

УДК: 619:616.982.2

Войціцька О.М., асистент
Вінницький національний аграрний університет

ВИВЧЕННЯ КУЛЬТУРАЛЬНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НОВОГО ПОЖИВНОГО СЕРЕДОВИЩА

Проблема туберкульозу останніми роками стає дедалі актуальнішою і продовжує загострюватись. Значна частина цієї проблеми пов'язана з повільним ростом колоній збудника у загальноприйнятих поживних середовищах, а отже бактеріологічна діагностика туберкульозу і донині залишається досить трудомісткою. Окрім того, що ріст колоній з'являється через значний термін – від 3 тижнів до 3 місяців, то ще й епізоотична ситуація ускладнилась поліморфізмом збудника туберкульозу. Відомі донині поживні середовища почали втрачати свою діагностичну цінність.

На сьогодні накопичено багато даних про мінливість збудника та наявність адаптивних форм. Однак ці дані не знайшли практичного застосування через складність культивування і виявлення змінених форм. Бактеріологічні дослідження мають надзвичайно важливе значення в системі виявлення хворих на туберкульоз і є одним із основних критеріїв у постановці діагнозу.

У статті приведено результати порівняльного дослідження ростових якостей розробленого поживного середовища зі стимулятором росту та традиційного середовища Левенштейна-Єнсена. Установлено, що темпи росту мікобактерій на розробленому середовищі у 10-20 разів вищі порівняно з традиційними середовищами.

Ключові слова: мікобактерії, поживні середовища, бактеріологічна діагностика, культивування

Табл. 1. Літ. 5.

Постановка проблеми. В умовах напруженої епідеміологічної ситуації, яка склалася в Україні [1], особливо гостро постала проблема швидкої та якісної діагностики туберкульозу. У зв'язку з цим питання вдосконалення бактеріологічних досліджень для діагностики туберкульозної інфекції є особливо актуальним [2].

Нині найбільш уживаним методом лабораторної діагностики туберкульозу є мікробіологічне дослідження матеріалу – бактеріоскопія і посів на поживні середовища. Бактеріоскопічний метод дослідження залишається одним із основних. Перевага цього методу в його швидкості. Однак специфічність і чутливість бактеріоскопії досить низькі.

Оскільки при прямій бактеріоскопії мазка, забарвленого за Ціль-Нільсеном, мікобактерії туберкульозу можуть бути виявлені тільки за дуже великої їхньої кількості – 5000-10000 бактеріальних клітин і більше в 1,0 мл патологічного матеріалу. Варто також зазначити, що пряма мікроскопія не дає можливості віддиференціювати кислотостійкі сапрофітні бактерії від туберкульозних [3].

Із культуральних методів дослідження найчастіше практикують посів

патологічного матеріалу на середовище Левенштейна-Єнсена, Фінна-2 та ін.

Середовище Левенштейна-Єнсена рекомендоване ВООЗ для всіх координаційних лабораторій.

Однак необхідно відзначити, що існують фактори, які обмежують широке застосування методу культивування, а саме повільне розмноження мікобактерій туберкульозу і, як наслідок, необхідність довго чекати результатів дослідження.

Культуральний метод діагностики туберкульозу займає не менше 4-8 тижнів, а негативними вважаються результати за відсутності росту протягом 12 тижнів [4, 5].

Для вдосконалення діагностики туберкульозу в Україні розроблено поживне середовище «АПМ-Вінтуб» для прискореного виявлення збудника туберкульозу.

Мета, об'єкт та методика дослідження. Метою роботи було вивчення культуральних властивостей розробленого поживного середовища. Обґрунтування застосування його для прискореної діагностики туберкульозу великої рогатої худоби.

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, потім на середовище Павловського. 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 розчиняли у стимуляторі росту у співвідношенні 1:10, ставили на 48 год. у термостат при температурі 37-38°C, а потім у кількості 1,0-1,5 мл засівали газом на розроблене середовище. Контролем служило середовище Левенштейна-Єнсена, посів на яке проводили за загальноприйнятою методикою. Для контролю якості середовищ використовували тест-культуру *Staphylococcus epidermidis* 1225.

Розроблене нами середовище застосовують для прискореного виявлення мікобактерій туберкульозу. Додатково донього у наборі додається стимулятор росту мікобактерій – стерильну, прозору, безбарвну рідину, що містить макрота 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°C протягом 15 хв. в автоклаві.

Готове середовище мало жовте забарвлення з рН 7,2±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 свинок з експериментальною мікобактеріальною інфекцією. Забір і підготовку біологічного матеріалу для бактеріологічних досліджень здійснювали за загальноприйнятими методами.

Підготовлений до посіву біологічний матеріал у кількості 1,0-1,5 мл за допомогою стерильного шприца вносили у стимулятор росту, інкубували у термостаті за температури $37,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ протягом 24-48 год. Після цього 1,5 мл наносили на поверхню поживного середовища, розлитого у чашки Петрі. Рівномірно розподіляли по її площі, герметизували прозорою липкою стрічкою та інкубували при $37,0 \pm 1,0^\circ\text{C}$ 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 та *M. bovis* 8, які вирощували на запропонованому середовищі, а також на середовищі Павловського.

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 $37-38^\circ\text{C}$ 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 за методом Ціль-Нільсена.

Результати досліджень. Вивчення ростових якостей запропонованого середовища проводили порівняно з яечним середовищем Левенштейна-Єнсена. Результати досліджень наведено у табл. 1.

Таблиця 1

Порівняльна кількісна характеристика ростових якостей середовища Левенштейна-Єнсена і розробленого середовища

Тест-мікроорганізм	Кількість проб	Термін реєстрації росту мікобактерій на		
		Левенштейна-Єнсена	АПМ-Вінтуб	P
M.tuberculosisH37Rv H37Ky	10	42±0,4	3±0,58	<0,001
M. bovis 8	20	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	

Як видно з табл. 1, на розробленому середовищі на 2-4 добу культивування почали реєструвати ріст культур референтних штамів M. tuberculosis H37Rv, M. bovis 8, M. bovis BCG, M. avium» 2282, які дали ріст у вигляді напівпрозорих колоній сіро-білого кольору, іноді з жовтуватим відтінком, що зливалися, і до 5-6 доби давали суцільний ріст па поверхні агаризованого середовища.

При пересіві отриманих на даному середовищі культурна середовище Левенштейна-Єнсена без малахітового зеленого досліджувані штами мікобактерій зберігали тинкторіальні та морфологічні ознаки.

Слід зазначити, що на запропонованому середовищі АПМ – Вінтубтемпи росту досліджуваних штамів мікобактерій перевищували такі на традиційному середовищі Левенштейна-Єнсена у 10-20 разів. Під час мікроскопії препаратів, виготовлених з культур M. tuberculosis H37Rv, M. bovis 8, M. bovis BCG, M. avium 2282, які вирости у цьому середовищі протягом 2-4 діб, пофарбованих за Ціль-Нільсеном, спостерігалися характерні для мікобактерій коки, овоїди, амебоподібні ферми 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 у класичному середовищі.

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

Установлення ідентичності за чинниками патогенності мікобактерій, вирощених у розробленому і традиційному середовищах, проводили *in vivo* при відтворенні інфекційного процесу шляхом зараження лабораторних тварин,

у яких під час подальшого патолого-анатомічного розтину 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.

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

Список використаної літератури

1. Романенко В.Ф. Эволюция микобактерий туберкулеза и ее значение в заболивании туберкулезом людей, животных и птицы. *Пробл. туберкулеза и болезней легких*. 2004. № 5. С. 19-23.
2. Власенко В.В., Компанець В.С., Кордон В.О. Біологічні аспекти збудника туберкульозу. Вінниця: К., 1997. С. 2.
3. Про затвердження інструкції з бактеріологічної діагностики туберкульозу: Наказ МОЗ України від 06.02.2002 р. С. 10-12.
4. 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.
5. Журило О.А., Барбова А.І., Трофімова П.С. Біологічні властивості *M. tuberculosis*, виділених від хворих з первинною медикаментозною стійкістю. *Укр. пульм. журн.* 2005. № 3. С 51-53.

References

1. Romanenko V.F. (2004) Evoliutsyia mykobakteryi tuberkuleza y ee znachenye v zabolyvanyu tuberkulezom liudei, zhyvotnykh y ptytsi [The evolution of mycobacterium tuberculosis and its importance in tuberculosis treatment of humans, animals and birds]. *Probl. tuberkuleza y boleznei lehkykh – Tuberculosis and Pulmonary Diseases*, 5, 19-23 [in Ukrainian].
 2. Vlasenko, V.V., Kompanets, V.S., & Kordon, V.O. (1997). *Biolohichni aspekty zbudnyka tuberkulozu* [Biological aspects of the pathogens of tuberculosis]. Vinnytsia [in Ukrainian].
 3. Pro zatverdzhennia instruktсии z bakteriologichnoi diahnostryky tuberkulozu [About approval of the instruction on bacteriological diagnosis of tuberculosis] Nakaz MOZ Ukrainy vid 06.02.2002, 10-12.
 4. Iavorska H.V., & Sybirna R.I. (2002) Chastota vydilennia zhyttiezdatsnykh mikobakterii tuberkulozu vid khvorykh z riznyimi formamy tuberkulozu [Frequency of release of viable mycobacterium tuberculosis from patients with different forms of tuberculosis]. *Mikrobiologichnui. Zhurnal – Microbiological journal*, 1, 82-86 [in Ukrainian].
-

-
5. Zhurylo, O. A., Barbova, A. I., & Trofimova, P. S. (2005) *Biologichni vlastyvoli M. tuberculosis, vydilenykh vid khvorykh z pervysnoiu medykamentoznoi stiikestiu* [Biological properties of *M. tuberculosis* isolated from patients with primary drug resistance]. Kharkiv: Ukrainian pulmonary magazine [in Ukrainian].
-

АННОТАЦИЯ
ИЗУЧЕНИЕ КУЛЬТУРАЛЬНЫХ СВОЙСТВ НОВОЙ ПИТАТЕЛЬНОЙ СРЕДЫ

Войцицкая О.М., ассистент
Винницкий национальный аграрный университет

Проблема туберкулеза в последние годы становится все более актуальной и продолжает накаляться. Значительная часть этой проблемы связана с медленным ростом колоний возбудителя на общепринятых питательных средах, а следовательно бактериологическая диагностика туберкулеза и по сей день остается достаточно трудоемкой. Кроме того, что рост колоний появляется через значительный срок – от 3 недель до 3 месяцев, то еще и эпизоотическая ситуация усложнилась полиморфизмом возбудителя туберкулеза. Известные питательные среды начали терять свою диагностическую ценность.

На сегодняшний день накоплено много данных об изменчивости возбудителя и наличие адаптивных форм. Однако эти данные не нашли практического применения из-за сложности культивирования и выявления измененных форм. Бактериологические исследования имеют чрезвычайно важное значение в системе выявления больных туберкулезом и является одним из основных критериев в постановке диагноза.

В статье приведены результаты сравнительного исследования ростовых качеств разработанной питательной среды АПМ-Винтубсо стимулятором роста и традиционной среды Левенштейна-Йенсена. Установлено, что темпы роста микобактерий на разработанной среде в 10-20 раз выше по сравнению с традиционными средами.

Ключевые слова: микобактерии, питательные среды, бактериологическая диагностика, культивирование

Табл. 1. Лит. 5.

ANNOTATION
THE CULTURAL PROPERTIES RESEARCH OF A NEW NUTRIENT MEDIUM

Voitsitska O.M., Assistant Professor
Vinnytsia National Agrarian University

Recently the problem of tuberculosis has become more and more urgent and continues to worsen. This problem is caused by the slow growth of the pathogen colonies in the commonly used

nutrient medium. That's why, bacteriological diagnosis of tuberculosis remains rather laborious. Besides the growth of colonies appears after a significant period of time (from 3 weeks to 3 months). Then the epizootic situation was also complicated by the polymorphism of the tuberculosis pathogens. The known nutrient media have begun to lose their diagnostic value.

Nowadays, many data on the variability of the pathogen and the availability of adaptive forms have been accumulated. However, these data have not been found to be practical because of the difficulty of cultivating and detecting modified forms. Bacteriological studies are extremely important in the system of detection of patients with tuberculosis because they are one of the main criteria for the diagnosis.

The article presents the results of a comparative study of the growth qualities of the developed nutrient medium with growth stimulator and the traditional Levenshtein-Jensen media. It was established that the growth rate of mycobacteria in the developed environment is 10-20 times higher compared with traditional media.

Keywords: *mycobacteria, nutrient medium, bacteriological diagnosis, cultivation*

Tab. 1. Ref. 5.

Інформація про автора

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