

ПОЛІМОРФІЗМ І МІНЛИВІСТЬ M. BOVIS ШВИДКО- ТА ПОВІЛЬНОРОСЛИХ ШТАМІВ

О.А. ТКАЧЕНКО, доктор ветеринарних наук, професор
М.В. БІЛАН, кандидат ветеринарних наук, доцент
В.В. ЗАЖАРСЬКИЙ, кандидат ветеринарних наук, доцент
Н.Г. УСЕЄВА, старший викладач
Л.О. КОВАЛЬОВА, здобувач
Ю.М. ТАРАН, **П.О. ДАВИДЕНКО**, аспіранти
Дніпропетровський державний аграрний університет

Різноманітні форми мікобактерій туберкульозу, які виявляли у попередні десятиліття [1–4, 6, 7, 9], свідчать про поліморфізм і мінливість збудника хвороби. Проте й дотепер невідомі та остаточно нез'ясовані фактори, що призводять до появи інших, відмінних від діагностичної, форм збудника, їх значення в інфекційному й епізоотичному процесах. Тому подальше вивчення цієї проблеми сприятиме більш глибокому розумінню механізмів взаємовідносин мікро- та макроорганізму, підвищенню ефективності профілактичних й оздоровчих протитуберкульозних заходів.

МЕТА РОБОТИ — дослідити вплив пасажу через штучне середовище з різним рН на поліморфізм та мінливість *M. bovis* швидко- та повільнорослих штамів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Роботу виконували протягом 2002–2008 рр. у навчально-дослідній лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб Дніпропетровського державного аграрного університету.

M. bovis виділяли з 13 проб патолого-анатомічно не змінених лімфатичних вузлів великої рогатої худоби з неблагополучного щодо туберкульозу господарства, реагуючої на ППД-туберкулін для ссавців. Передспівісний матеріал готували за методом В.А. Матузенка й співавторів [8].

Ступінь вірулентності *M. bovis* визначали, заражаючи традиційним методом морських свинок (маса тіла 250–300 г) суспензією з лімфатичних вузлів (1 см³) або зависю мікобактерій виділених культур (1 мг/см³ фізіологічного розчину).

Поліморфізм і мінливість *M. bovis* швидко- та повільнорослих музейних й епізоотичних штамів досліджували в динаміці пасажив, використовуючи стандартне щільне ячне середовище (ДП «Ветеринарна медицина», м. Харків) з рН 7,1–7,2 та таке ж з підвищеним вмістом кислотних грам-еквівалентів — 6,5 і 6,7.

Для цього завись мікобактерій, приготовлену з розрахунку 1 мг/см³ фізіологічного розчину, висівали на одне й те саме середовище об'ємом дві бактеріологічні петлі кожної з шести пробірок трьох варіантів досліду за традиційною у ветеринарній медицині методикою. Ріст колоній мікобактерій оцінювали у перші сім днів щодня, а в подальшому — раз на тиждень.

Вивчали форму, структуру колоній, морфологічні, тинкторіальні властивості мікобактерій за традиційним методом [5].

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Після висіву суспензії з лімфатичних вузлів 13 корів, реагуючих на алерген, колонії мікобактерій на середовищі з рН 7,1–7,2 вияв-

лені у восьми (61,5%) пробах на 12–30-й день (табл. 1), при цьому тільки три культури мікобактерій виростили у перші 20 днів.

Кількість та інтенсивність колоній була незначною і до того ж не в кожній з шести пробірок проби, як правило, в одній–трьох — поодинокі колонії до міліметра у діаметрі. Культивування (78–60 днів) сприяло збільшенню кількості (в 1,4 раза), розміру (у 2 рази) колоній та їх появі на середовищі інших пробірок.

Морфологія колоній — кольору слонової кістки, гладенькі, з рівними краями, сухуваті (у перші десять днів росту). Мікроскопія мазків, приготовлених з культур мікобактерій, засвідчила наявність червоних паличок завдовжки 1–2 мкм, завширшки 0,1–0,3 мкм з незначно вираженою грануляцією (в одній мікобактерії інколи з'являлася гранула).

Одержані дані засвідчили, що за швидкістю формування, структурою, формою колоній першої генерації та морфологічними властивостями досліджувані мікобактерії не відрізняються від традиційно описаних представників *M. bovis* патогенних штамів; за ступенем вірулентності відносяться до середньої, оскільки морські свинки загинули від генералізованої форми туберкульозу за 35–45 днів.

З досліджених у динаміці пересівів *M. bovis* восьми штамів (табл. 2) три (37,5%) зі збільшенням кількості пасажив стабільно формували колонії на другий–шостий день після висіву на середовище зависі мікобактерій. Мікобактерії іншої частини штамів традиційно залишалися повільнорослими. Водночас з другої генерації мікобактерій протягом наступних дев'яти днів колонії формувалися на середовищі з рН 6,5 у середньому на 19-й день, з рН 7,1 — на 11-й день, що свідчить про повільніше розмноження досліджуваних мікобактерій на середовищі, яке вміщує менше кислотних грам-еквівалентів.

1. Строки формування колоній мікобактерій першої генерації та загибелі морських свинок

Показник	Проба біоматеріалу							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Формування колоній, доба	24	12	15	21	30	20	29	24
Загибель морських свинок, доба	45	41	37	40,5	40	40	43	35

2. Швидкість формування колоній *M. bovis* епізоотичних штамів, день

Штам, №	Пасаж (генерація)										
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
1	9/9	20/20	13/13	7/12	12/14	13/13	14/14	14/14	15/16	13/14	
2	16/16	4/7	23/25	15/13	16/15	15/17	14/16	14/17	13/14	14/17	
3	9/10	3/7	5/9	5/6	4/9	7/10	7/7	16/35	13/26	14/26	
4	9/11	7/7	3/6	5/5	5/5	3/5	5/5	5/7	5/33	5/25	
5	19/19	10/10	8/9	5/5	5/5	5/10	5/6	5/5	5/5	5/5	
6	8/8	9/11	6/6	7/8	7/9	8/10	9/9	8/8	9/9	10/10	
7	11/12	10/11	9/10	9/10	12/11	9/9	6/7	6/6	6/7	6/7	
8	10/11	7/8	5/6	3/5	2/4	3/4	2/3	2/2	2/2	2/2	

Примітка: рН середовища; чисельник — 6,5; знаменник — 7,1

3. Ріст колоній *M. bovis* на щільному середовищі за багаточисленних пересівів одно—триденної культури

Пересіви мікобактерій	Строки появи колоній, день				
	штам				
	7		8		
	рН				
	7,1	6,5	7,1	6,7	6,5
1—12	7,2	7,2	2,0	2,0	2,0
13—24	5,4	6,8	7,0	4,2	3,5
25—36	8,0	6,5	11,0	2,9	2,5
37—48	14,6	13,8	7,2	2,4	2,7
49—60	13,5	9,0	6,5	2,9	2,9
61—72	Не досліджували	Не досліджували	10,2	2,4	2,3
73—84	Те ж	Те ж	12,0	3,0	3,0
85—91	« »	« »	13,0	2,5	2,3
97—108	« »	« »	14,2	3,0	2,7
109—120	« »	« »	12,5	9,0	6,5
121—132	« »	« »	12	6,7	7,7
133—144	« »	« »	—	9,6	11,2
145—156	« »	« »	—	12,5	13,1
157—168	« »	« »	—	8,2	10,1
169—180	« »	« »	—	5,7	11,7

Характер росту (S-форма) й структура колоній у динаміці пересівів у цілому були незмінними. Проте у субкультури восьмого пересіву мікобактерій окремих штамів (№5) на середовищі з рН 6,5 і 7,1 відмічено дещо інші властивості колоній: надто інтенсивний горбкуватоподібний ріст (R-форма).

Провівши мікроскопію мікобактерій восьмої генерації усіх 16 варіантів штамів (культивованих на середовищі з різним рН) виявлено, що морфологічні й тинкторіальні властивості *M. bovis* не відрізнялися від вихідних за винятком мікобактерій штаму №5, який відмінний за формою, структурою й інтенсивністю колоній від усіх інших. А саме: в полі зору мікроскопа на фоні традиційних за морфологією й тинкторіальними властивостями мікобактерій виявлені товсті (1—2 мкм), довгі (8—15 мкм), з чіткою зернистістю сегментовані кислотостійкі палички (50%) та такі ж, але з менш помітною зернистістю, не кислотостійкі палички й ниткоподібні мікобактерії. В той же час, ледь помітні поодинокі не кислотостійкі палички та ниткоподібні з нечіткою зернистістю форми в полі зору мікроскопа (штам №5) відмічалися ще з першої генерації мікобактерій, тобто після висіву суспензії, приготовленої з лімфатичних вузлів.

Для підтвердження виявленої властивості провели наступні дослідження мікобактерій штамів №7 та №8: перший — у попередніх дослідженнях знаходився на межі швидкорослого (колонії формувалися в останніх чотирьох генераціях на шосту—сьому добу з часу висіву зависі мікобактерій); другий — типовий представник швидкорослих (колонії формувалися протягом останніх шести пересівів на другий — третій день).

Схема досліджень лишилася попередньою за виключенням введення елемента пасажу штаму №8 через середовище з рН 6,7 та тривалості й кількості пересівів.

Як засвідчили дослідження (табл. 3), мікобактерії штаму №7 протягом 60 пересівів змінили швидкість розмноження у бік сповільнення і залишилися повільнорослими, в той час як у варіантів мікобактерій штаму №8 протягом дослідів встановлені динамічні суттєві відмінності: на середовищі з рН 7,1 — зниження строків формування колоній з 19-го пасажу, що визначило їх у подальшому як повільнорослі; на середовищі з рН 6,7 та 6,5 це явище виявлено лише на 109—120-му пересіві.

Саме тому на останніх середовищах одержано 180 генерацій швидкорослого штаму, а на середовищі з рН 7,1 — тільки 132. Водночас, якщо культурально-морфологічні властивості *M. bovis* штаму №7 протягом 60 пересівів практично не змінилися (що пов'язано, можливо, з незначною кількістю пасажів), то у *M. bovis* швидкорослого штаму трьох варіантів спостерігалися динамічні суттєві зміни залежно від вмісту в середовищі кислотних грам-еквівалентів. Насамперед це стосується форми, структури колоній та інтенсивності адаптації мікобактерій щодо того чи іншого штучного живильного середовища. За досить тривалий період спостереження форми колоній змінювалися від дрібних, сухуватих, поодиноких до більш великих і вологих з суцільним ростом за тривалого культивування до незначного роsinчастого («димка», «наліт») росту в останніх 20 генераціях по лінії посіву зависі мікобактерій за стабільності кольору культури. Однак у цілому на 14-й день від початку формування колоній на середовищі з рН 6,5 та 6,7 відмічався суцільний ріст практично до 114-го пасажу, на середовищі з рН 7,1 — лише на 21—28-й день спостереження, що свідчить про більш негативний вплив такого вмісту кислотних грам-еквівалентів на адаптивну здатність *M. bovis* щодо живильного середовища.

Морфологія та тинкторіальні властивості мікобактерій (залежно від середовища) змінювалися зі збільшенням кількості пересівів, за винятком культивованих на середовищі з рН 7,1, де згадані властивості практично не зазнавали змін. На середовищі з рН 6,5 та 6,7, розпочинаючи з 90-ї генерації, в полі зору мікроскопа відмічалися товсті й тонкі, зернисті, короткі й довгі сегментовані палички червоного кольору та ледь помітні поодинокі паличко- і ниткоподібні не кислотостійкі з нечіткою зернистістю форми. Зі 145-го пасажу на фоні традиційних кислотостійких коротких з'явилися і довгі форми мікобактерій, але з менш інтенсивно зафарбованою оболонкою, ніж в умовах перших пересівів. Це може свідчити про зміну біохімічного складу клітинної оболонки. Кількість не кислотостійких форм збудника та інтенсивність їх забарвлення залишалася на попередньому (90-та генерація) рівні.

M. bovis 168-ї генерації на середовищі з рН 6,7 стимулювали інтенсивний ріст R-колоній (рис. 1), подібних до штаму №5, описаного на першому етапі досліджень. Мікроскопія засвідчила наявність кислотостійких паличок різних розмірів, у т. ч. й не кислотостійких з нечітко вираженою зернистістю форми збудника. На 169-й генерації горбкуватоподібного росту колоній мікроскопічно виявлено як кислотостійкі, так і чітко сформовані не кислотостійкі форми мікобактерій. Не кислотостійкі мікобактерії ниткоподібної форми превалювали над кислотостійкими у співвідношенні 10:1.



1. Колонії *M. bovis* 168-ї генерації на середовищі з рН 6,7

Досліджуючи культуру 170-ї і наступних генерацій, у полі зору мікроскопа виявляли кислотостійкі палички і не кислотостійкі паличко- та ниткоподібні форми мікобактерій.

Поява не кислотостійких форм мікобактерій змінила зовнішній вигляд, структуру, форму колоній та строки їх формування. Якщо до виникнення чітко сформованих не кислотостійких поліморфних форм кислотостійкі мікобактерії формували на середовищі окремі колонії з наступним суцільним ростом по лінії посіву, то мішані, особливо на першій стадії явища, стимулювали «росинчастий» ріст культури.

Практично ідентичні зміни зафіксовані також у *M. bovis* швидко-рослого штаму, який пасажувався через штучне живильне середовище з рН 6,5. Однак поява чітко сформованих не кислотостійких поліморфних мікобактерій відмічена на 176-й генерації, тобто на дев'ять пасажів пізніше, ніж на середовищі з рН 6,7. Культура (наліт) формувалася у строки попередніх 60 пересівів.

На середовищі з рН 7,1 варіант швидко-рослого штаму *M. bovis* (так само, як і два попередні з появою не кислотостійких форм збудника) стимулював «росинчасту» культуру (наліт) по лінії висіву зависі. Проте чітка трансформація мікобактерій у не кислотостійкі форми відмічена на 124-му пересіві, тобто набагато раніше, ніж у двох попередніх випадках з тенденцією деякого пришвидшення росту культури (наліт). У той же час на цьому середовищі поодинокі нечітко сформовані не кислотостійкі форми мікобактерій (як і на інших двох) відмічалися значно раніше, ніж чітко сформовані трансформовані форми (за 60 пересівів).

Паралельно зміні форми й структури колоній, морфологічних і тинкторіальних властивостей у пасажованих мікобактерій на середовищі з різним рН змінювалася й вірулентність. Більш виражені зміни відбувалися у мікобактерій, культивованих на середовищі з рН 6,5 та 6,7, оскільки вони не викликали загибелі морських свинок, тоді як інші, які були заражені *M. bovis*, що пасажувалися через середовище з рН 7,1, загинули від туберкульозу протягом 50–70 днів (для досліду відібрали мікобактерії трьох варіантів 100-го пересіву).

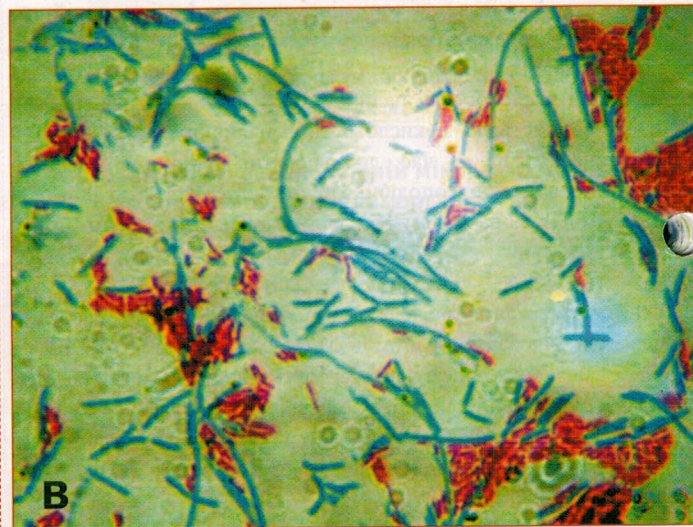
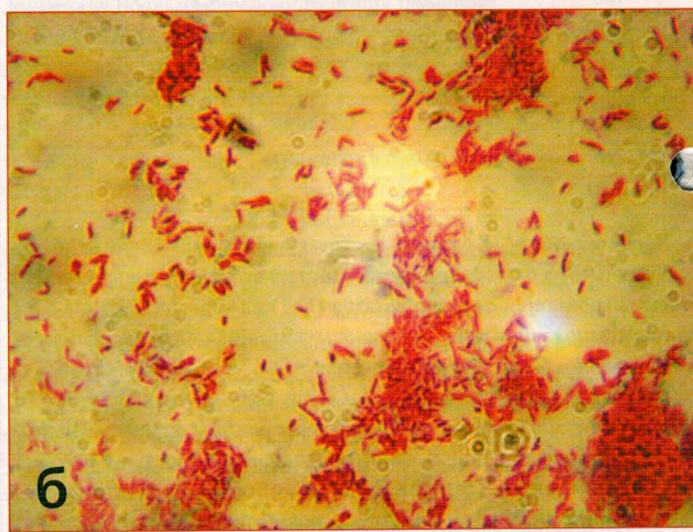
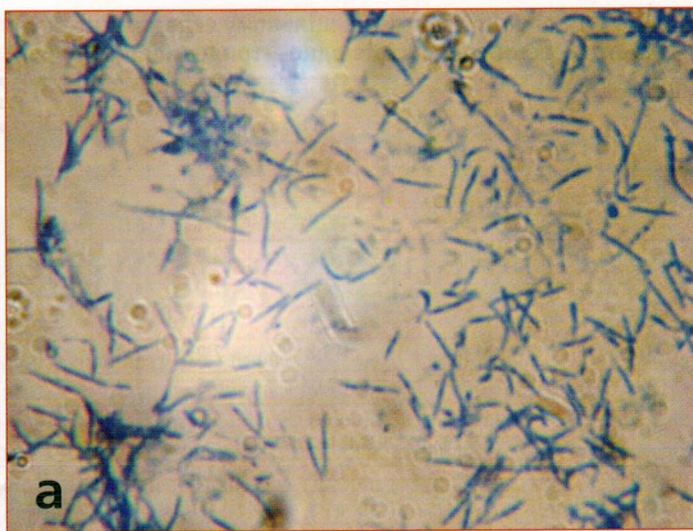
Між тим, для одержання чистої лінії клону мікобактерій, культивованих на середовищі з рН 6,7, пересиви мішаної культури проводили послідовно з ізольованих колоній відповідно до часу їх формування – всього проведено чотири пересиви.

На четвертому пересіві окремих колоній одержано клон: не кислотостійких, кислотостійких і мішаних мікобактерій (рис. 2).

Вочевидь, поліморфізм та мінливість мікобактерій відіграють велике, а можливо й головне значення в епізоотології туберкульозу. Без їх урахування і вивчення адаптивної здатності до того чи іншого середовища нині існуюча система профілактики й боротьби з хворобою не завжди забезпечує необхідний епізоотологічний та економічний ефект. На наше глибоке переконання, саме ці невичнені форми збудника, які, залишаючись недіагностованими, з практично невідомими біологічними властивостями, формують особливості інфекційного й відповідно епізоотичного процесів.

ВИСНОВКИ

1. Для *M. bovis* швидко- та повільнорослих штамів однаково властивий поліморфізм і мінливість.
2. Швидко- та повільнорослі *M. bovis* втрачають вихідну властивість – кислотостійкість залежно від тривалості пасажу і вмісту в середовищі кислотно-лужних грам-еквівалентів. Характерним при цьому є поява в популяції кислотостійких мікобактерій, спочатку поодиноких, ледь помітних (нечітко сформованих); не кислотостійких нитко- та паличкоподібних форм з подальшим різким їх збільшенням і чітко сформованими контурами клітинної оболонки трансформованих мікроорганізмів.



2. Клон: а – не кислотостійких паличко- та ниткоподібних мікобактерій; б – типових кислотостійких *M. bovis*; в – мішаних кислото- та не кислотостійких мікобактерій (фарбування за Ціль-Нільсенем, $\times 1500$)

3. Не кислотостійкі форми збудника на яєчному середовищі формують росинчасті колонії («димка», «наліт»), які з'являються на третій–десятий день з часу висіву зависі.

4. Етіологічне значення та біологічні властивості не кислотостійких мікобактерій, як і значення цих форм у самозбереженні



збудника в природі, не зовсім ясне. Для розуміння цього явища необхідні більш поглиблені й розширені дослідження.

5. Заходи профілактики та ліквідації туберкульозу великої рогатої худоби, базуючись лише на знанні біологічних властивостей типової кислотостійкої палички, потребують суттєвого вдосконалення з урахуванням поліморфності та мінливості як швидко-, так і повільнорослих *M. bovis*.

Перспективи досліджень. Передбачається дослідити цикл розвитку некислотостійких форм *M. bovis* та їх біологічні властивості.

РЕЗЮМЕ

Полиморфизм и изменчивость *M. bovis* быстро- и медленно растущих штаммов. А.А. Ткаченко, М.В. Билан, В.В. Захарский и др.

В работе показано, что *M. bovis* быстро- и медленно растущих штаммов могут диссоциировать в некислотоустойчивые ните- и палочковидные формы. В некоторых случаях они появляются уже в первой генерации при посеве суспензии биологического материала, в других — после длительных пассажей через плотные питательные среды.

Polimorfizm and changeability strains *M. bovis* quickly and slowly growing. А.А. Tkachenko, М.В. Bilan, V.V. Zazharsky et al.

The research show, that *M. bovis* quickly and slowly growing strains can dissociate in non-acidifirmness, thread and bacillus forms. In some variants they have already found in the first generation at sowing of suspensoids of biological material, in other — after duration passaging on nutrien medium.

ЛІТЕРАТУРА

1. **Вейсфейлер Ю.К.** Биология и изменчивость микобактерий туберкулёза и атипичные микобактерии. — Будапешт: Изд-во АН Венгрии, 1975. — 336 с.
2. **Идентификация** адаптивных форм возбудителя туберкулёза / В.В. Власенко, И.Г. Власенко, С.А. Колодий и др. // Научный вестник ЛНУВМ та БТ ім. С.З. Гжицького. — 2007. — Т.9. — №3 (34). — С. 11–19.
3. **Калина Г.П.** L-трансформация бактерий: Руководство по микробиологии, клинике и эпидемиологии инфекционных болезней. — М.: Медгиз, 1962. — С. 574–595.
4. **Космодамианский В.Н.** Бактериология и патогенез туберкулёза. — М.: Медгиз, 1950. — 198 с.
5. **Лабораторная** диагностика туберкулёза. Рекомендации. — Омск, 1988. — 64 с.
6. **О роли** латентных, трудно культивируемых и некультивируемых персистентных бактерий в патологии человека / И.В. Елисеєва, Е.М. Бабич, Ю.Л. Волянский и др. // Анналы Мечніковського інституту. — 2006. — №1. — С. 12–46
7. **Прозоровский С.В., Кац Л.Н., Каган Г.Я.** L-формы бактерий. — М.: Медицина, 1981. — 239 с.
8. **Способ** обогащения биологического материала при бактериологическом исследовании на туберкулёз / В.А. Матузенко, В.А. Бузол, А.А. Ткаченко и др. // А.С. СССР. — №1734699. — 1992. — 8 с.
9. **Dominic G.J. Woody H.B.** Bacterial Persistence and Expression of Disease // Clinical Microbiol. Rev. — 1997. — V. 10. — №2. — P. 320–344. ■