

УДК 619:616.982.2

Войціцька О.М., асистент
Вінницький національний аграрний університет

ВИВЧЕННЯ ПАТОГЕННОСТІ МІКОБАКТЕРІЙ ТУБЕРКУЛЬОЗУ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ ТУБЕРКУЛІНУ НА СЕРЕДОВИЩІ АПМ-ВІНТУБ

Mycobacterium tuberculosis – вид патогенних бактерій, вперше виявлений Робертом Кохом; уява про бактерії сильно змінилася з моменту відкриття. Поліморфізм збудників туберкульозу є причиною неправильного застосування антибактеріальних препаратів. Дослідники припустили, що поліморфізм мікобактерій туберкульозу може бути викликаний циклічністю мікроорганізму.

Нині найбільш вживаним методом лабораторної діагностики туберкульозу є мікробіологічне дослідження матеріалу - бактеріоскопія і посів на поживні середовища. Бактеріоскопічний метод дослідження й тепер є одним з основних. Перевага цього методу в його швидкості. Однак специфічність і чутливість бактеріоскопії досить низькі.

Із культуральних методів дослідження найчастіше практикують посів патологічного матеріалу на такі яєчні середовища, як Левенштейна-Єнсена, Фінна-2 та ін. Бактеріологічна діагностика туберкульозу і донині є досить трудомісткою. Окрім того, що ріст колоній з'являється через значний термін – це від 3 тижнів до 3 місяців, то ще й епізоотична ситуація ускладнилась поліморфізмом збудника туберкульозу. Відомі досі поживні середовища почали втрачати свою діагностичну цінність.

Мікобактерії дуже стійкі до факторів навколишнього середовища; вони характеризуються різноманітністю форм, великим поліморфізмом та широким діапазоном мінливості біологічних властивостей (плеоморфізм). Мінливість мікобактерій можна спостерігати у морфологічних змінах; тинкторіальній мінливості, змінами забарвлення (барвник не Ціль-Нільсена, тобто втрата кислото-спирто стійкості); культурна мінливість, зміна форми, розміру, консистенції та кольору колоній на штучних поживних середовищах; біологічна мінливість, зміна ступеня вірулентності в бік збільшення або зменшення її до повної втрати.

У статті приведено результати дослідження нового поживного середовища АПМ-Вінтуб та можливість культивування на ньому адаптивних форм збудника туберкульозу.

Ключові слова: діагностика туберкульозу, мікобактерії, туберкулін, поживне середовище АПМ-Вінтуб

Рис. 1. Табл. 1. Літ. 10.

Постановка проблеми. Проблема туберкульозу останніми роками стає дедалі актуальнішою і продовжує загострюватися у всьому світі. Значна частина цієї проблеми пов'язана з мінливістю збудника, яка ускладнює діагностику хвороби загальноприйнятими бактеріологічними методами.

Мікобактерії туберкульозу володіють широким поліморфізмом, який є однією з найбільш характерних особливостей даного виду мікроорганізмів. Збудники можуть бути типової форми або зміненої, зокрема L-форма дуже дрібна – фільтрувальна.

L-форми мікобактерій уперше були виділені та описані у 1945 році. У вітчизняній науці великий внесок у вивчення проблеми L-трансформації мікроорганізмів зробили М.А. Пешков [1], В.Д. Тимаков, Г.Я. Каган [2],

С.В. Прозоровський [3] т. ін.

Інші адаптивні форми мікобактерій туберкульозу найменш вивчені, проте потребують підвищеної уваги з боку науковців, тому що їх вивчення є вкрай важливим на сучасному епідеміологічному рівні.

Аналіз останніх досліджень і публікацій. За даними деяких авторів, перетворення мікобактерій на L-форми відбувається під впливом захисних сил макроорганізму [4, 5], несприятливого впливу факторів зовнішнього середовища та під дією антимікобактеріальних засобів.

Однією з особливостей L-форм мікроорганізмів є здатність до реверсії, тобто процесу відновлення бактеріальною клітиною свого вихідного виду.

Природа механізму індукції L-форм мікобактерій, їх стабілізації та можливої реверсії із L-форм на вегетативні форми мікобактерій дотепер остаточно не визначена. Існують припущення, згідно з якими утворення L-форм варто розглядати як своєрідний процес формування високо резистентних варіантів мікобактерій у відповідь на шкідливі агенти; утворення L-форм варто вважати стадією життєвого циклу збудників.

З часів відкриття L-форм бактерій минуло багато. Однак саме останнім часом дана проблема набула великого практичного значення. Це пов'язано в першу чергу із широким застосуванням у лікувальній практиці хіміотерапевтичних препаратів. Їх специфічна дія на збудника захворювання викликає глибокі порушення в біології мікробної клітини, одним із проявів яких є перетворення останніх на L-форми [6].

Складною ситуація із L-трансформацією є не лише в медицині, а й у ветеринарії. Ефективність ветеринарних протитуберкульозних заходів залежить від своєчасної й точної діагностики захворювання, яка базується на алергічних, бактеріологічних та патолого-анатомічних методах дослідження. Як основний метод прижиттєвої діагностики туберкульозу ВРХ застосовують алергічний.

Останніми роками в благополучних щодо туберкульозу господарствах нерідко виявляють тварин, які реагують на туберкулін. Однак при їх патолого-анатомічному дослідженні не виявляють характерних для туберкульозу уражень, а при бактеріологічному дослідженні біоматеріалу не виділяють збудника туберкульозу [7].

Дослідження деяких науковців [8] вказують на те, що при культуральному дослідженні матеріалу від таких тварин вдається виділити мікобактерії в L-формі. Але для проведення таких досліджень потрібні зовсім інші умови, ніж для виявлення –R та –S-форм мікобактерій.

Сьогоднішні накопичено багато даних про мінливість збудника та наявність адаптивних форм. Однак ці дані не набули практичного застосування через складність культивування і виявлення змінених форм. Завдяки дослідженням В.В. Власенка і розробці поживного середовища ВКГ, з'явилась така можливість [9]. Середовище ВКГ дало змогу виявляти збудника

туберкульозу зі зниженою життєздатністю та ферментативною активністю.

Також встановлено, що мікобактерії туберкульозу на вказаному середовищі проходять декілька стадій розвитку – фільтрувальні форми, шароподібні, амебоподібні утворення, коки і поліморфні палички [9]. У роботах В.В. Власенка доведено цикл розвитку мікобактерій, де описані форми представлені у вигляді стадій артроспори, дроблення, ділення, статевої та вегетативної.

Дослідженнями науковців доведена наявність у туберкулінах світлозаломлюючих, некислотостійких зерен, які, як вважається, містять життєздатні елементи мікобактерій туберкульозу [10].

Враховуючи те, що туберкулін вводять людині і тваринам, він, безумовно, не повинен містити патогенних клітин.

Метою роботи було дослідити можливість культивування на середовищі АПМ-Вінтуб адаптивних форм мікобактерій і одночасно перевірити ППД-туберкулін для ссавців на стерильність.

Об'єкт та методика досліджень. Дослідження проводились з використанням ППД-туберкуліну для ссавців. Для дослідження готували туберкулін шляхом змішування його в пропорції 1:1 зі стимулятором росту та інкубації за температури 37°C протягом 48 годин.

Після закінчення терміну інкубації проводили посів туберкуліну в кількості 1 мл на свіжоприготовлене середовище АПМ-Вінтуб.

Чашки Петрі з посівами поміщали в термостат за температури 37°C, перегляд посівів проводили кожних 24 години.

Через 48 годин інкубації на поверхні середовища з'являлось воскоподібне нашарування сіро-білого кольору, яке легко знімалось за допомогою бактеріологічної петлі.

З отриманих колоній готували мазки, які фарбували за Ціль-Нільсеном. При мікроскопії в полі зору спостерігали палички різної величини, прямі та зігнуті, із зернистістю (рис. 1).

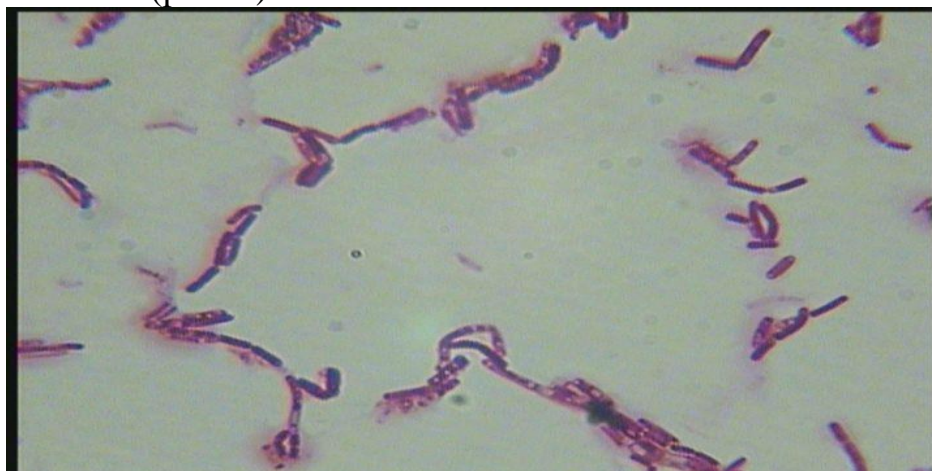


Рис. 1. Палички різної величини прямі та зігнуті, із зернистістю (фарбування за Ціль-Нільсеном, збільшення в 1000 разів)

Для підтвердження видової приналежності виявлених паличок та відтворення картини туберкульозу проводили біологічну пробу на морських свинках.

Лабораторних тварин заражали шляхом підшкірного введення. Суспензію готували змішуванням колоній, отриманих на середовищі АПМ-Вінтуб, із вазеліновим маслом у стерильних умовах.

Результати досліджень. За модельними тваринами спостерігали щоденно протягом двох місяців. Потім морським свинкам проводили туберкулінову пробу, для чого їм вводили по 0,1 мл розчину ППД-туберкуліну для ссавців. Облік результатів проводили через 24 години.

Результати досліду наведено в таблиці 1.

Таблиця 1

Реакція сенсibiliзованих морських свинок на туберкулінізацію

№з/п	Вага свинок до зараження,г	Вага свинок після зараження,г	Розмір еритеми, мм
1	380	360	23
2	310	285	28
3	345	335	0
4	370	365	0
5	320	315	0

Із таблиці 1 видно, що морські свинки, заражені суспензією колоній із середовища АПМ-Вінтуб після посіву туберкуліну, були сенсibiliзовані і реагували на введення туберкуліну чітко вираженою еритемою на місці ін'єкції.

Висновки та перспективи подальших розробок. 1. Нове поживне середовище АПМ-Вінтуб зі стимулятором росту дає змогу культивувати збудника туберкульозу зі зниженою життєздатністю.

2. Діагностичний препарат ППД-туберкулін для ссавців містить адаптивні форми збудника туберкульозу, які за сприятливих умов здатні трансформуватись на патогенні та спричинити захворювання на туберкульоз.

Перспективою досліджень є удосконалення розробленого середовища і вивчення можливості посіву на нього біологічного матеріалу для прискореної діагностики туберкульозу.

Список використаної літератури

1. Пешков М.А. О так называемых L-формах бактерий. Микробиология, 1954. Т. 23. С. 607-628.
 2. Тимаков В.Д., Каган Г.Я. Биология L-форм бактерий. Москва. Медгиз, 1961. 235 с.
 3. Прозоровский С.В. Проблемы патогенности L-форм бактерий и микоплазм: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Москва, 1970. 24 с.
 4. Ильина Т.Я., Жингиреев А.А., Сидоренко О.А. Особенности бактериовыделения и чувствительности микобактерий туберкулеза к химиопрепаратам у больных с рецидивами туберкулеза. *Проблемы туберкулеза и болезней легких*. 2008. № 5. С. 20-22.
 5. Прозоровский С.В. Проблемы патогенности L-форм бактерий и микоплазм:
-

- автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Москва, 1970. 24 с.
6. Mattman L.H., Tunstall L.H., Mathews W.W., Cordon D.L. L-variation in mycobacteria. *Amer. Rev. resp. Dis.*, 1960, v. 82. P. 202-211.
 7. Палій А.П. Епізоотологічний моніторинг туберкульозу великої рогатої худоби та науково-експериментальне обґрунтування розробки і застосування засобів дезінфекції: автореф. дис. ... д-ра. вет. наук. Харків, 2013. 40 с.
 8. Завгородній А.І., Палій А.П., Стегній Б.Т. та інші. Біологічні властивості L-форм мікобактерій, виділених із біоматеріалу. *Ветеринарна медицина України*. 2014. № 11. С. 9-12.
 9. Власенко І.Г. Детекція збудника туберкульозу в системі крові: монографія. Вінниця. Едельвейс, 2009. С. 36.
 10. Лысенко А.П., Лемиш А.П., с соавт. Выявление адаптивных форм микобактерий в туберкулизах. *Современные проблемы инфекционной патологии человека. Сборник научных трудов*. Вып. 1. Минск. Белпринт. 2008. С.227-230.

References

1. Peshkov, M.A. (1954). *O tak nazyvaemykh L-formakh bakteriyi [About the so-called L-forms of bacteria]*. *Microbiology*, V. 23, N. 5. S. 607-628 [in Russian].
2. Timakov, V.D., & Kagan, G.Ya. (1961). *Biology of L-forms of bacteria [Byolohyia L-form bakteriyi]*. M.: Medgiz [in Russian].
3. Prozorovsky, S.V. (1970). *Problemy patohennosti L-form bakteriyi y mykoplazm [Problems of the pathogenicity of L-forms of bacteria and mycoplasmas]*. Moscow [in Russian].
4. Ilyina, T.Ya., Zhingreev A.A., Sidorenko O.A. (2008). *Osobennosti bakteryyovydeleniya y chuvstvytelnosti mykobakteriyi tuberkuleza k khymyopreparatam u bolnykh s retsydyvamy tuberkuleza lehkykh [Features of bacterial excretion and sensitivity of mycobacterium tuberculosis to chemotherapy in patients with relapse of pulmonary tuberculosis]* T.Ya. Ilyina,. *Problems of tuberculosis and lung diseases № 5*. S. 20-22. Moscow [in Russian].
5. Prozorovsky, S.V. (1970). *Problemy patohennosti L-form bakteriyi y mykoplazm [Problems of the pathogenicity of L-forms of bacteria and mycoplasmas]*. Moscow [in Russian].
6. Mattman, L.H., Tunstall, L.H., Mathews, W.W., & Cordon, D.L. (1960). *L-variation in mycobacteria [L-variation in mycobacteria]*. *Amer. Rev. resp. Dis.*, v. 82, p. 202-211 [USA].
7. Paliy, A.P. (2013). *Epizootolohichniy monitorynh tuberkulozu velykoi rohatoi khudoby ta naukovo-eksperymentalne obgruntuvannia rozrobky i zastosuvannia zasobiv dezinfektsii [Epizootological monitoring of tuberculosis of great horned thinness and scientific and experimental research and development of knowledge and disinfection]*. Kharkiv [in Ukrainian].
8. Zavgorodniy, A.I., Paliy, A.P., & Stegnyy B.T. (2014). *Biolohichni vlastyivosti L-form mikobakterii, vydilenykh iz biomaterialu [Biological power of L-forms microbacterium, species of biomaterial]*. *Veterinary medicine of Ukraine*. N. 11. S. 9-12. [in Ukrainian].
9. Vlasenko, I.G. (2009). *Detektsiia zbudnyka tuberkulozu v systemi krovi [Detection of an intestine of tuberculosis in the blood system]*. Vinnitsya: Edelweiss [in Ukrainian].
10. Lysenko, A.P., Lemish, A.P., et al. (2008). *Vyiyavlenye adaptyvnykh form mykobakteriyi v tuberkulynakh [Identification of adaptive forms of mycobacteria in tuberculins]*. *Modern problems of human infectious pathologies. Collection of scientific papers*. V. 1. Minsk: «Belprint» p. 227-230. [in Ukrainian].

АННОТАЦИЯ
ИЗУЧЕНИЕ ПАТОГЕННОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ
ТУБЕРКУЛИНА НА СРЕДЕ АПМ-ВИНТУБ

Войцицкая О.Н., ассистент

Винницкий национальный аграрный университет

Mycobacterium tuberculosis – вид патогенных бактерий, впервые обнаруженный Робертом Кохом; представление о бактерии сильно изменилось с момента открытия. Полиморфизм возбудителей туберкулеза является причиной неправильного применения антибактериальных препаратов. Исследователи предположили, что полиморфизм микобактерий туберкулеза может быть вызван цикличностью микроорганизма.

Сейчас наиболее применяемым методом лабораторной диагностики туберкулеза является микробиологическое исследование материала - бактериоскопия и посев на питательные среды. Бактериоскопический метод исследования и теперь является одним из основных. Преимущество этого метода в его скорости. Однако специфичность и чувствительность бактериоскопии достаточно низкие.

С культуральных методов исследования чаще всего практикуют посев патологического материала на такие яичные среды, как Левенштейна-Йенсена, Финна-2 и др. Бактериологическая диагностика туберкулеза и по сей день является достаточно трудоемкой. Кроме того, что рост колоний появляется через значительный срок – это от 3 недель до 3 месяцев, то еще и эпизоотическая ситуация усложнилась полиморфизмом возбудителя туберкулеза. Известные до сих пор питательные среды начали терять свою диагностическую ценность.

Микобактерии очень устойчивы к факторам окружающей среды; они характеризуются разнообразием форм, большим полиморфизмом и широким диапазоном изменчивости биологических свойств (плеоморфизм). Изменчивость микобактерий можно наблюдать в морфологических изменениях; тинкториальной изменчивости, изменениями окраски (краситель не Цель-Нильсена, то есть потеря кислото- спирто устойчивости) культуральная изменчивость, изменение формы, размера, консистенции и цвета колоний на искусственных питательных средах; биологическая изменчивость, изменение степени вирулентности в сторону увеличения или уменьшения ее к полной потере.

В статье приведены результаты исследования новой питательной среды АПМ-Винтуб и возможность культивирования на ней адаптивных форм возбудителя туберкулеза.

Ключевые слова: диагностика туберкулеза, микобактерии, туберкулин, питательная среда АПМ-Винтуб

Рис. 1. Табл. 1. Літ. 10.

ANNOTATION
PATHOGENICITY STUDY OF TUBERCULOSIS MYCOBACTERIUM ISOLATED FROM
TUBERCULIN ON APM-VINTUB MEDIUM

Voitsitskaya O.N., Assistant

Vinnitsia National Agrarian University

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.

Nowadays the most commonly used method of tuberculosis laboratory diagnosis is microbiological examination of the material, i.e. bacterioscopy and seeding on nutrient media. The bacterioscopic method of investigation remains one of the main ones. The advantage of this method is its speed. However, the specificity and sensitivity of bacterioscopy is quite low.

Speaking about methods of research, we should mention that the the most common practice is the sowing of pathological material on such Löwenstein–Jensen medium, Finn-2 medium and others. Bacteriological diagnosis of tuberculosis is quite time-consuming. In addition to the fact that the growth of colonies occurs after a considerable period of time, ranging from 3 weeks to 3 months, the epizootic situation is complicated by the polymorphism of the tuberculosis agent. Known nutrient media began to lose their diagnostic value.

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). The variability of mycobacterium can be observed in the forms of morphological changes (described by I.I. Mechnikov); tinctorial variability, changes caused by colouring (non-Til-Nielsen dye, i.e., loss of acid and alcohol resistance); cultural variability, changes in the shape, size, consistency and color of colonies with growth in artificial nutrient media; biological variability, a change in the degree of virulence in the direction of increase, or decrease it until complete loss.

The article presents the results of the study of a new nutrient medium of APM-Vintub and the possibility of cultivation of adaptive forms of the tuberculosis pathogen on it.

Keywords: *diagnosis of tuberculosis, mycobacteria, tuberculin, nutrient medium APM-Vintub*

Fig. 1. Tab. 1. Ref. 10.

Інформація про автора

ВОЙЦИЦЬКА Олеся Михайлівна, асистент кафедри харчових технології та мікробіології, Вінницького національного аграрного університету (вул. Сонячна 3, м. Вінниця, Україна, 21008, e-mail: veterinar_1@ukr.net)

ВОЙЦИЦКАЯ Олеся Михайловна, ассистент кафедры пищевых технологий и микробиологии, Винницкий национальный аграрный университет (ул. Солнечная 3, г. Винница, Украина, 21008; e-mail: veterinar_1@ukr.net)

VOITSITSKAYA Olesya, Assistant Professor of the Department of Food Technologies and Microbiology, Vinnitsa National Agrarian University (st. Sunny 3, Vinnitsa, Ukraine, 21008; e-mail: veterinar_1@ukr.net)