовищ, які б дозволили скоротити термін інкубації, є актуальним завданням, бо прискорює кінцеву постановку діагнозу шляхом виділення збудника, що надзвичайно важливо для подальших дій стосовно профілактики та лікування хвороби.

Також однією з причин низької ефективності боротьби з захворюванням тварин та людей є застаріле уявлення про біологію збудника туберкульозу, оскільки останнім часом всі науково-дослідні розробки з проблем туберкульозу проводились на мікобактеріях, що знаходились на заключній стадії біологічного розвитку, яка є найбільш захищеною і стійкою до різних факторів впливу.

Протягом тривалого періоду вивчення збудників туберкульозу ссавців були накопиченні дані про значний поліморфізм мікобактерій. Однак через складності культивування і виявлення змінених форм збудника туберкульозу, ці дані не знайшли достойного практичного застосування. Завдяки дослідженням В.В. Власенко (1998) і розробці поживного середовища ВКГ з'явилась можливість культивування і виявлення збудника туберкульозу зі зниженою життєздатністю і ферментативною активністю [3]. Встановлено, що на поживному середовищі ВКГ мікобактерії туберкульозу проходять декілька морфологічно відмінних стадій розвитку – фільтрувальні форми, шароподібні, амебоподібні утворення, коки і поліморфні палички, які не фарбуються за Ціль-Нільсеном [4,5].

Матеріал і методи. Дослідження проведені у проблемній лабораторії з вивчення туберкульозу Вінницького національного аграрного університету.

Основними методичними прийомами постановки дослідів були підбір різних поживних компонентів в оптимальних концентраціях, які б за допомогою свого складу давали можливість прискорити ріст колоній збудника на новому експериментальному середовищі. Окрім вивчення хімічного складу експериментальних компонентів, також брали до уваги їх органолептичні показники, а саме: досліджували як кожен з компонентів розчиняється у дистильованій воді, який вигляд має середовище після змішування всіх компонентів у сухому вигляді, рН середовища після розчинення у воді, його прозорість.

Основним критерієм була оцінка ростових якостей середовища після внесення нового компоненту порівняно із контрольним середовищем. Контрольним слугувало середовище Левенштейна-Єнсена.

Для дослідження ростових якостей розробленого середовища використовували тест-культури *M. tuberculosis*H37Rv (колекція РИСК ім. Л. А.Тарасевича), *M. bovis* 8, *M. bovis*BCG, *M. avium* 2282 (колекція ВГНКИ), які висівали з ліофілізованого стану спочатку на середовище Левенштейна – Єнсена. Біомасу досліджуваних штамів мікобактерій з поверхні середовища Павловського знімали в кількості 1 мг за загальноприйнятою методикою і вносили їх в 1 мл стимулятора росту.

Отриману суспензію гомогенізували електромагнітною мішалкою протягом 15 хв. У такий спосіб отримували робочі суспензії, які в подальшому розводили в стимуляторі росту у співвідношенні 1:10, ставили на 48 год. у термостат при температурі 36-37 С, а потім у кількості 1,0 мл засівали газомом на розроблене середовище. Контролем служило середовище Левенштейна – Єнсена, посів на яке проводили загальноприйнятою методикою. Для контролю якості середовищ використовували тест-культуру *Staphylococcus epidermidis* 1225.

Розроблене нами середовище застосовують для прискореного виявлення мікобактерій туберкульозу. Додатково до нього у наборі додається стимулятор росту мікобактерій, який представляє собою стерильну, прозору, безбарвну рідину, що містить макро- та мікроелементи. Для приготування запропонованого середовища брали наважку сухого середовища у кількості 90 г, вносили в 1 л стерильної дистильованої води, кип'ятили 2-3 хв. До повного розчинення агару, фільтрували через ватно-марлевий фільтр, розливали у флакони і стерилізували при 121 ± 1.0 С протягом 15 хв. в автоклаві.

Готове середовище мало жовте забарвлення з рН $7,2 \pm 0,2$. Перед використанням середовище розплавляли на водяній бані й розливали по 18-20 мл у стерильні чашки Петрі діаметром 90 мм.

Крім тест-мікроорганізмів для дослідження якості середовищ використовували біологічний матеріал від гвінейських свинків з експериментальною мікобактеріальною інфекцією. Забір і підготовку

біологічного матеріалу для бактеріологічних досліджень здійснювали за загальноприйнятими методами.

Підготовлений до посіву біологічний матеріал у кількості 1,0 мл за допомогою стерильного шприца вносили у стимулятор росту, інкубували у термостаті за температури $37,0 \pm 1,0$ С протягом 24-48 год. Після цього 1,0 мл наносили на поверхню поживного середовища, розлитого у чашки Петрі. Рівномірно розподіляли по її площі, чашки поміщали в поліетиленові пакети і не перевертаючи інкубували при $37,0 \pm 1,0$ С впродовж 10 діб. Паралельно зазначену кількість біологічного матеріалу висівали на середовище Левенштейна – Єнсена. Чашки з посівами продивлялись щоденно, візуально визначали і підраховували характерні для мікобактерій колонії. З отриманих культур готували препарати і фарбували їх за методом Ціль – Нільсена.

Для відтворення морфологічної картини туберкульозу проводили модельні досліди на морських свинках і кролях методом внутрішньочеревного введення культур мікобактерій, виділених з біологічного матеріалу і вирощених на розробленому середовищі. Контрольних тварин заражали суспензією культур *M. tuberculosis*H37Rv, *M. bovis* 8, які вирощували на запропонованому середовищі.

Через 41 добу після зараження виводили тварин з досліду і виконували їм патологоанатомічний розтин. Із серця відбирали проби крові у стерильні пробірки з гепарином, додавали рівний об'єм стимулятора росту і поміщали в термостат при 37-38 С на 24 год., потім висівали на розроблене поживне середовище, МПА і МПБ. З культур, що вирости на розробленому середовищі, готували препарати для мікроскопії та фарбували їх за Ціль – Нільсеном.

Для подальшого дослідження від морських свинок відбирали пахові лімфовузли, печінку, селезінку й легені, а від кролів – лише печінку, селезінку і легені. Патологічний матеріал обробляли за А. Алікаєвою і суспензію кожного органа висівали на середовище Левенштейна – Єнсена. Також суспензію кожного органа обробляли стимулятором росту, після чого висівали на запропоноване середовище. Облік якості і швидкості росту культур на середовищах проводили щодня протягом перших 5 діб, далі – з інтервалом 5 діб до закінчення терміну інкубації. З отриманих культур готували препарати для мікроскопії і фарбували їх по методу Ціль – Нільсена.

Мікробіологічні дослідження проводили відповідно Наказу №45 МОЗ України.

Результати дослідження. Вивчення ростових якостей запропонованого середовища проводили порівняно з яечним середовищем Левенштейна – Єнсена. Результати досліджень приведено у табл. 1.

Як видно з табл. 1, на розробленому середовищі на 2-4 добу культивування почали реєструвати ріст культур референтних штамів *M. tuberculosis*H37Rv, *M. bovis*, *M. avium* 2282, *M. Bovis*BCG, які дали ріст у вигляді напівпрозорих колоній сіро-білого кольору, іноді з жовтуватим

Таблиця 1

**Порівняльна кількісна характеристика ростових якостей середовища
Левенштейна – Єнсена і розробленого середовища.**

Тест-мікроорганізм	Кількість проб	Термін реєстрації росту мікобактерій на середовищах, доба		
		Левенштейна-Єнсена	Розроблене	P
M. tuberculosis H37Rv	10	42±0,4	3±0,58	<0,001
M. bovis 8	15	40±0,93	4±0,88	<0,001
M. avium 2282	10	41±0,49	2±0,58	<0,001
M. bovis BCG	12	35±0,9	2±0,56	<0,001
S. epidermidis	10	Ріст відсутній	Ріст відсутній	

Колонії зливалися і до 5 – 6 доби давали суцільний ріст на поверхні агаризованого середовища. При пересіві отриманих на даному середовищі культур середовище Левенштейна-Єнсена без малахітового зеленого досліджувані штами мікобактерій зберігали тинкторіальні та морфологічні ознаки.

Слід зазначити, що на запропонованому середовищі темпи росту досліджуваних штамів мікобактерій перевищували такі на традиційному середовищі Левенштейна-Єнсена у 10-20 разів. При мікроскопії препаратів, виготовлених з культур M. Tuberculosis H37Rv, M. bovis 8, M. Bovis BCG, M. avium 2282, які вирости на цьому середовищі протягом 2-4 діб, пофарбованих за Ціль-Нільсеном, спостерігали характерні для мікобактерій коки, овоїди, амебоподібні форми з порожнім центром і зернистістю рожевого або червоно-фіолетового кольору.

У забарвлених препаратах цих самих культур, які культивували на розробленому середовищі, виявляли коки, диплококи, тетракоки, овоїди. Велику кількість паличок різної величини із зернистістю, що засвідчує їхню здатність до трансформації у морфологічні форми клітин, які спостерігали також за тривалого культивування досліджуваних штамів на класичному середовищі.

Таким чином, результати вивчення тинкторіальних і морфологічних ознак мікобактерій, які росли на досліджуваних середовищах, вказують на придатність розробленого середовища для культивування мікобактерій. Крім того, можливість реєстрації росту досліджуваних мікроорганізмів вже на 2-4 добу культивування на даному середовищі може бути використано для вирішення питання можливої прискореної діагностики туберкульозу.

Встановлення ідентичності за чинниками патогенності мікобактерій, вирощених на розробленому і традиційному середовищах, проводили *in vivo* при відтворюванні інфекційного процесу при зараженні лабораторних тварин. В яких, при подальшому патолого-анатомічному розтині, виявляли характерні для туберкульозу зміни в органах, а при бактеріологічному дослідженні виділяли збудника туберкульозу.

Таким чином, попереднє оброблення патологічного матеріалу у стимуляторі росту, а також сукупність усіх складових запропонованого середовища дає змогу отримати позитивний результат, а саме: скоротити термін бактеріологічних досліджень на туберкульоз.

Висновки.

1. Запропоноване середовище просте у приготуванні, що дає змогу заощадити час на підготовці до дослідження.

2. Ріст тест-культур збудників туберкульозу людського, бичачого видів як референтних штамів, так і з патологічного матеріалу на запропонованому середовищі зі стимулятором росту спостерігається на 2-4 добу.

Прискорене виявлення мікобактерій туберкульозу є перспективним напрямом покращення бактеріологічної діагностики туберкульозу.

Література

1. Гольшевская В.И., Корнеев А.А., Черноусова Л.Н., Селина Л.Г., Казарова Т.А., Гришина Т.Д., Сафонова С.Г., Пузанов В.А., Николаева Г.М., Фадеева Н.И. Применение новых микробиологических технологий в диагностике туберкулеза // Проблемы туберкулеза. – 1996. - №6. – С. 45 – 47.

2. Гольшевская В.И., Фадеева Н.И. Совершенствование методов микробиологической диагностики туберкулеза // Сб. науч. Тр. ЦНИИ туберкулеза. – М., 1987. – Т. 45. - С. 77 – 82.

3. Власенко В.В. Микробиология туберкулеза в фокусе проблем современности. – Винница: «Гипанис». – 1998 – 224 с.

4. Власенко В.В. Сучасні підходи до діагностики туберкульозу (методичні рекомендації) / В.В. Власенко, І.Г. Власенко, І.В. Березовський, та ін. – Київ: МОЗ України, 2006. – 39 с.

5. Власенко В.В. Мікробіологічна експрес-діагностика туберкульозу / В.В. Власенко, І.Г. Конопко, С. П. Василенко. – Вінниця, 2000. – С. 41-45.

Рецензент – д.б.н., професор Куртяк Б.М.