Войціцька О. М.,
асистент,
Вінницький національний аграрний університет
(м.Вінниця), Україна
E-mail: veterinar_l@ukr.net

ЕКСПРЕС ДІАГНОСТИКА АДАПТИВНИХ ФОРМ МІКОБАКТЕРІЙ ТУБЕРКУЛЬОЗУ

Анотація. Стаття присвячена всебічному дослідженню анатомо-морфологічних та мікробіологічних механізмів розвитку адаптивних форм мікобактерій. Наведено результати дослідження ростових властивостей нового поживного середовища АПМ-Вінтуб. Установлено, що запропоноване поживне середовище дає можливість культивувати збудника туберкульозу зі зниженою життєздатністю і за несприятливих умов. У роботі науково обґрунтовано та доведено можливість отримання швидкого росту культури мікобактерій на середовищі АПМ-Вінтуб, а також вивчення всіх стадій перетворень мікроорганізмів за умов швидкої втрати поживних речовин, тобто дії несприятливих факторів. Оптимізація живильного середовища дає можливість успішно проводити експрес діагностику адаптивних форм мікобактерій туберкульозу. На основі проведених досліджень розроблено біологічну основу бактеріологічної експрес-діагностики туберкульозу, яка і донині залишається досить трудомісткою.

Ключові слова: діагностика туберкульозу, мікобактерії, поживне середовище АПМ-Вінтуб, прискорена діагностика, мінливість мікроорганізмів, адаптивні властивості, культивування мікобактерій.

О. М. Войццкая

Ассистент, Винницкий национальный аграрный университет
(г. Винница), Украина

ЭКСПРЕСС ДИАГНОСТИКА АДАПТИВНЫХ ФОРМ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

Аннотация. Статья посвящена всестороннему исследованию анатомо-морфологических и микробиологических механизмов развития адаптивных форм микобактерий. Приведены результаты исследования ростовых свойств нового питательной среды АПМ-Винтуб. Установлено, что предложенная питательная среда дает возможность культивировать возбудителя туберкулеза с пониженной жизнеспособностью и при неблагоприятных условиях. В работе научно обоснована и доказана возможность получения быстрого роста культуры микобактерий на среде АПМ-Винтуб, а также изучено все стадии превращений микроорганизмов в условиях быстрой потери питательных веществ, то есть при действии неблагоприятных факторов. Оптимизация питательной среды позволяет успешно проводить экспресс диагностику адаптивных форм микобактерий туберкулеза. На основе проведенных исследований разработана биологическая основа бактериологической экспресс-диагностики туберкулеза, которая и по сей день остается достаточно трудоемкой.

Ключевые слова: диагностика туберкулеза, микобактерии, питательная среда АПМ-Винтуб, ускоренная диагностика, изменчивость микроорганизмов, адаптивные свойства, культивирование микобактерий.

O. M. Voytsitskaya

Assistant, Vinnytsia national agrarian university (Vinnytsia), Ukraine
E-mail: veterinar_l@ukr.net

EXPRESS DIAGNOSTICS OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS ADAPTIVE FORMS

Abstract. The problem of tuberculosis has become urgent recently. In other words, it becoming more critical nowadays. Much of this problem is associated with the slow growth of the causative agent colonies in the commonly used nutrient medium. Nowadays various methods of tuberculosis laboratory diagnostics have been developed. However, microbiological methods have not lost their relevance. The issue of new methods development for tuberculosis bacteriological diagnosis is one of the most important problems of modern life.

Mycobacteria are very resistant to the environmental factors; they are characterized by a diversity of forms, a large polymorphism and a wide range of variability of biological properties (pleomorphism). It was established that polymorphism of mycobacterium tuberculosis is caused by the survival of mycobacteria and their vital activity under adverse conditions. Different transformation mycobacteria forms are aimed to survive under adverse conditions, preserve its viability, that is, "persistence". Mycobacterium tuberculosis is a species of pathogenic bacteria first discovered by Robert Koch; it has changed greatly since its discovery. The polymorphism of the pathogens of tuberculosis is the cause of improper use of antibacterial drugs. The researchers have suggested that the mycobacterium tuberculosis polymorphism may be caused by the cyclicity of the microorganism.

The purpose. Investigation of the development stages of mycobacterium tuberculosis adaptive forms in a nutrient medium for APM-Vintub quick diagnosis under conditions of its stress factor. Methods. Theoretical generalization, laboratory-model research, microbiological analysis, calculation and analytical. **Results.** The research results on the growth properties of a new nutrient medium APM-Vintub are presented. The new nutritional medium APM-Vintub makes it possible to cultivate a pathogen of tuberculosis with reduced vitality and unfavorable conditions. **Conclusions.** The rapid growth of mycobacteria on the medium makes it possible to study all stages of the transformation of microorganisms under conditions of nutrients rapid

loss of nutrients, that is, the action of adverse factors. An improved and optimized environment provides the opportunity to inoculate biological material for the rapid diagnosis of tuberculosis.

Key words: *mycobacteria, nutritional medium APM-Vintub, express diagnostics, cultivation of mycobacteria.*

Постановка проблеми. Проблема туберкульозу останніми роками стає дедалі актуальнішою і продовжує загострюватись. Значна частина цієї проблеми пов'язана з повільним ростом колоній збудника на загальноприйнятих поживних середовищах. На сучасному етапі розроблені різні методи лабораторної діагностики туберкульозу, проте мікробіологічні методи не втратили своєї актуальності. Більше того, питання освоєння нових методів бактеріологічної діагностики туберкульозу залишається однією з важливих проблем сьогодення. Дослідження в галузі фтизіатрії, а також успіхи хіміотерапії у минулому столітті призвели до зниження кількості хворих туберкульозом. Проте останніми роками збудник туберкульозу зазнав великих морфологічних, біохімічних та інших змін, які певною мірою зумовили ускладнення діагностики та лікування туберкульозу [1, 2].

З часу відкриття палички Коха уявлення про природу і властивості збудника туберкульозу набули значних змін. Не заперечуючи повідомлень про поліморфізм збудника туберкульозу, що може бути причиною неправильного застосування антибактеріальних препаратів чи дії зовнішніх факторів, вчені висловили думку, що поліморфізм палички Коха може бути обумовлений стадіями (циклічністю) розвитку самого мікроорганізму [3, 4, 5, 6].

Мікобактерії дуже стійкі до впливу факторів навколишнього середовища, характеризуються вираженою різноманітністю форм існування, великим поліморфізмом і широким діапазоном мінливості біологічних властивостей (плеоморфізм) [7]. Мінливість мікобактерій може проявлятися у вигляді морфологічних змін (колубоподібні, дифтероїдні, галузисті, актиномікотичні та інші форми, описані І.І. Мечніковим); тинкторіальної мінливості - зміни по відношенню до барвників (не забарвлюваність за Ціль-Нільсеном, тобто втрата кислото- і спиртостійкості); культуральної мінливості - зміна форми, розміру, консистенції і кольору колоній при рості на штучних поживних середовищах; біологічної мінливості - зміна ступеня вірулентності в бік підвищення, або зниження її аж до повної втрати [8]. Різні форми трансформації переслідують мету виживання мікобактерій при несприятливих умовах, збереження життєздатності, тобто „персистування”. Збудник туберкульозу людини під впливом тривалої антибактеріальної терапії хворих зазнає суттєвих біологічних змін. Описані біологічні властивості й вивчена патогенетична роль L-форм мікобактерій туберкульозу, фільтруючих і зернистих форм збудника [9, 10].

Ще на початку ХХ століття Г. Мух, вивчаючи зерна мікобактерій туберкульозу і встановивши можливість їх самостійного існування, висловив припущення, що збудник туберкульозу існує у двох формах: у формі бацили Коха і у формі зерен, хоча пізніше було доведено, що „зерна Муха” - це лише тимчасовий, перехідний стан мікроорганізму.

Використовуючи різні методи дослідження, вчені довели [11,12], що мікобактерії туберкульозу, які фільтруються, на поживному середовищі проходять декілька стадій (форм) розвитку. При електронному дослідженні фільтрату культури збудника туберкульозу (МБТ) були виявлені круглі утворення розміром 0,12-0,15 мкм, які при сприятливих умовах збільшувались, набуваючи грушоподібної (овальної) форми [13].

Існує думка, що поліморфізм туберкульозної палички обумовлений виживанням мікобактерій та збереженням життєдіяльності при несприятливих умовах. Визначенням життєдіяльності мікобактерій при туберкульозному процесі займалися ряд авторів [14]. Деякі з них повідомляють [15], що в культурах мікобактерій більш старшого віку паличкоподібні клітини набувають коковидної форми. Коковидні форми мають такий же діаметр як і палички або в декілька разів більший, розташовуються поодинокі чи

парами, інколи з'єднані в короткі вигнуті ланцюжки.

Аналіз останніх досліджень та публікацій. В останні роки в Україні спостерігається значне збільшення захворюваності на туберкульоз і проблема мультирезистентності є основною у питанні лікування [16, 17].

Поява нових форм захворювання, висока розповсюдженість збудників із множинною лікарською стійкістю сприяли тому, що проблема туберкульозу набула масштабів надзвичайної ситуації. Враховуючи значну мінливість збудників туберкульозу під впливом фізичних факторів, визначення епідеміологічного та епізоотичного значення мікобактерій в умовах впливу на них різних стрес-факторів набуває особливої ваги.

В літературі описані результати досліджень щодо впливу електромагнітного опромінення на мікобактерії, яке прискорює ріст та розвиток культур на поживному середовищі вдвічі порівняно з контролем незалежно від температурного режиму [18]. Вивчений також вплив ультрафіолетового опромінення на виживання мікобактерій, а також на утворення ними L-форм. Дія УФ-променів відноситься до факторів, які викликають L-трансформацію бактерій [19].

Метою роботи було вивчення стадій розвитку збудника туберкульозу на поживному середовищі для прискореної діагностики АПМ-Вінтуб за умов дії на нього стрес-фактора, а саме нестачі поживних речовин, оскільки запропоноване середовище містить необхідні елементи в доступній і легкозасвоюваній формі, які за умов інтенсивного росту колоній швидко вичерпуються. Це дає змогу розглянути стадії розвитку мікобактерій за несприятливих умов, а це можуть бути як екологічні чинники, так і вплив антибактеріальної терапії.

Методика та основні результати дослідження. Дослідження проводились з використанням вакцини BCG та середовища для культивування мікобактерій АПМ-Вінтуб. Для дослідження готували суспензію вакцини шляхом змішування ліофілізату в пропорції 1:1 з ділуентом та висівали в кількості 1 мл на чашки Петрі з поживним середовищем.

Чашки Петрі з посівами поміщали в термостат при температурі 37°C, перегляд посівів проводили кожних 24 години. Через 48 годин спостерігали появу «парафінових» колоній, які мали дещо слизову консистенцію та добре знімались з поверхні поживного середовища за допомогою бактеріологічної петлі (Рисунок 1.)

Рис. 1. Ріст колоній мікобактерій на середовищі АПМ-Вінтуб

Для вивчення стадій розвитку збудника туберкульозу на поживному середовищі, за умов поступового виникнення дефіциту поживних речовин, проводили щоденну бактеріоскопію отриманої культури. Мазки готували за загальноприйнятою методикою і фарбували методом Ціль-Нільсена.

В перший день появи видимого росту, а це через 48 годин інкубації посіву, в мазках з отриманих культур виявляли велику кількість паличкоподібних мікроорганізмів (Рисунок 2.)

Рис. 2. Третя доба інкубації-ніжні фуксинофільні паличкоподібні мікроорганізми (збільшеннях1000)

На четверту добу спостерігали у багатьох паличкоподібних клітин появу включень у вигляді рисових зерен, що просвічуються, а також поодинокі гігантські круглі клітини (Рисунок 3.)

Рис. 3. Поява включень схожих на рисові зерна

На 5 добу інкубації, в мазках приготовлених з культури, спостерігалось відокремлення зерноподібного включення від паличкоподібної клітини і перетворення його в більш округлу форму, з подальшим збільшенням в розмірах (Рисунок 4.).

Рис. 4. 5 доба- велика кількість кулястих форм, що перетворюються в гігантську клітину

На сьому добу інкубації в мазках з культури спостерігаємо повну відсутність паличкоподібних форм, в полі зору – велика кількість великих кулястих форм із прозорими куля-

стими включеннями.(Рис. 5).

Рис. 5. Великі кулясті форми з коковидними включеннями

Мікроскопія мазків культури на 8 добу виявляє все поле зору вкрите прозорими коковидними формами, які знаходяться ніби то в матриці (Рис.6.)

Рис. 6. Коковидні форми в «матриці»

Якщо в цей період здійснити пересів на свіжоприготовлене поживне середовище, то цикл розвитку починається спочатку і в першу добу появи росту в мазках з культури ми виявляємо знову паличкоподібні форми, але які вже втратили кислотостійкість.

Відповідною реакцією мікобактерій на вплив стрес-фактора, а саме нестачу поживних речовин, є зміна їх морфологічних форм. Як показали результати досліджень мікобактерій з кожним днем проходили низку морфологічних змін, які можна вважати адаптивними. Мікробна клітина мала форму як палички, так і коків. Але при пересіві на свіжоприготовлене середовище культури, в будь-якій стадії, отримували знову початок розвитку від паличкоподібної типової форми.

Висновки.

Нове поживне середовище АПМ-Вінтуб завдяки біодоступності поживних речовин дає можливість культивувати збудника туберкульозу зі зниженою життєздатністю, а швидкий ріст культури мікобактерій на запропонованому середовищі дає змогу вивчати всі стадії перетворень мікроорганізмів за умов швидкої втрати поживних речовин, тобто дії несприятливих факторів.

Література

1. Біологічні властивості *M. tuberculosis*, виділених від хворих з первинною медикаментозною стійкістю / О. А. Журило, А. І. Барбова, П. С. Трофімова [та ін.] // Укр. пульм. журн.- 2005.- № 3.- С 51-53.
2. Голышевская В. И. Роль ультрамелких форм микобактерий в патоморфозе туберкулеза / В. И. Голышевская // Пробл. туберкулеза.- 2003.- № 3.- С. 26-30.
3. Власенко В.В., Компанець В.С., Кордон В.О. та ін. Біологічні аспекти збудника туберкульозу / - Вінниця; К., 1997. - С. 2.
4. Власенко В.В., Багрій П.І., Турченко Л.В., Стехін І.М. Особливості біології збудника туберкульозу та прискорений метод його виявлення // IX Конгрес Світової федерації українських лікарських товариств: (Присвячений 25-річчю СФУЛТ, 19-22 серп. 2002 р., м. Луганськ). - Луганськ, К.; Чикаго, 2002. -

C. 214-215.

5. Vlasenko V.V. New information on biologic development and diagnostics of tuberculosis agent. – Vinnitsa: Jipanis. 2002. – 60 p. (Нова інформація про біологічний розвиток і діагностику збудника туберкульозу).

6. Tower K.J. The problem of resistance M. tuberculosis // Antimicrobial Chemotherapy. – 2003. – V. 8 – P. 125-131.

7. Романенко В. Ф. Эволюция микобактерий туберкулеза и ее значение в заболевании туберкулезом людей, животных и птицы / В. Ф. Романенко // Пробл. туберкулеза и болезней легких. – 2004. – № 5. – С. 19–23.

8. Туберкульоз позалегової локалізації. / [Фещенко Ю. І., Ільницький І. Г., Мельник В. М., Панасюк О. В.] – Київ : Логос, 1998. – 379с.

9. Голышевская В. И. Роль ультрамельких форм микобактерий в патоморфозе туберкулеза / В. И. Голышевская // Пробл. туберкулеза. – 2003. – № 3. – С. 26–30.

10. L-формы микобактерий туберкулеза / Под ред. Кочемасовой З. Н. – Москва : Медицина, 1980. – 176с.

11. Власенко В.В. Микробиология туберкулеза в фокусе проблем современности. – Винница: Гипанис, 1999. – 224 с.

12. Лысенко А.П. Антигены Mycobacterium bovis и атипичных микобактерий, изучение и применение для дифференциальной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота. Автореф. дис. доктора вет. наук. – Минск. – 1994. – 35 с.

13. Власенко В.В., Седой С.Д. Вивчення молекулів збудника туберкульозу // Питання підвищення продуктивності тваринництва: Наук. пр. ВДСП. – Вінниця, ВДСП, 1997. – Вип. 4. – С. 103-106.

14. Яворська Г.В., Сибірна Р.І. Частота виділення життєздатних мікобактерій туберкульозу від хворих з різними формами туберкульозу // Мікробіол. журн., 2002. – т.64. – №1. – с. 82-86.

15. Байгазанов А.Н. Изменчивость микобактерий туберкулеза // Основные научные исследования по проблеме туберкулеза и бруцеллеза с.-х. животных, профилактика и организация мероприятий по ликвидации болезней в регионе Сибири: Тез. докл. научн. – практ. конф. – Новосибирск. – 1995. – С. 53-54.

16. Кундієв, Ю. І. Професійні інфекційні хвороби [Текст] / Ю. І. Кундієв, М. А. Андрейчин, А. М. Нагорна, Д. В. Варивончик. – Київ: ВД «Авіцена», 2014. – 529 с.

17. Lan, Z. Treatment of human disease due to Mycobacterium bovis: a systematic review [Text] / Z. Lan, M. Bastos, D. Menzies // European Respiratory Journal. – 2016. – Vol. 48, Issue 5. – P. 1500–1503.

18. Блашук В. В. Вживання (адаптогенність) мікобактерій у відходах тваринництва за впливу електромагнітного опромінення [Текст] / В. Блашук // Науковий вісник ЛНУВМБТ імені С. З. Гжицького. – 2015. – Т. 17, № 3 (63). – С. 130–133.

19. Моїсеєнко, Т. М. Визначення необхідних режимів ультрафіолетового опромінення, які запобігають виживанню Mycobacterium tuberculosis та перетворенню їх в L-форми [Текст] / Т. М. Моїсеєнко, А. Ю. Волянський, Г. О. Ковальова // Аннали Мечниковського інституту. – 2015. – № 1. – С. 60–65.

References

1. O. A. Zhurilo, A. I. Barbova, P. S. Trofimova et al. (2008). Biological properties of M. tuberculosis isolated from patients with primary drug resistance. Ukr. a bullet Journal, 2005, No. 3, pp. 51-53 (in Ukraine).

2. Golyshevskaya V.I. The role of ultrafine forms of mycobacterium in the pathomorphosis of tuberculosis. Probl. Tuberculosis. 2003, No. 3, pp. 26-30 (in Russian).

3. Vlasenko V.V., Kompanets V.S., Cordon V.O. etc. Biological aspects of the pathogens of tuberculosis / - Vinnitsa; K., 1997. - p.

4. Vlasenko V.V., Bagryi P.I., Turchenko L.V., Sttehin I.M. Features of TB biology and accelerated method of its detection / IX Congress of the World Federation of Ukrainian Medical Associations: (Dedicated to the 25th anniversary of the SFULT, Aug. 19-22, 2002, Luhansk). - Lugansk, K.; Chicago, 2002. - P. 214-215.

5. Vlasenko V.V. New information on biologic development and diagnostics of tuberculosis agent. – Vinnitsa: Jipanis. 2002. – 60 p.

6. Tower K.J. The problem of resistance M. tuberculosis // Antimicrobial Chemotherapy. – 2003. – V. 8 – P. 125-131.

7. Romanenko V.F. The evolution of mycobacterium tuberculosis and its importance in tuberculosis treatment of people, animals and birds. Probl. Tuberculosis and Pulmonary Diseases, 2004, no. 5, pp. 19-23 (in Russian).

8. Feshchenko Yu.I., Il'nitsky I.G., Melnyk V.M., Panasyuk O.V. et al (1998). Tuberculosis of extrapulmonary localization. Kyiv: Logos, 1998. 379 p. (in Ukrainian).

9. Golyshevskaya V.I. The role of ultrafine forms of mycobacterium in the pathomorphosis of tuberculosis. Probl. Tuberculosis, 2003, no, pp. 26-30. (in Russian)

10. Kochemasova Z. N. (1980). L-forms of mycobacterium tuberculosis. Moscow: Medicine, 1980. 176 p. (in Russian)

11. Vlasenko V.V. (1999). Microbiology of tuberculosis in the focus of modern problems. Vinnitsa: Hypanis, 1999. 224 p. (in Ukrainian)

12. Lysenko A.P. Antibodies of Mycobacterium bovis and atypical mycobacteria, study and application for differential diagnostics of bovine tuberculosis. Dr. vet sci. diss. Minsk, 1994. 35 p. (in Russian).

13. Vlasenko V.V., Sedoy S.D. (1997). Studying the molucites of the micobacterium tuberculosis. Issues of raising the productivity of livestock: Sciences VDSP. Vinnytsya, 1997, no. 4. pp. 103-106. (in Ukrainian)

14. Yavorskaya G.V., Sibirna R.I. (2002). The frequency of the release of viable mycobacterium tuberculosis from patients with various forms of tuberculosis. Microbial. Journal, 2002, no.1, pp. 82-86. (in Russian)

15. Baygazanov A.N. (1995). Variability of mycobacterium tuberculosis // Basic scientific research on the problem of tuberculosis and brucellosis. animals, prevention and organization of measures for the elimination of diseases in the region of Siberia: Tez. doc. scientific - practice conf. Novosibirsk, 1995, pp. 53-54. (In Russian)

16. Y. I. Kundiev, M.A. Andreichin, A. M. Nagomaya, D. V. Varivonchik. (2014). Professional infectious diseases. Kyiv: Avicenna Airlines, 2014. 529 p. (in Ukrainian).

17. Z. Lan, M. Bastos, D. Menzies (2016). Treatment of human disease due to Mycobacterium bovis: a systematic review. European Respiratory Journal. 2016, no. 5. pp. 1500–1503.

18. Blaschuk V.V. Survival (adaptogenicity) of mycobacterium in livestock wastes due to exposure to electromagnetic radiation. Scientific Bulletin of LNUWMB named after S.Z. Gzhytsky. 2015, Ti. 17, No. 3 (63). pp. 130-133. (in Ukrainian)

19. Ti. M. Moiseenko, A. Yu. Volyansky, G. A. Kovalev (2015). Determination of the necessary modes of ultraviolet radiation that prevent the survival of Mycobacterium tuberculosis and transformation into L-shaped. Annals Mechnikov Institute, 2015, no. 1, pp. 60-65. (in Ukrainian)