

© Колектив авторів, 2007
УДК 6.16-002.5-053.2-07

В.В. Власенко, Г.К. Палій, І.Г. Власенко, С.А. Колодій, С.П. Василенко

ЦИКЛ РОЗВИТКУ ЗБУДНИКА ТУБЕРКУЛЬОЗУ В КРОВІ ТА ЙОГО ВІЯВЛЕННЯ

Подільський науково-дослідний центр туберкульозу, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова

Показаний цикл розвитку збудника туберкульозу в крові та запропоновано новий високоспецифічний експрес-метод для виявлення мікобактерій туберкульозу (МБТ) у мазках капілярної крові з наступним бактеріологічним підтвердженням шляхом виділення чистої культури МБТ за 2-5 діб. Цей метод дає можливість виявити збудника туберкульозу на ранній стадії захворювання, коли загальноприйнятою методикою він ще не діагностується.

Ключові слова: туберкульоз, збудник, прискорена бактеріологічна діагностика.

Немає сумніву, що сьогодні туберкульоз став ключовою проблемою не тільки для охорони здоров'я, але, певною мірою, для всього суспільства. Про це свідчить ретроспективний аналіз, що в минулому туберкульоз забирав більше життів, ніж війни, «вбивав» найкращих людей. Досить згадати імена Л. Українки, А. Чехова, С. Руданського, В. Белінського, Н. Добролюбова, Дж. Байрона, які безпосередньо «потерпіли» від туберкульозу. Якщо звернутись до творчості того ж А. Чехова, О. Дюма, І. Тургенєва, Е.М. Ремарка, Д. Верді, Д. Пучіні, де у відомих творах «головною» дієвою особою є туберкульоз, стає зрозумілим, наскільки ця проблема була актуальною в минулому і залишається сьогодні [1].

З трибуни Всесвітньої організації охорони здоров'я (ВООЗ) сказано: «Ми перебуваємо на порозі глобальної кризи в галузі інфекційних захворювань. Але жодна держава не може себе застрахувати від цієї небезпеки та не має права ігнорувати цю загрозу». Тому ВООЗ з 1993 р. проголосила туберкульоз глобальною небезпекою [2].

У 1995 р. рішенням ВООЗ в Україні було оголошено епідемію туберкульозу. Слід зазначити, що від цього захворювання щорічно в нашій країні помирає 10-12 тис. людей. На обліку в тубдиспансерах перебуває понад 700 тис. осіб (більше 1 %

населення України). Це дало підставу ВООЗ визнати, що в Україні розпочалася справжня епідемія туберкульозу. Крім сотень тисяч людей, які хворіють на туберкульоз, 30-40 % школярів, 50-70 % підлітків і молоді та доросле населення складає групу підвищеного ризику з цієї небезпечної хвороби. Отже, проблема туберкульозу в Україні – це політика, це – національна безпека, це – економіка, це – проблема всієї нації [3].

Відомий учений в галузі діагностики туберкульозу професор Б.М. Пухлик [1] здійснив розрахунки економічних збитків, які завдає туберкульоз країні щорічно. Підрахунки показали наступне.

1. Вартість виявлення 1 випадку туберкульозу методом флюорографії стаціонарним флюорографом за останні роки коливалась приблизно в межах 600-750 ум. од., пересувним флюорографом – відповідно 960-1 860 ум. од. Звичайно флюорографія пересувними установками вважається у більшості країн економічно нерентабельною і не застосовується.

2. Туберкулінодіагностика не стала в нашій країні головним методом виявлення туберкульозу серед дітей. За даними Б.М. Пухлика, в 1996 р. у Вінницькій області проведено 331 439 туберкулінових проб у дітей і при цьому виявлено 2 хворі дитини, де вартість виявлення одного випадку туберкульозу склала 24 850 ум. од. Ця картина типова для всієї України, адже при щорічному «виконанні плану» із туберкулінових проб швидкими темпами зростає захворюваність. Це означає, що є потреба переглянути технологію масової туберкулінодіагностики, яка застосовується в нашій країні.

Чому так виходить? Однією з найважливіших причин прогресуючого поширення туберкульозу є застаріле уявлення про біологію розвитку збудника та застосування туберкулінодіагностики в тваринництві, яка не може виявити всіх хворих на туберкульоз тварин. У зв'язку з цим великої

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

гостроти набула проблема своєчасного виявлення збудника туберкульозу у продуктах харчування тваринного походження. Вона водночас віддзеркалює й основні проблеми, що суттєво впливають на захворюваність і смертність людей від туберкульозу. Як відомо, збудники туберкульозу у людей і тварин належать до роду *Mycobacterium* родини *Mycobacteriaceae*, яка включає кислото- і спиртостійкі аеробні нерухомі паличкоподібні бактерії. Родина мікобактерій включає 250 видів, з яких патогенними для тварин і людини є: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. leprae*, *M. africanum*, *M. paratuberculosis*; потенційно патогенними – *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. ulcerans*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae* [4]. Звичайно, ця класифікація не є універсальною, оскільки за останні десятиліття загострилась проблема виникнення захворювань, спричинених мікобактеріями, раніше віднесеними до непатогенних або до умовно-патогенних.

3. Бактерійна діагностика звичайно потребує перегляду та удосконалення. Існуючі культуральні методи виявлення збудника туберкульозу тривалі – (30-90) діб, а методи мікроскопічної діагностики ускладнені олігобацилярністю дослідного матеріалу [5]. Закордонні ж технології діагностики досить дорогі, тому поки що малодоступні. Все це створює загрозу зараження людей МБТ при використанні м'яса та субпродуктів, отриманих від інфікованих і хворих тварин, й становить велику епідеміологічну небезпеку для суспільства, що веде до зростання масштабів захворювання.

У зв'язку з олігобацилярністю збудника туберкульозу нами запропоновано метод прямої мікроскопії мазка крові інфікованих чи хворих людей та тварин і виявлення стадій розвитку МБТ в системі крові.

Метою роботи було вивчити стадії розвитку збудника туберкульозу в системі крові з метою розробки методу для прискореної діагностики туберкульозу.

Матеріали і методи

Оскільки мікроскопія є найбільш доступним і швидким методом виявлення мікобактерій, нами було проведено всебічне вивчення біології збудника туберкульозу на різних живильних середовищах (рідке, щільне) із застосуванням різних умов інкубації, приготування мазків з отриманих культур та їх мікроскопування. Матеріалом дослідження була кров хворих на туберкульоз людей і тварин. Отриманий мазок крові висушували. Висушені мазки спочатку фіксували, а

потім фарбували або проводили фіксацію одночасно з фарбуванням. Для фіксації використовували:

- а) метиловий спирт хімічно чистий, 3-5 хв;
- б) метиловий спирт і ацетон у рівних частинах, 3-5 хв;
- в) суміш Нікіфорова (етиловий спирт ректифікат і ефір порівну), 10-20 хв;
- г) 1 % осмієву кислоту;
- д) абсолютний етиловий спирт, 20-30 хв.

Дуже добре фіксуються мазки крові таким розчином: 5 г сірчаноокислого цинку та 5 г хімічно чистого хлористого натрію всипати у мірний циліндр або в колбу на 100 мл і додати до мітки дистильованої води. У цьому розчині мазки фіксують 2-3 хв, після чого їх відразу фарбують.

Для фарбування мазків крові готову фарбу, що надходить у продаж, розводили дистильованою водою, обов'язково нейтральної реакції, із розрахунку 1-2 краплі на 1 мл води безпосередньо перед фарбуванням (від тривалого зберігання розчин фарби псується). Розводили фарбу із розрахунку, приблизно, 2,5-3 мл на мазок. Наливали у призначений для цього чистий циліндр необхідну кількість дистильованої води й піпеткою або крапельницею додавали у воду стільки крапель фарби, скільки мл води взято, із розрахунку 1 крапля на 1 мл. Якщо при перевірці фарби виявилось, що потрібно взяти 3 краплі фарби на 2 мл води або 2 краплі на 1 мл, то відповідним чином вираховували необхідну кількість крапель для даної фарби. Для кращого фарбування мікобактерій на 10 мл приготовленої фарби додають одну краплю 3 % розчину фенолу.

Пофарбовані за нашою методикою мазки крові досліджували під попередньо підготовленим мікроскопом. Для дослідження найкраще підходить бінокулярний мікроскоп з імерсійним об'єктивом (x90) чи (x100) й окуляром на (x7) чи (x10). Можна користуватися й монокулярним мікроскопом, при електричному чи звичайному освітленні.

Обстежували не менше як 100 полів зору протягом 5 хв. Обстеження проводили у певній послідовності, щоб не допустити повторення. Наприклад, якщо обстеження почато у центрі лівого краю мазка (біля номера), то поворотом гвинта, обертаючого столик мікроскопа, дуже повільно послідовно обстежували весь мазок, закінчивши обстеження у центрі правого краю. Кількість полів по одній довжині мазка відповідає, як мінімум 100. Потім посували мазок вліво, щоб з'явилась можливість обстежувати наступне поле.

При мікроскопії мазка у полі зору мікроскопу з'являлись різні агенти стадій розвитку МБТ у вигляді артроспор, молікутів, коків, паличок, зеброподібних стебел тощо. Це дало можливість виявити й описати стадійність розвитку збудника туберкульозу в системі крові тварин.

Результати досліджень та їх обговорення

Виходячи з наявності характерних ознак і змін форм МБТ, біологічний цикл збудника туберкульозу

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

зу нами умовно поділено на наступні стадії розвитку, які показані на фото-тестах.

Стадія артроспори. Це круглі мікобактерійні утворення, розміром 0,12-0,15 мкм, які з'являються й існують у несприятливих умовах, а, потрапляючи у сприятливі умови, збільшуються, набуваючи грушоподібної чи овоїдної форми. Для внутрішньої структури цих клітин характерна наявність у середині амебоподібних утворень. Ці клітини, які мають в середині амебоподібні утворення (фото 1, 2), і називаються артроспорами.

У період дозрівання артроспори через звужений кінець виходять амебоподібні клітини, які не мають оболонки й можуть збільшуватись шляхом ділення чи брунькування. Клітини, що вийшли з артроспори, отримали назву молекул (фото 3), тобто клітини, котра ще не утворила стінку.

У системі крові молекул проникає в еритроцит чи захоплюється фагоцитом (фото 4) і продовжує подальший цикл розвитку. Стінка еритроцита захищає збудника від фагоцитозу, що сприяє розвитку його, так би мовити, в біологічному мішку (фото 5). Після дозрівання кокоподібних форм стінка «біологічного мішка» лізується і кокоподібні форми збудника виходять у плазму крові, де розвиваються та розносяться плином крові по всьому організму.

У подальшому розвиток кокоподібних форм мікобактерій відбувається у вигляді дроблення або ділення. На цій стадії дроблення в одній кокоподібній клітині, яка збільшується, може утворюватися три й більше перетинок, що ділять клітину на декілька нерівномірних частин, з яких надалі формуються самостійні кокоподібні й овоїдні клітини.

Ділення – це наступна стадія розвитку *M. tuberculosis*. Суть стадії полягає в тому, що кокоподібна клітина ділиться порівну не зовні, а всередині клітини без змін зовнішньої структури стінки. Всередині клітини утворюються дві половинки, які в майбутньому переходять у самостійні дочірні клітини і за зовнішньою формою нагадують маленький пиріжок (фото 9-12). У кожній дочірній клітині з'являється 1-3 відростки (промені), що ростуть верхівкою у вигляді трубочки (фото 13). При дозріванні материнська клітина (пиріжок) відпадає (фото 14), а промінь, який утворився, при забарвленні за Ціль-Нільсоном, утворює характерні палички Коха, а за методом Грам-Муха – зернистість.

За несприятливих умов всередині кокоподібної клітини відбувається деструкція ядерної речо-

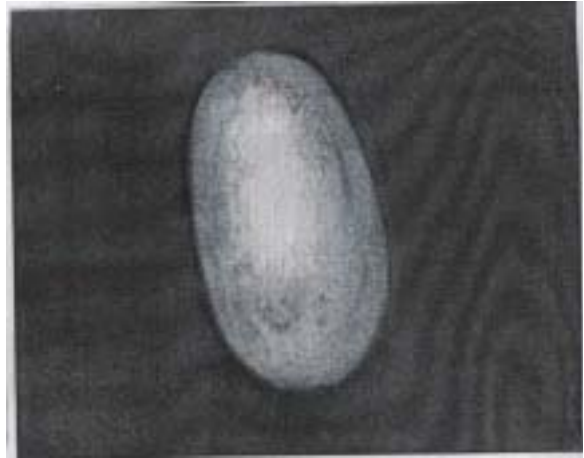


Фото 1. Загальний вид артроспори (×100 тис.).

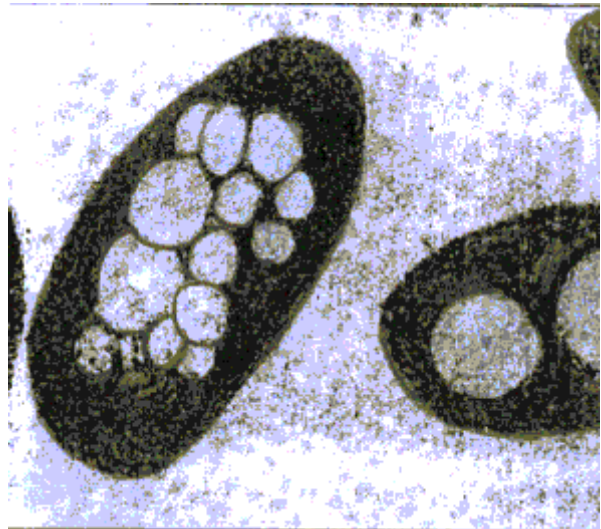


Фото 2. Розріз артроспори (×100 тис.).

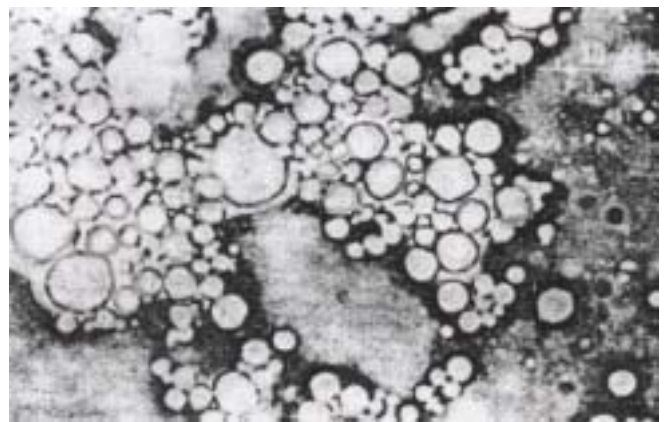


Фото 3. Розмноження молекулів діленням і брунькуванням (10×90).

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

вини і утворюються амебоподібні клітини (фото 8), тобто утворюються проартроспори (фото 9), які

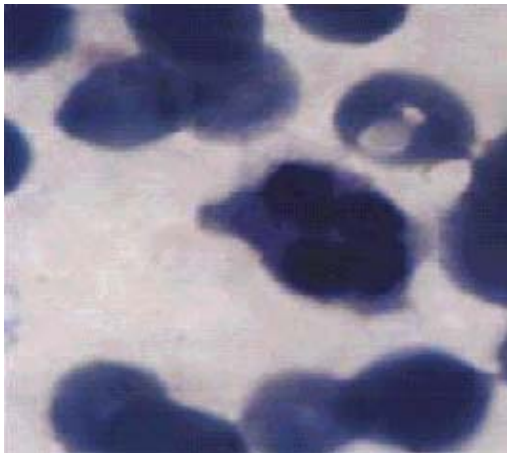


Фото 4. Проникнення молекул збудника туберкульозу в еритроцити (7×90).

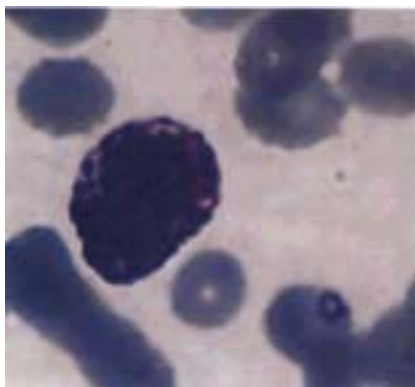


Фото 5. Розвиток кокоподібних форм збудника туберкульозу в еритроциті – «біологічному мішку» (комп'ютерна мікроскопія).

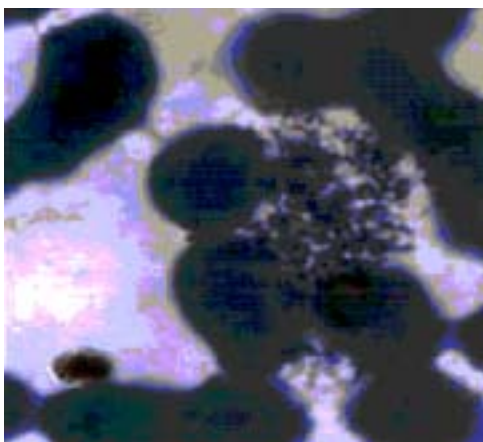


Фото 6. Лізис стінки еритроцита і вихід кокоподібних форм збудника туберкульозу (7×90).

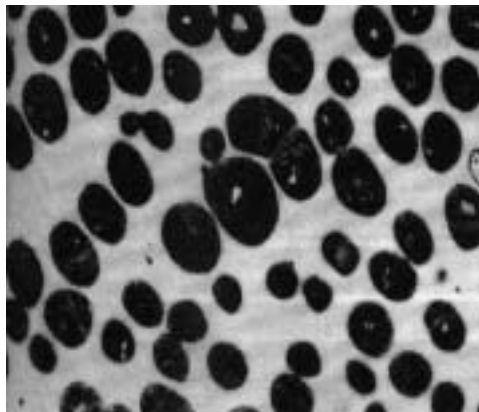


Фото 7. Розвиток кокоподібних форм у плазмі крові (комп'ютерна мікроскопія ×20 тис.).

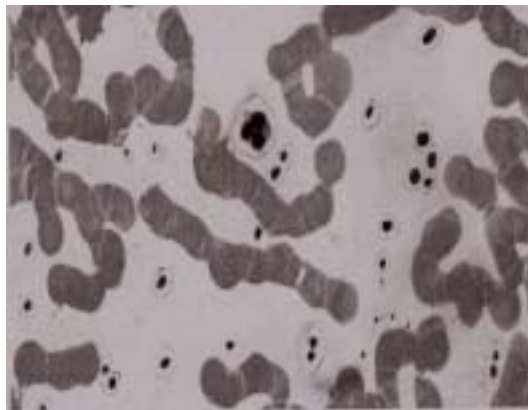


Фото 8. Кокоподібні форми в кров'яному руслі в сприятливих умовах (7×90).

зменшуються у розмірі до 0,12-0,15 мкм і переходять в артроспори (фото 10).

Після вивчення стадій розвитку збудника туберкульозу, ми приступили до розробки та впровадження сучасних мікроскопічних і мікробіологічних методів дослідження, заснованих на стадійності біологічного циклу розвитку збудника туберкульозу. Виявлення у крові агентів (стадій) мікобактерій туберкульозу вказує на скринінгову діагностику туберкульозу. Для підтвердження діагнозу необхідно від хворого виділити культуру збудника. Нами розроблено прискорений метод діагностики туберкульозу, який побудовано на новій теорії біологічного стадійного розвитку мікобактерій у крові хворого. В мазку крові при мікроскопії можна виявити стадії розвитку збудника з наступним отриманням чистої культури через 2-5 діб на живильному середовищі САМОСУМ, новизна якого захищена Патентом України [6]. Ап-

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

робацію методу проводили на базі Хмельницького обласного тубдиспансеру. Дослідження виконані на 60 зразках харкотиння і 60 зразках крові людей. Результати досліджень наведені в таблиці 1.

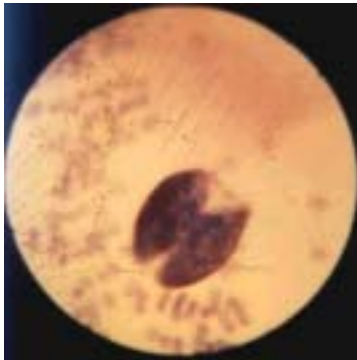
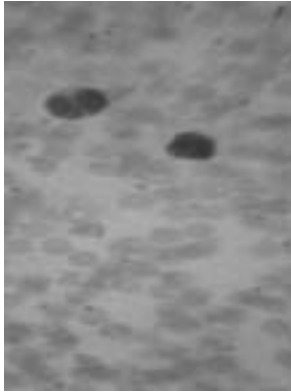


Фото 9. Стадія ділення кокоподібної клітини (7×90).

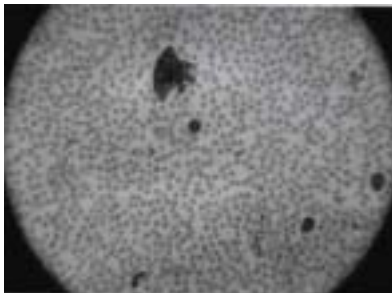


Фото 10. В кожній дочірній клітині з'являється 1-3 відростки (промені) (7×100).

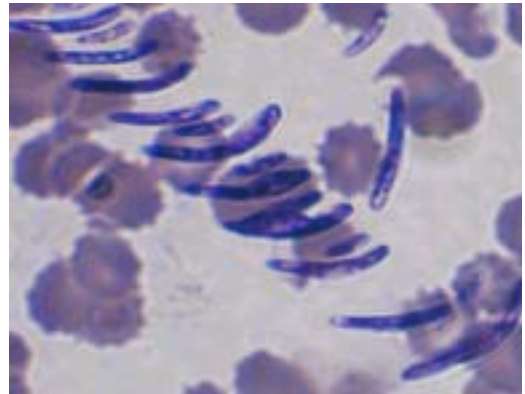


Фото 11. Фаза відпадання материнської клітини й утворення палички Коха (7×100).

Бактеріоскопічне дослідження (БК) із 30 проб харкотиння хворих на фібринозно-кавернозний туберкульоз дало 8 позитивних результатів, а бактеріологічне на яєчних середовищах – 14, прискореним методом з використанням середовища САМОСУМ – 30.

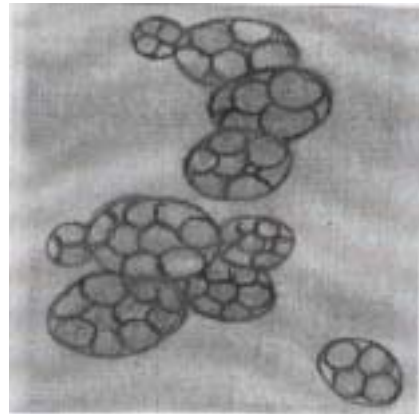


Фото 12. Перша стадія проартроспори при несприятливих умовах (7×100).



Фото 13. Проартроспора, друга стадія – зменшення в об'ємі та утворення стінки (7×100).

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ



Фото 14. Новоутворена артроспора (×80 тис.).

Клінічна форма недуги збіглася з прискореним методом дослідження в 100 % випадків. Слід зазначити, що обстеження хворих у кількості 10 осіб, які мали хронічне неспецифічне захворювання легень, прискореним методом з використанням середовища САМОСУМ дало можливість виявити одного хворого, в крові якого знаходився збудник туберкульозу в стадії розвитку. У 6 хворих серцево-судинними захворюваннями всі мікроскопічні й культуральні дослідження були негативні.

Отримавши позитивні результати лабораторно-клінічних досліджень, ми приступили до апробації методу в умовах виробництва Вінницького

Таблиця 1

Порівняльна оцінка виявлення мікобактерій туберкульозу

Клінічна форма	Кількість досліджень	Позитивні результати							
		БК		Посів на середовище Левенштейн-Єнсена		Мікроскопія мазка крові		Посів на САМОСУМ	
		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
Фібринозно-кавернозний туберкульоз	30	8	26,6	14	46,6	30	100	30	100
Туберкульозний плеврит	6	-	-	-	-	6	100	6	100
Позалегенові форми туберкульозу	8	-	-	-	-	8	100	8	100
Хронічне неспецифічне захворювання легень	10	-	-	-	-	1	10	1	10
Серцево-судинні захворювання	6	-	-	-	-	-	-	-	-

м'ясокомбінату. З метою об'єктивної оцінки для дослідження відібрали субпродукти великої рогатої худоби, хворої на туберкульоз (дослідні), та здорової – (контрольні).

Відібрані проби надалі досліджували за запропонованою методикою мікроскопічно. Для підтвердження чи виключення діагнозу проби

направлялись для бактеріологічних досліджень. У процесі роботи було досліджено мазки печінки великої рогатої худоби – по 150 проб у контрольній та дослідній групах. Результати досліджень наведені в таблиці 2. Встановлено, що зі 150 проб мазків печінки дослідної групи при мікроскопії було 12 випадків позитивних резуль-

Таблиця 2

Результати мікроскопічних і бактеріологічних досліджень печінки великої рогатої худоби

Групи печінки	Методи досліджень проб					
	комп'ютерна мікроскопія			бактеріологічні		
	всього досліджено	з позитивною реакцією	%	всього досліджено	з позитивною реакцією	%
Дослідна	150	12	8	150	12	8
Контрольна	150	-	-	150	-	-

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

татів, що становить 8 %. Бактеріологічні дослідження підтвердили аналогічні результати виділення збудника туберкульозу з проб, що дали позитивний результат при мікроскопії.

З результатів досліджень видно, що запропоновані нові підходи мікроскопічного дослідження м'яса та м'ясопродуктів дають можливість у первинних мікроскопічних дослідженнях виявити збудника туберкульозу незалежно від стадій розвитку, тоді як за загальноприйнятою методикою потрібно 30-90 діб.

Запропонований метод високоспецифічний, простий в експлуатації, не потребує значних матеріальних чи фінансових витрат, нешкідливий для людей й екологічно безпечний для довкілля.

Лабораторні дослідження відіграють основну роль у постановці діагнозу туберкульозу. Особливе диференційно-діагностичне значення має культуральний метод, який дозволяє виділити МБТ з діагностичного матеріалу і визначити їх чутливість до лікарських препаратів.

Перед яєчними середовищами САМОСУМ має ряд переваг:

- воно готується із сухих інгредієнтів, що забезпечує стабільнішу якість результатів досліджень;
- детекція мікобактерій на середовищі САМОСУМ можлива через 24-72 год;
- запропоноване середовище САМОСУМ дає змогу виділити культуру МБТ із крові без її попередньої обробки;
- діагностувати як легеневі, так і позалегенові форми туберкульозу.

Висновки

1. Для прискореної діагностики туберкульозу слід використовувати поживне середовище САМОСУМ, яке просте в приготуванні і використанні та забезпечує ефективну детекцію збудника туберкульозу.

2. Використання живильного середовища САМОСУМ дасть змогу скоротити час дослідження і підвищити результативність порівняно із середовищем Левенштейна-Єнсена.

3. Запропонований метод досліджень крові з використанням середовища САМОСУМ дозволить

скоротити період підтвердження діагнозу позалегенових форм туберкульозу.

4. Дослідження на середовищі ВЛАКОБ можуть бути використані як основний лабораторний метод, який підвищує чутливість і скорочує термін бактеріологічної діагностики в оліго- й абацитарних хворих на туберкульоз.

Література

1. Пухлик Б.М. Епідемія туберкульозу в Україні – причини і шляхи її зупинення // Ліки України. – 1999. № 7-8. – С. 10-11.
2. Москаленко В.Ф. Система охорони здоров'я в Україні: оцінка сучасної ситуації та напрями майбутнього розвитку. – Київ, 2001. – 28 с.
3. Мельник В.М. Туберкульоз в Україні на сучасному етапі й прогностичні оцінки // Укр. пульм. журн. – 2004. – № 3. – С. 61-63.
4. Власенко В.В., Гаврилюк М.Д., Компанець В.С., Черниш І.М. Нові погляди в морфології збудника туберкульозу // Матер. XIV об'єднаної медико-технічної конф., ВДМУ ім. М.І. Пирогова. – Вінниця, 1996. – С. 48.
5. Сучасні методи мікробіологічного обстеження донорів на туберкульоз: Метод, рекомендації / Власенко В.В., Новак В.Л., В.С. Маланіч та ін. – Вінниця: ГІПАНІС, 2001. – 40 с.
6. Патент №21719, Україна С12N1/00 Живильне середовище для виділення збудника туберкульозу / Власенко В.В., Власенко І.Г., Колодій С.А., Блащук В.В., Дзюмак М.А. – № U200613852; заявлено 26.12.2006. опубліковано 15.03.2007; Бюл. № 3.

CYCLE OF DEVELOPMENT OF TUBERCULOSIS PATHOGENE IN BLOOD AND ITS REVEALING

V.V. Vlasenko, H.K. Paliy, I.H. Vlasenko, S.A. Kolodiy, S.P. Vasylenko

SUMMARY. The cycle of development of tuberculosis pathogene in blood has been shown and new highly specific express-method for revealing tuberculosis mycobacteria in capillary blood with the further bacteriological proving by means of elimination of pure culture of tuberculosis mycobacteria during 2-5 days has been offered. This method allows to reveal the tuberculosis pathogene on the early stage of disease when it isn't diagnosed by traditional methods.

Key words: tuberculosis, pathogene, bacteriological express-diagnostics.