

УДК: 619:616.982.2

ДОСЛІДЖЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ СЕРЕДОВИЩА ВЛАКОН ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЬОЗУ

Колодій С.А.

Вінницький національний медичний університет
ім. М.І.Пирогова (вул. Пирогова 56, м.Вінниця,
Україна, 21018).
e-mail: svetlana.k05@mail.ru

Ситуація з захворюваністю на туберкульоз залишається загрозливою, не поліпшилась і епідеміологічна ситуація. Незважаючи на широкомасштабну профілактику, біля 2 млн. людей щорічно помирає від даної недуги і половина населення планети інфікована збудником туберкульозу [1]. Щороку в Україні виявляють 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). З 1990 по 2005 р. захворюваність на туберкульоз органів дихання зросла в 2,4 раза [2]. Слід зазначити, що від цього захворювання щорічно в Україні помирає 10-12 тис. людей [3].

До теперішнього часу прийнято, що «золотим» стандартом лабораторної діагностики туберкульозу залишається мікробіологічне дослідження, яке включає бактеріоскопію, посів на поживні середовища, дослідження мазків діагностичного матеріалу методом люмінесцентної мікроскопії; фарбування за Ціль-Нільсеном на кислотостійкі бактерії. Специфічність і чутливість бактеріоскопії достатньо низька і культуральна діагностика матеріалу займає не менше 4-8 тижнів, а негативними вважають результати при відсутності росту протягом 12 тижнів. Технології діагностики, які існують за кордоном занадто коштовні, малодоступні для широкого використання в Україні [4].

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

Мета. Дослідження властивостей живильного середовища Влаккон для прискореної детекції туберкульозу.

Матеріали та методи

Для визначення ефективності середовища використовували культури мікобактерій: *M.tuberculosis* H37 Rv (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-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. В пода-

льшому 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.epidermididis* (1225).

Поживне середовище Влаккон 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 Влаккон зберігали у герметично закритій упаковці з відносною вологістю не більше 60,0 % при температурі від 5 до 25 °С. Термін придатності середовища Влаккон 18-24 місяців.

Середовище Влаккон 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 кремовею кольору. Для приготування середовища Влаккон готували 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) °С протягом 15 хвилин шляхом автоклавування.

Готове середовище жовтого забарвлення з рН 7,2 ± 0,2, використовували протягом одного місяця за умови зберігання його при (6,0 ± 2,0) °С. 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 стимулятору росту додавали у 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 ± 1,0) °С протягом 24-48 годин 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 ± 1,0) °С протягом 10 діб. Посіви вивчали щоденно. Візуально виявляли характерний ріст мікобактерій через 48-72 годин.

З отриманих культур готували мазки і фарбували їх за методом Ціль-Нельсена. Для визначення видової належності збудників туберкульозу, вирощених на середовищі Влаккон, 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 забори 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 °С на 24 години. Потім висівали на поживні 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 Левенштейна-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 апро-

бували методику - реакцію аглютинації (РА) на склі з наступним фарбуванням і мікроскопуванням запропоновану професором 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-Нельсеном, але без дофарбовування метиленовим синім і мікроскопували.

Результати та обговорення

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

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

Назва дослідного матеріалу	кількість 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	-	$\frac{42 \pm 0,4}{10}$	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</i> BCG	12	немає росту	-	немає росту	100	$\frac{35 \pm 0,9}{12}$	100	$\frac{2 \pm 0,56^*}{12}$	100
<i>S.epidermidis</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 Левенштейна-Йенсена (контроль). Знаменник - кількість проб; а чисельник – кількість діб коли отримали ріст на посівах

З результатів досліджень, наведених в табл. 1 видно, що на середовищі ВЛАКОН ріст культур референтних штамів *M.tuberculosis* H37RY, *M.bovis* 8, *M.avium* 2282, *M.bovis* BCG спостерігали на 2 - 4 добу у вигляді круглих напівпрозорих колоній сіро-білих кольорів, іноді з жовтуватим відтінком, що зливалися на 5 - 6 добу. При зворотному пересіванні із середовища Влакон на середовище Левенштейна-Йенсена без малахітового зеленого було отримано ріст культур всіх штамів з характерною для них морфологією.

Мікроскопія мазків, приготованих з культур *M.tuberculosis* H37RV, *M.bovis* 8., *M.bovis* BCG, *M.avium* 2282, які виросли на досліджуваному сере-

довищі 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. У мазках цих 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 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 патолого-анатомічні зміни, характерні для туберкульозу.

Мікроскопія мазків-гомогенатів показала в препаратах клітини рожево-червоного кольору, коки дрібні, великі з порожнім центром; палички короткі й довгі і зернами по полюсах, прямі й вигнуті та палички рубіно-червоного кольору. При посіві гомогенатів від гвинейських 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 зливались до 5 - 6 діб в 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, фуксифілії 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 бичачого типів із середовища Влакон чітко аглютинувались антисироваткою до *M. bovis*, і не аглютинувались негативною сироваткою крові ВРХ. Демонстративність РА на склі підвищувалася при фарбуванні по Ціль-Нільсену, 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 синергічний ефект, який обумовлює скорочення тривалості інкубування матеріалу з одночасним підвищенням чутливості методу, і як результат - значне скорочення тривалості бактеріологічних досліджень.

Стимулятор росту активізує натрій-кальцієві насоси і деякі ферменти мікобактерій, що стимулює адаптивні структури і спонукає швидкому проростанню у вигляді поліморфних клітин, що мають загальні антигени з бацилярними формами збудника туберкульозу та ідентичні ділянки ДНК. Слід визнати, що відомі ультрадрібні, коковидні, 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 лише одна з стадій життєвого циклу збудника туберкульозу.

Висновки та перспективи подальших розробок

1. Середовище Влакон із стимулятором росту дозволяє на 2-4 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 культурі збудника туберкульозу людського, бичачого й пташиного типів, вирощених на середовищі Влакон і Ленвенштейна-Йенсена не має відмінності.

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.

References

1. Gupta R, Raviglione MC, Espinal MA. Should tuberculosis programmes invest in second-line treatments for multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB)? // Intern. J. Tubercul. Lung Dis. – 2001. – Vol. 5. – № 12. – P. 1078-1079.
2. Microbiological methods of the examination of patients ill on the tuberculosis: Methodical recommendations MN of Ukraine (on the basis of new data about peculiarities of biological development of *M. tuberculosis*). – Kyiv, 2001. – 23 с.
3. Pathomorphological reactions, caused by astrosporas of *Mycobacterium tuberculosis* / V. V. Vlasenko, I. G. Vlasenko, S. P. Vasylenko [et al.] // Reports of Morphology. – 2006. – № 12 (1). – С. 46-48.
4. Vlasenko V. V. Tuberculosis in the focus of modernity problems / V. V. Vlasenko. – Vinnitsa: Nauka, 1998. – 223 с.
5. The study termal resistanse of *Mycobacterium tuberculosis* / A. P. Lysenko, A. P. Lemysh, V. V. Vlasenko [et al.] // Problems of tuberculosis and lung diseases. – 2007. – № 2. – С. 42-45.

УДК: 619:616.982.2

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ СРЕДЫ ВЛАКОН ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА Колодий С.А.

В работе приведены результаты выявления микобактерий туберкулеза с использованием бактериоскопии по Циль-Нильсену, культурального исследования на яичных средах и ускоренного метода (использование среды Влакон). Показано, что использование предложенной питательной среды имеет следующие преимущества: повышается чувствительность и результативность диагностики, дифференциация культур разных видов микобактерий при помощи реакции аглютинации на стекле с последующим окрашиванием и

микроскопией, сокращается длительность диагностики туберкулеза.

Ключевые слова: туберкулез, микобактерии, методы выявления, питательные среды.

UDC: 619:616.982.2

RESEARCH OF EFFECTIVENESS OF VLACON MEDIUM FOR DIAGNOSTIC OF TUBERCULOSIS

Kolodiy S.A.

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