

ЕКОЛОГІЧНІ АСПЕКТИ ІСНУВАННЯ Й РОЗВИТКУ ПОПУЛЯЦІЙ МІКОБАКТЕРІЙ У ЗОВНІШНЬОМУ СЕРЕДОВИЩІ

В. В. ВЛАСЕНКО¹, І. Г. ВЛАСЕНКО¹, М. А. ДЗЮМАК¹, О. П. ФРОЛОВ¹,
О. П. ЛИСЕНКО², В. В. ШУМСКАЯ²

¹Подільський науково-дослідний центр туберкульозу,

²Інститут експериментальної ветеринарії ім. С. Н. Вишелеського Національної академії наук Білорусі

*Показана здатність патогенних мікобактерій виживати і розвиватися в навколишньому середовищі. Доведено, що артроспори є стадією розвитку кислотостійких вірулентних форм типових мікобактерій. Доведена наявність однакових загальних властивостей у ультрадрібних форм артроспор і типових *M. tuberculosis*.*

Ключові слова: ЗБУДНИК ТУБЕРКУЛЬОЗУ, НАВКОЛИШНЄ СЕРЕДОВИЩЕ, ПОЖИВНЕ СЕРЕДОВИЩЕ „ВЛАКОН”, КОМП’ЮТЕРНА І ЕЛЕКТРОННА МІКРОСКОПІЯ, ГНІЙ, АНТИСИРОВАТКИ, ЕКСПРЕС-ДІАГНОСТИКА.

Здатність патогенних мікобактерій виживати і розвиватися в навколишньому середовищі становить небезпеку їхнього поширення й циркуляції, що обумовлює особливе санітарно-епізоотологічне й епідеміологічне значення збудників туберкульозу. Як відзначає ряд авторів, багато патогенних й потенційно патогенних бактерій здатні існувати й активно розмножуватися не тільки в організмі господаря, але й в об'єктах навколишнього середовища: у ґрунті, у воді, на рослинних субстратах [1-3]. Очевидно, що патогенні бактерії, які живуть у зовнішньому середовищі, здатні адаптуватися до умов існування, що якісно розрізняються не тільки живильними субстратами, але й всім комплексом біотичних й абіотичних факторів.

Вже на початку 20 століття з'явилися відомості про поліморфізм збудника туберкульозу. Широке поширення збудників туберкульозу серед тварин і людей ставить перед фахівцями завдання розробити високоефективні препарати для виявлення та ідентифікації збудника туберкульозу в навколишньому середовищі. Незважаючи на довготривалу роботу з мікобактеріями їх морфологічні зміни залежно від впливу різних факторів до кінця не з'ясовані. Проблема дисоціації мікобактерій в даний час є особливо актуальною, оскільки частішають спостереження про виділення з організму хворих на легеневу патологію кислотостійких мікроорганізмів, походження і виду приналежність яких не можна визначити [4-9]. Лише відкриття циклічного розвитку мікобактерій [3] допомагає зрозуміти механізм внутрішньо-популяційних змін бактерій, їхню адгезію, колонізацію, а також вплив абіотичних і біотичних факторів навколишнього середовища. Революційний прорив у вивченні збудника туберкульозу досягнутий українськими вченими, які розробили унікальне живильне середовище ВКГ і Влакон. З 2002 р. сумісні дослідження в цьому напрямку проводяться і в Республіці Білорусь в Інституті експериментальної ветеринарії ім. С. Н. Вишелеського Національної академії наук Білорусі. За допомогою живильного середовища ВКГ, імунологічних і молекулярно-генетичних методів був встановлений ряд важливих фактів: збудник туберкульозу може утворювати форми що фільтруються, шаро-, груше-, амєбоподібні й інші морфологічні утворення, які здатні трансформуватися в класичні палички; деякі структури (артроспори) проходять через стерилізуючі фільтри і витримують тривале нагрівання при 120 °С, тому туберкулін, одержуваний шляхом термічної інактивації збудника, являє потенційну небезпеку при діагностичному введенні людині і тваринам; цілком ймовірно, що широке використання туберкуліну, пастеризованого молока і м'яса інфікованих тварин сприяє збереженню і циркуляції збудника туберкульозу; туберкульоз у людини і тварин виникає при розвитку імунодефіциту і в початкових стадіях збудник персистує у вигляді змінених форм, що може

бути виявлене тільки за допомогою посіву крові, мокроти й іншого біоматеріалу на середовище ВКГ; [3].

Метою нашої роботи було вивчення можливостей виживання, розвитку і гетероморфізму мікобактерій на біологічних субстратах зовнішнього середовища.

Матеріали і методи

Для експериментального дослідження виживання клітин у зовнішньому середовищі (у рідкому гної) використовували *M. bovis* 8. У стерильну колбу об'ємом 100 мл вносили 50 мл стерильної води та 20 г нативного гною і культури мікобактерій. Концентрація клітин мікобактерій становила 1000 мікробних тіл в 1 мілілітрі. Виготовлену суспензію розділяли на дві частини. Одну частину суспензії зберігали при +22-26 °С протягом 120 діб, а другу поміщали в холодильник при +4 °С на такий же час.

Для дослідження морфологічних змін мікобактерії при зберіганні готували мазки і фарбували за Ціль-Нільсоном. Після закінчення періоду спостереження (120 діб) суспензії гною та мікобактерій висівали на середовище „Влакон” і термостатували за загальноприйнятою методикою (протягом 45 діб). Отримані культури на середовищі „Влакон” (рідкого гною) в подальшому піддавалися дослідженням: готувалися мазки і фарбувались за методом Ціль-Нільсона, а також використовували методику реакції аглютинації (РА) на склі з наступним фарбуванням і мікроскопуванням.

Для визначення патогенності збудника туберкульозу, отриманого на середовищі „Влакон”, використовували метод зараження лабораторних тварин – морських свинок. Для цього брали 5 мл стерильного фізіологічного розчину і проводили змив отриманих культур. Одержану суспензію розділяли на дві частини. Згідно рекомендації НДІ ім. Р. Коха, до перших частин суспензії додавали рівну частину (1:1) стерильного мінерального масла, (отримували емульсію), а до другої частини суспензії додавали в рівній кількості фізіологічний розчин і вводили внутрішньочеревинно морським свинкам. Було утворено дві групи (по 5 голів) піддослідних морських свинок, яким вводили досліджувані культури. Через 71 добу після зараження провели забій і патологоанатомічний розтин тварин. У тварин із серця брали зразки крові в стерильні пробірки з гепарином, додавали рівний об'єм стимулятора росту і ставили в термостат при температурі 37 °С на 24 години. Після термостатування висівали на поживне середовище.

Для подальшого дослідження від морських свинок використовували пахові лімфовузли, печінку, селезінку. Відібраний патологічний матеріал обробляли за А.П. Алікаєвою і проводили посів суспензії на живильні середовища.

Для диференціації культур різних видів мікобактерій, що вирости на середовищі „Влакон”, використали реакцію аглютинації (РА) на склі з наступним фарбуванням і мікроскопуванням.

Як антиген використовували культури мікобактерій із середовища „Влакон”, сироватки - антисироватки до *M. bovis* Vallee, до антигенів атипових мікобактерій, а також негативну сироватку крові великої рогатої худоби. Оцінку реакції проводили протягом 4 хв, після чого мазок фарбували за Ціль-Нільсоном, але без дофарбовування метиленовим синім, і мікроскопували.

Результати й обговорення

При посіві суспензії (гною, мікобактерій та води), яка зберігалась при температурі +22-26 °С протягом 120 діб виявився ріст культур на середовищі „Влакон” протягом 2-6 діб. Ріст культури з суспензії, яка зберігалась у холодильнику, спостерігався на 5-7 добу.

В результаті комп'ютерної й електронної мікроскопії було встановлено, що в мікрокартині суспензії, яка зберігалась у холодильнику, виявлені артроспори збудника туберкульозу діаметром 0,12-0,15 мкм (рис .1).

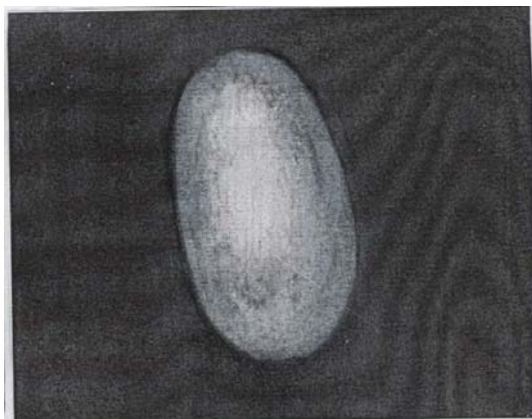


Рис.1. Загальний вид артроспори (комп'ютерна мікроскопія)

При електронній мікроскопії, на сагітальному розрізі артроспори, виявлені міксамеби, які виходять з артроспори після її дозрівання. Вони не мають клітинної стінки і тому їх називають молекутами. Деякі автори ототожнюють молекути з L-формами. Але в процесі морфологічних досліджень L-форми ідентифікуються як мікроорганізми, що втратили клітинну стінку, тоді як молекул – це стадія розвитку збудника туберкульозу, а в подальшому утворюється клітинна стінка (рис. 2).

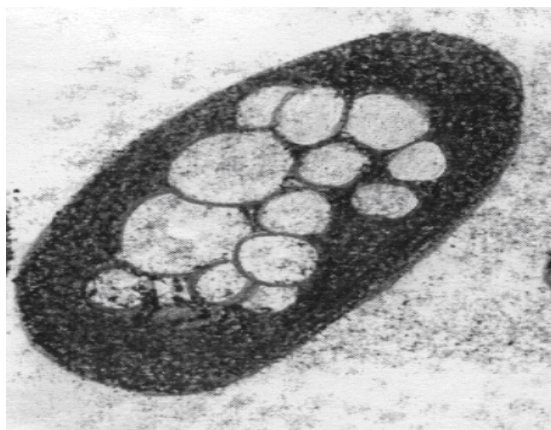
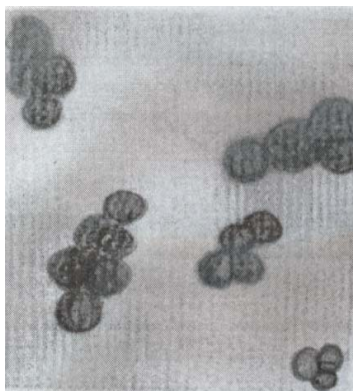


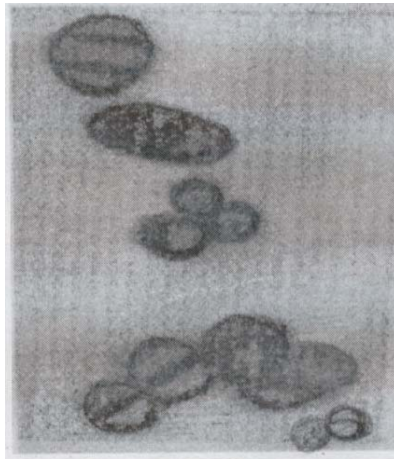
Рис.2. Стадія розвитку збудника туберкульозу - міксамеби в артроспорі (електронна мікроскопія - 50 тис. збільшення)

Мікрокартина суспензії, яка зберігалась при температурі 22-26 °С наведена на рис. 3.



(Зб. 7x90)

Рис.3. Мікрокартина при зберіганні мікобактерій (температура 22-26 °С, протягом 60 діб) коковидної форми, які об'єднані міжклітинним матриксом

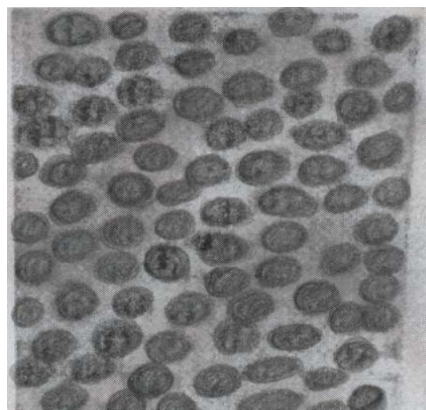


(Зб. 7x90)

Рис.4. Мікрокартина при зберіганні мікобактерій (температура 22-26 °С, протягом 120 діб) стадія ділення

Як видно з рисунків, мікобактерії які зберігались при плюсовій температурі (22-26 °С) проходили стадії розвитку молікути, з наступним утворенням щільних горбикових покривів, тобто можна бачити клітини мікобактерій, які об'єднані міжклітинним матриксом (рис. 3), а на рис. 4 показана мікрокартина після 120 діб зберігання, мікобактерій, де видно стадію розвитку – ділення. Щодо суспензії, яка зберігалась у холодильнику, то мікрокартина була незмінною протягом 4 місяців досліджень, тобто спостерігалась стадія артрспори (рис. 5), що проявляється в зменшенні синтезу миколових кислот і корд-фактору при знижених температурах.

При мікроскопії мазків, виготовлених з отриманих культур *M. bovis* 8., що росли на середовищі „Влакон” протягом 2-7 діб пофарбованих за Ціль-Нільсоном, спостерігали коки, овоїди, прямі й вигнуті палички різної величини, з зернистістю - рожевого або червоно-фіолетового кольорів (рис. 6).



(Зб. 7x90)

Рис.5. Мікрокартина при зберіганні мікобактерій (температура +4 °С протягом 120 діб) стадія артрспори

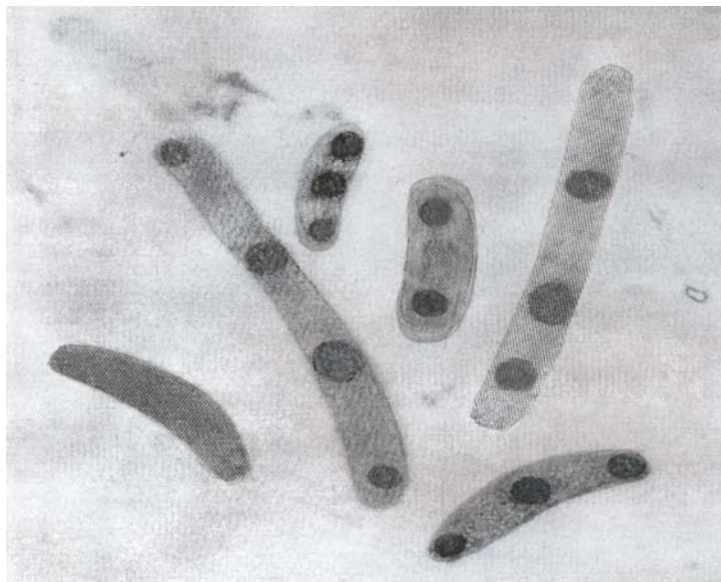


Рис.6. Мікрокартина отриманої культури, що виросла після посіву дослідного матеріалу, який зберігався при температурі +22-26 °С протягом 120 діб (стадія зернистої палички)

Дослідженнями показано, що у культур, які зберігались при температурі +22-26 °С протягом 120 діб, у клітинних стінках мікобактерій збільшується синтез миколових кислот, відповідно зростає вміст в клітинах популяції корд-фактору, специфічного гліколіпиду, відповідального за вірулентність мікобактерій. Розвиток мікобактерій, які зберігались при понижених температурах (+4 °С) на поживному середовищі був слабший, про що свідчить зменшення кількості миколових кислот і корд-фактору, поверхня клітин стоншується, внаслідок чого мікобактерія стає меншою в обсязі.

У мазках цих же культур 1,5-місячного росту на середовищі „Влаконт” виявляли червоного кольору клітини розсіпу коків - дипло - тетракоки, овоїди, велику кількість паличок різної величини із зернистістю. Таким чином, при тривалому культивуванні мікобактерій на середовищі „Влаконт” підтверджена їх здатність трансформуватися в класичні форми збудників.

У морських свинок, забитих через 71 добу, які були заражені культурами *M. bovis* 8, (11-добового росту, отриманих на середовищі „Влаконт”), виявлені патолого-анатомічні зміни, характерні для туберкульозу. Однак необхідно зазначити, що у тварин, яким вводили суспензію культур, що зберігалась у холодильнику в фізрозчині, патологічні зміни не спостерігались, тоді як ця культура в рідкому маслі викликала характерні для туберкульозу патологічні зміни.

При зараженні гомогенатом на фізіологічному розчині патматеріалу від морських свинок (які не мали паткартини), лабораторним тваринам (пасажування) через 45 діб спостерігалось характерна паткартина - туберкульозні горбики.

При мікроскопії мазків гомогенатів патматеріалу спостерігали клітини рожево-червоного кольору: коки дрібні і великі, одиночні, купками і невеликими ланцюжками, диплококи, палички короткі й довгі з зернами.

При посіві гомогенатів патматеріалу від морських свинок на середовище „Влаконт” спостерігали ріст культур через 2-3 доби у вигляді дрібних круглих напівпрозорих колоній сіро-білого кольору, іноді з жовтуватим відтінком, що зливалися на 5-6 добу в «газон».

При мікроскопії мазків культур 6-15 - добового росту, що виростили з патматеріалу на середовищі, спостерігали червоні дрібні й великі коки, диплококи, овоїди, дрібні прямі й вигнуті палички.

При посіві крові дослідних лабораторних тварин на середовище „Влаконт” 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, виготовлених з культур, що виростили на середовищі „Влаконт” протягом 5 діб, спостерігали клітини рожево-червоного

кольору: вакуолі із зернистістю, великі коки, овоїди, товсті вигнуті палички, прямі тонкі палички із зернистістю й інші форми.

Встановлено, що культури мікобактерій (суспензії гною) із середовища „Влакон” чітко аглютинувались антисироваткою до *M. bovis*, і не аглютинувались негативною сироваткою крові великої рогатої худоби. Демонстративність РА на склі підвищувалася при фарбуванні (за Циль-Нільсоном, але без дофарбовування метиленовим синім) і наступному мікроскопуванні.

Дослідження виживання популяцій мікобактерій у зразках рідкого гною виявило існування клітин *Mycobacterium*, незважаючи на стресові температурні фактори. При перебуванні мікобактерій у рідкому гної, де є живильний субстрат, можливе їх розмноження. Можна думати, що для виживання популяцій патогенних мікобактерій у рідкому субстраті була поступова адаптація клітин у вигляді гетероморфізму із проявом циклічних форм розвитку. При висіві таких культур на середовище Левенштейна-Йенсена або „Влакон” спостерігали типовий ріст культури, що свідчило про реверсію клітин у вихідну форму.

Адаптаційна здатність мікобактерій у вигляді певних стадій розвитку - закономірне явище, пов'язане із впливом на популяції клітин абіотичних факторів.

Отримані нами експериментальні дані дозволяють стверджувати, що мікобактерії здатні не тільки виживати, але й розмножуватися на об'єктах навколишнього середовища.

Важливо відзначити, що культивування мікобактерій при знижених температурах (+4 °С,) істотно не впливає на життєздатність популяції, але, можна думати, приводить до тимчасового зниження патогенності, обумовленого значним зменшенням синтезу миколових кислот і вмісту корд-фактору, що морфологічно проявляється в деградації покривів на поверхні клітин мікобактерій. При введенні таких культур дослідним тваринам на фізіологічному розчині ці мікобактерії здатні викликати характерні патологічні зміни лише при другому пасажуванні. Дослідженнями показано, що при високих температурах зберігання (+22-26 °С) у клітинних стінках мікобактерій збільшується синтез миколових кислот з довгим вуглецевим ланцюгом (С60 –С90). Отже, підвищується й вміст у популяції корд-фактору - 6,6-димиколат трегалози - специфічного гліколіпиду патогенних мікобактерій, відповідального за вірулентність мікобактерій [1].

Висновки

1. Вивчені фактори виживання збудника туберкульозу в навколишнім середовищі та виявлені їх структурно-функціональні зміни в популяції клітин, показана здатність клітин мікобактерій реверсувати у вихідний стан за сприятливих умов. Пасажування патогенних мікобактерій з пониженою ферментативною активністю призводить до підвищення їх вірулентності.
2. Адаптаційні механізми, властиві популяціям патогенних мікобактерій, дозволяють їм тривалий час виживати й циркулювати в навколишньому середовищі, що обумовлює особливе санітарне й епідеміологічне значення збудників туберкульозу.
3. Показано, що артроспори є стадією розвитку кислотостійких вірулентних форм типових мікобактерій, і доказана наявність однакових загальних властивостей в ультрадрібних форм (артроспори) і типових *M. tuberculosis*.
4. Для диференціації культур різних видів мікобактерій, що вирости на середовищі „Влакон”, може бути використана методика реакції аглютинації (РА) на склі з наступним фарбуванням і мікроскопуванням, що дозволяє диференціювати культури бичого виду, які вирости на середовищі „Влакон”, від пташиного виду й атипових мікобактерій.

V. V. Vlasenko, I. G. Vlasenko, M.A. Dzyumak, O.P. Frolov, O. P. Lysenko, V.V. Shumskaya

ECOLOGICAL ASPECTS OF EXISTENCE AND DEVELOPMENT OF POPULATION OF MICOBACTERIA IN EXTERNAL ENVIRONMENT

S u m m a r y

Ability of pathogenic micro bacteria to survive and develop in surrounding environment has been shown. It has

been proved that the arthrospores are the stage of development of acid resistible virulent forms of typical mycobacterium, and the presence of common properties in both arthrospores minute forms and typical tuberculosis has been proved.

Podillya Scientific Research Centre of Tuberculosis

S.N. Vyshelesky Institute of Experimental Veterinary Science at the National Academy of Sciences of Belarus

1. *Литвин В. Ю., Гинсбург А. Л. и др. Эпидемиологические аспекты экологии бактерий. М. НИИЭиМ. - 1998.*
2. *Сомов Г. А., Литвин В. Ю. Сапрофитизм патогенных бактерий // Новосибирск: Наука 1988.- С.5*
3. *Власенко В. В. Туберкулез в фокусе проблем современности. Винница: Наука. 1998. - 35 с.*
4. *Гольшевская В. И. Динамика микобактериальной популяции экспериментального деструктивного туберкулеза легких: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. М. 1984.*
5. *Должанский В. М., Калюк А. Н., Немсадзе М. Н. Туберкулез и экология. 1993. № 1. - С. 60-64.*
6. *Земскова З. С. Патоморфология туберкулезной инфекции при длительном персистировании измененных форм возбудителя (патологоанатомическое, микробиологическое, экспериментальное исследование): Автореф. дис. ... докт. мед. наук. М., 1976.*
7. *Муратов В. В. Заболеваемость в очагах туберкулезной инфекции при различных вариантах бактерио выделения: Автореф. дис... докт. мед. наук. М., 1992.*
8. *Пашков Ю. Н. Результативность различных методов выявления бактерио выделения с количественным учетом его массивности в процессе химиотерапии у больных туберкулезом легких: Авореф. дис... канд. мед. наук. Киев, 1979.*
9. *Пузик В. И. Патологическая анатомия туберкулеза. М., 1998.- С. 112.*