

УДК 619:616.98:579.873.21:57.083.32:636.5

О.А. ТКАЧЕНКО, докт. вет. наук, професор  
В.В. ЗАЖАРСЬКИЙ, канд. вет. наук, доцентВ.В. ГЛЕБЕНЮК, асистент  
Дніпропетровський державний аграрний університет

# КОРД-ФАКТОР ТА ВІРУЛЕНТНІСТЬ *Mycobacterium bovis* ШВИДКОРОСЛОГО ШТАМУ ТА АТИПОВИХ МІКОБАКТЕРІЙ

Досліджено корд-фактор атипових мікобактерій та *M. bovis* швидкорослого штаму при пасажах через живильні середовища з рН 6,5 та 7,0–7,2. Доведено, що атипові мікобактерії, як і *M. bovis*, здатні при мікрокультивуванні у напівсинтетичному середовищі Школьникової утворювати мікроколонії у вигляді «кіс» і «джгутів».

Як повідомляє Н. Bloch (1950), разом із відкриттям збудника туберкульозу і дослідженням його культуральних властивостей Р. Кохом було описано здатність *M. tuberculosis* і *M. bovis* рости на живильному середовищі у характерній формі, яка нагадувала «коси» та «джгути». Ці мікроколонії склалися зі щільно та паралельно розташованих клітин. Досліджуючи таку здатність мікобактерій, Н. Bloch визначив, що специфічний ріст вірулентних культур збудника туберкульозу відбувається завдяки одній ліпідній фракції, виділеній петролейним ефіром, яка отримала назву корд-фактор [6].

За даними друкованих джерел, мікобактерії (у т. ч. й штаму BCG) із залишковою вірулентністю мають тільки незначну кількість корд-фактора [3, 4, 9, 10]. Деякі дослідники, серед яких і фахівці гуманної медицини [7, 8, 11, 12], зазначають, що мікроскопічне виявлення росту мікобактерій у вигляді «кіс» та «джгутів» може використовуватися як швидкий метод попереднього встановлення діагнозу на туберкульоз. Однак у повідомленнях стверджується, що корд-фактор існує і в атипових мікобактеріях певних видів. Неоднозначність цих даних свідчить про наявність у біологічному світі швидкорослих штамів із відмінними від описаних *M. bovis* властивостями, що вказує на необхідність дослідження корд-фактора у порівняльному аспекті [2, 3, 5].

**Мета роботи** – вивчення наявності та інтенсивності корд-фактора у *M. bovis* швидкорослого штаму та атипових мікобактерій.

## МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Матеріалом для досліджень були п'ять штамів атипових мікобактерій та *M. bovis* швидкорослого штаму, які пасажувалися через щільне яєчне середовище з рН 6,5 («Нове» Мордовського) і з рН 7,0–7,2 (ДП «Ветеринарна медицина»). Для контролю використовували *M. bovis* штамів Vallee та BCG.

Для визначення вірулентності мікобактерій заражали двох морських свинок зависю збудника у дозі 1 мг/см<sup>3</sup> ізотонічного розчину.

Наявність корд-фактора досліджували за здатністю мікобактерій формувати мікроколонії у вигляді «кіс», «джгутів», «шнурів» тощо [4]. Для цього завись мікобактерій – 0,5 см<sup>3</sup> (1 мг/см<sup>3</sup> фізіологічного розчину) вносили у напівсинтетичне середовище Школьникової (шість пробірок) і культивували за температури 37°C упродовж 40 діб. На 15–20 та 35–40 добу з осаду кожних трьох пробірок готували мазки на предметних скельцях площею 2×6 см<sup>2</sup>, фарбували за Ціль-Нільсеном і досліджували під мікроскопом зі збільшенням ×150 та ×1500. Визначали морфологічні ознаки і тинкторіальні властивості мікобактерій, форму мікроколоній («коси», «косички», «джгути», «шнури», косопоподібні, гіллястопоподібні), максимальну ширину мікроколоній, щільність прилягання мікобактерій у мікроколоніях. За інтенсивністю формування мікроколонії були умовно поділені на 4 групи:

1. Мікроколонії, в яких мікобактерії розміщувалися дифузно, войлокоподібно (корд-фактор «–»).
2. Мікроколонії косопоподібної фор-

ми: такі скупчення мікобактерій тільки нагадували «коси» та «джгути» (корд-фактор «±»).

3. Мікроколонії у вигляді «кіс», «косичок», гіллястопоподібні завширшки до 15 мкм (корд-фактор «+»).

4. Мікроколонії у вигляді «джгутів», «шнурів», ширина яких сягала 15 мкм і більше (корд-фактор «++»).

## РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Встановлено, що вірулентні мікобактерії швидкорослого штаму (вихідної культури) та Vallee на 15–20 добу культивування формували чітко виражені «коси», які склалися з паралельно й щільно розташованих мікобактерій. На 35–40 добу інтенсивність мікроколоній збільшилася.

У мікобактерій швидкорослого штаму, пасажованих через живильне середовище з рН 6,5 та 7,0–7,2, відзначали здатність до утворення мікроколоній у вигляді «кіс». Але зі збільшенням кількості пасажів через живильне середовище відбувалося паралельне зниження вірулентності мікобактерій та інтенсивності формування ними характерних мікроколоній (табл. 1; рис. 1, 2). Так, після 60-разового пасажування мікобактерій через обидва яєчні середовища на 35–40 добу в обох культурах максимальна ширина «кіс» була до 10 мкм, що на 5 мкм менше, ніж у вихідної культури.

Авірулентні мікобактерії, які 100 разів пасажувалися через щільне середовище з рН 6,5, на 15–20 добу культивування мали ширину мікроколоній удвічі меншу порівняно з вихідними вірулентними. У той же час мікобактерії, що 100 разів пасажувалися через середовище з рН 7,0–7,2, спричинили загибель морських свинок наприкінці досліду з характерними для туберкульозу патолого-





Таблиця 1 – Корд-фактор *M. bovis* швидкорослого штаму, пасажованих через живильне середовище

Культура		Вірулентність мікобактерій <sup>1</sup>	Характеристика мікроколоній, доба					
пасаж, №	рН середовища		форма		максимальна ширина, мкм		щільність скупчення мікобактерій	
			15–20	35–40	15–20	35–40	15–20	35–40
Vallee	7,0–7,2	41–44	«Коси»	«Коси», «джгути»	10	15–17	Пухко, щільно	Щільно, пухко
1	7,0–7,2	37–39	«Коси»	«Джгути», «коси»	10	15	Щільно	Щільно
60	7,0–7,2	68–74	«Коси»	«Коси»	10	10	Щільно	Щільно
60	6,5	59–68	«Коси»	«Коси»	10	10	Щільно	Щільно
100	7,0–7,2	85–89	«Коси»	«Коси»	10	10	Щільно, пухко	Щільно, пухко
100	6,5	90 <sup>2</sup>	«Коси»	НД	5	НД	Щільно, пухко	НД
BCG	7,0–7,2	90 <sup>2</sup>	Скупчення 2–5 клітин	Косопоподібні	–	2–3	–	Пухко

Примітка. 1 – період життя заражених морських свинків; 2 – без видимих патолого-анатомічних змін в органах морських свинків; НД – не досліджувалися

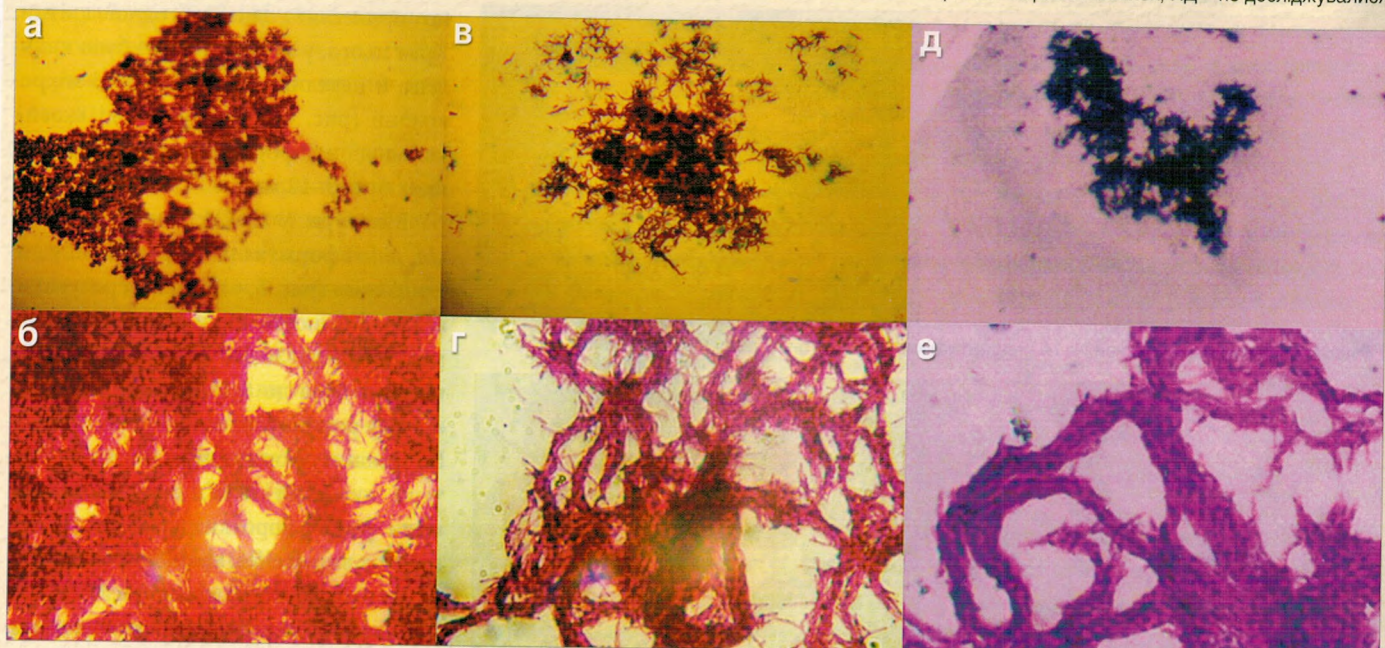


Рис. 1. Мікроколонії *M. bovis* швидкорослого штаму на 35–40 добу культивування: а та б – вихідної культури; в і г – пасажовані 60 разів через живильне середовище з рН 7,0–7,2; д та е – пасажовані 60 разів через живильне середовище з рН 6,5. ×150 та ×1500 відповідно

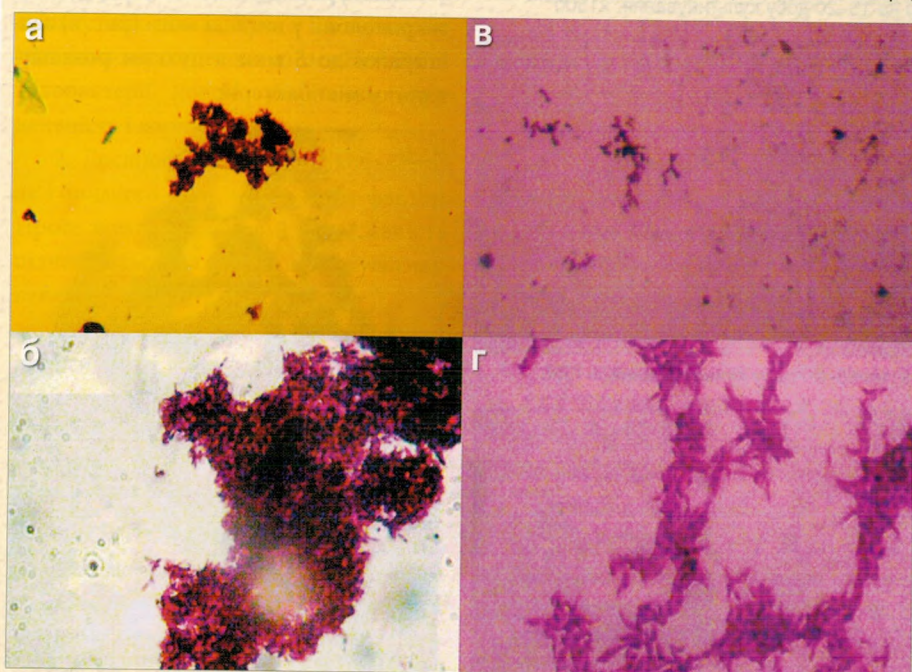


Рис. 2. Мікроколонії *M. bovis* швидкорослого штаму на 15–20 добу культивування: а та б – пасажовані 100 разів через живильне середовище з рН 7,0–7,2; в і г – пасажовані 100 разів через живильне середовище з рН 6,5. ×150 та ×1500 відповідно

анатомічними змінами. Максимальна ширина мікроколоній була практично однаковою з культурою, яка пасажувалася 60 разів через це ж середовище. У мікроколоніях мікобактерій із 100-го пасажу клітини розміщувалися пухко. Ці дані свідчать, що мікобактерії на щільному середовищі з рН 7,0–7,2 довше зберігають вірулентність і корд-фактор, ніж на середовищі з рН 6,5. На це вказують й інші дослідники [3].

*M. bovis* штаму BCG на 15–20 добу культивування не формували мікроколоній у вигляді «кіс». Розташування мікобактерій у мазках було дифузне та у вигляді різної форми скупчень з 20–100 клітин. Зі збільшенням терміну культивування мікобактерії вакцинного штаму формували скупчення клітин, які дещо нагадували «косички» (рис. 3). Такі пухкі косопоподібні утворення були завширшки 2–3 мкм і завдовжки до 80 мкм.



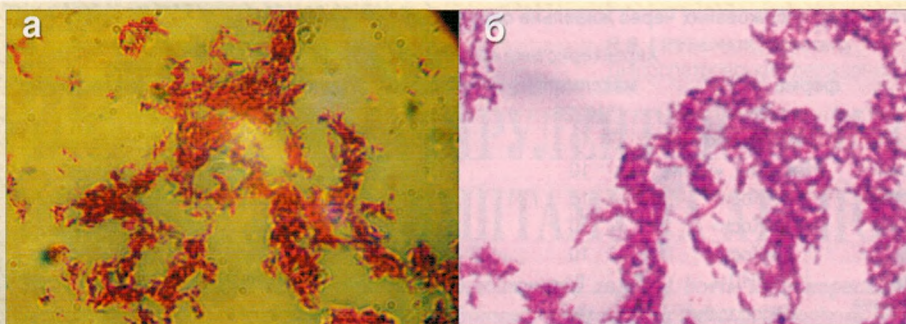


Рис. 3. Мікроколонії косоподібної форми штаму BCG на 35–40 добу культивування.  $\times 1500$

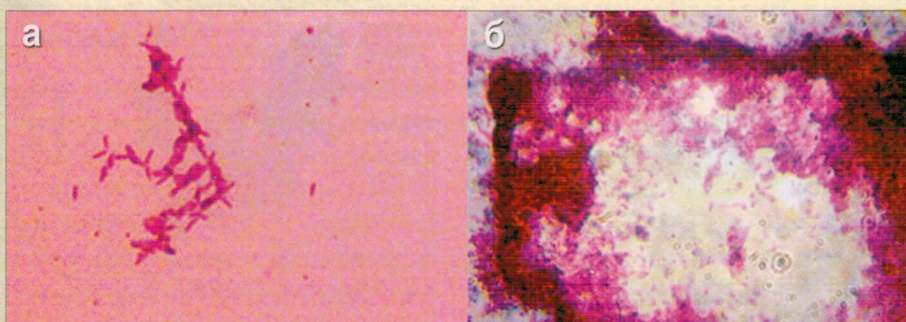


Рис. 4. Мікроколонії культури № 14 (неідентифікована) на 15–20 добу культивування.  $\times 1500$

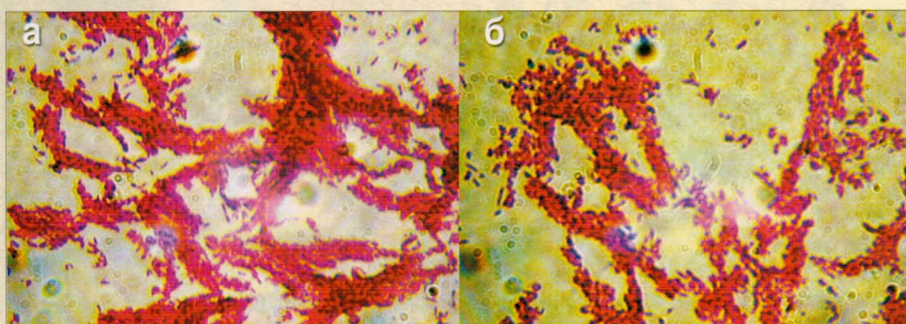


Рис. 5. Мікроколонії культури № 16 (*M. phlei*) на 15–20 добу культивування.  $\times 1500$

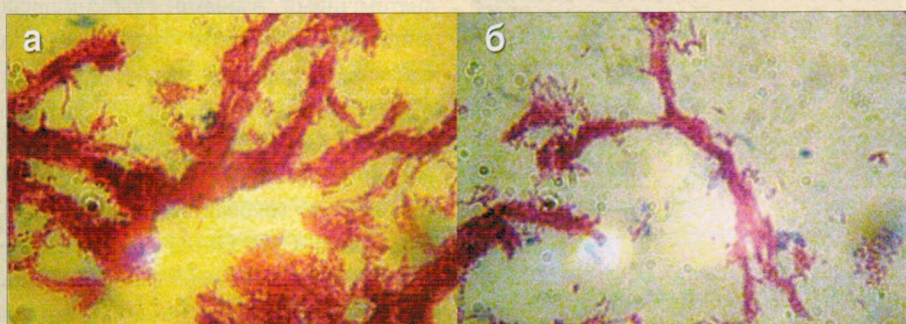


Рис. 6. Мікроколонії культури № 12 (*M. xenopi*) на 15–20 добу культивування.  $\times 1500$

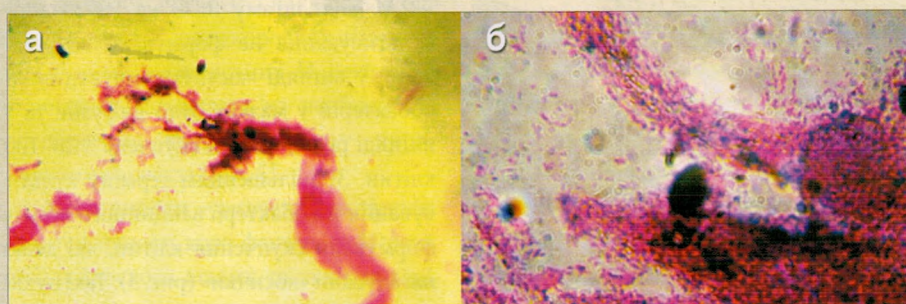


Рис. 7. Мікроколонії культури № 15 (*M. vacca*) на 15–20 добу культивування.  $\times 150$  та  $\times 1500$  відповідно

Отже, зі збільшенням кількості пасажів мікобактерій загалом знижуються вірулентність і вміст корд-фактора, хоча ці процеси інтенсивніші у мікобактерій, які пасажувалися на щільному середовищі з рН 6,5.

Атипові мікобактерії культур № 13 (*M. phlei*) і № 14 на 15–20 добу культивування у мазках розміщувалися дифузно та у вигляді невеликих безформних скупчень, які склалися з 20–70 щільно прилеглих одна до одної клітин. Крім цього, у культурі № 14 було виявлено й невеликі гіллястоподібні мікроколонії (рис. 4а) та поодинокі «коси» колоподібної форми (рис. 4б), ширина яких була 3–12 мкм.

Культури № 12 (*M. xenopi*) та № 16 (*M. phlei*) формували мікроколонії у вигляді «кіс» (рис. 5, 6) і характеризувалися практично подібними властивостями. Так, на 15–20 добу культивування їх ширина була до 5 мкм, мікобактерії у «косах» розміщувалися щільно (табл. 2). За межами сформованих «кіс» мікобактерії культури № 12, окрім паличок, мали форму коротких кислотостійких ниток з вираженою грануляцією. У той же час мікобактерії культури № 16 розміщувалися невеликими скупченнями та у «косах».

Культура № 15 (*M. vacca*) формувала мікроколонії у вигляді «кіс» (рис. 6) завширшки до 5 мкм з пухким розташуванням мікобактерій.

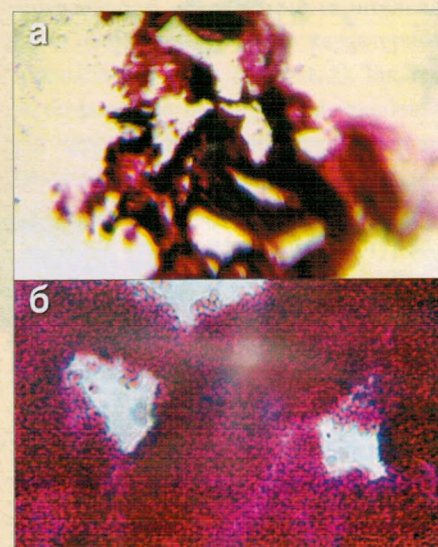


Рис. 8. Мікроколонії культури № 13 (*M. phlei*) на 15–20 добу культивування.  $\times 150$  та  $\times 1500$  відповідно





Таблиця 2 – Корд-фактор атипичних мікобактерій

Культура, №	Характеристика мікроколоній, доба					
	форма		максимальна ширина, мкм		щільність скупчення мікобактерій	
	15–20	35–40	15–20	35–40	15–20	35–40
13 ( <i>M. phlei</i> )	Скупчення 20–70 клітин	Джгути, «косички»	–	40	Щільно	Щільно
12 ( <i>M. xenopi</i> )	«Коси»	«Коси»	5	5	Щільно	Щільно
14 (неідентифікована)	«Коси»	Косоподібні «Коси»	3–12	2–3 5	Щільно	Пухко Щільно
15 ( <i>M. vacca</i> )	«Коси»	НД	2–5	НД	Щільно	НД
16 ( <i>M. phlei</i> )	«Коси»	НД	2–5	НД	Щільно	НД

Примітка. НД – не досліджувалися

На 35–40 добу культивування у мазках культури № 13 (*M. phlei*) виявлено мікроколонії у вигляді «кіс» і «джгутів», ширина яких становила до 40 мкм (рис. 8).

У культури № 14 спостерігали появу мікроколоній з більш характерною формою «кіс» і «джгутів» та численні косоподібні утворення мікобактерій.

Отже, з п'яти досліджених чотири (80%) культури атипичних мікобактерій (*M. vacca*, *M. phlei*, *M. xenopi* та неідентифікована) утворювали мікроколонії у вигляді «кіс» і «джгутів» (корд-фактор «+») на 15–20 добу культивування, а на 35–40 добу – всі п'ять (100%).

### ВИСНОВКИ

1. У *M. bovis* швидкорослого штаму за пасажів через живильне середовище знижується вірулентність та вміст корд-фактора, що підтверджує наявність зв'язку між ними. Проте на щільному живильному середовищі з рН 7,0–7,2 мікобактерії довше зберігають вірулентність і корд-фактор.

2. Досліджені атипичні мікобактерії, як і бичачого виду, мають корд-фактор. Проте його виявлення й інтенсивність підвищується на 35–40 добу культивування.

Перспективи досліджень. Вивчення інтенсивності корд-фактора *M. bovis* епізоотичних повільнорослих штамів і його взаємозв'язку з вірулентністю.

### СПИСОК

#### ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. **Алеб Мохамед Омар.** Значение микробиологических и биохимических методов для оценки вирулентности микобактерий : автореф. дис. ... канд. мед. наук: спец. 03.00.07 «Микробиология» / Алеб Мохамед Омар. – М., 1974. – 19 с.

2. **Білан М.В.** Швидкорослі *M. bovis* / М.В. Білан, О.А. Ткаченко // V Міжнародний конгрес спеціалістів ветеринарної медицини, 3–5 жовтня 2007 р. – К.: Вид-во НАУ, 2007. – С. 71–72.

3. **Зеленська М.В.** Ліпідний склад та вірулентність *Mycobacterium bovis*, виділених від великої рогатої худоби степової зони України: дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03 / М.В. Зеленська. – Одеса, 2006. – 164 с.

4. **Кочмарський В.А.** Удосконалення діагностики туберкульозу великої рогатої худоби та методичні підходи одержання вакцинних штамів мікобактерій: дис. ... докт. вет. наук: 16.00.03 / В.А. Кочмарський. – К., 2003. – С. 181–182.

5. **Ткаченко О.** Швидкорослі *M. bovis* у проблемі туберкульозу / О. Ткаченко // Ветеринарна медицина України. – 2004. – №7. – С. 14–17.

6. **Bloch H.** Studies on the virulence of tubercle bacilli / H. Bloch // J. Exp. Med. – 1950. – Vol. 91, №2. – P. 197–218.

7. **Cord formation in MB/BacT medium is a reliable criterion for presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex in laboratories with high prevalence of *M. tuberculosis* / F.Z. Badak, S. Goksel, R. Sertor [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1999. – Vol. 37, №12. – P. 4189–4191.**

8. **Cord formation in BACTEC 7H12 medium for rapid, presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex / P.V. Yagupsky, D.A. Kaminski, K.M. Palmer, F.S. Nolte // J. Clin. Microbiol. – 1990. – Vol. 28, №6. – P. 1451–1453.**

9. **Darzens E.** Cord-forming property, lethality and pathogenicity of *Mycobacteria* / E. Darzens, G. Fahr // CHEST. – 1956. – Vol. 30. – P. 642–648.

10. **Intact molecular characterization of cord-factor (trehalose-6,6-dimycolate) from nine species of *Mycobacteria* by MALDI-TOF mass spectrometry / Y. Fujita, T. Naka, M.R. McNeil, I. Yano // Microbiology. – 2005. – Vol. 151. – P. 3403–3416.**

11. **Kaminski D.A.** Selective utilization of DNA probes for identification of *Mycobacterium* species on the basis of cord formation in primary BACTEC 12B cultures / D.A. Kaminski, D.J. Hardy // J. Clin. Microbiol. – 1995. – Vol. 33, №6. – P. 1548–1550.

12. **Reliability of cord formation in BACTEC 12b/13a media for presumptive identification of *Mycobacterium tuberculosis* complex in laboratories with a high prevalence of *Mycobacterium tuberculosis* / O.K. Koksalan, D. Aydin, S. Eraslan, N. Bekiroglu // Eur. J. Clin. Microbiol. & Infect. Dis. – 2002. – Vol. 21, №4. – P. 314–317.**

Одержано 03.06.2011

#### Корд-фактор и вирулентность *Mycobacterium bovis* быстрорастущего штамма и атипических микобактерий. А.А. Ткаченко, В.В. Захарский, В.В. Глебенюк

Проведено исследование корд-фактора атипических микобактерий и *M. bovis* быстрорастущего штамма при пассажах через питательные среды с рН 6,5 и 7,0–7,2. Показано, что атипические микобактерии, как и *M. bovis*, способны при микрокультивировании в полусинтетической среде Школьниковой образовывать микроколонии в виде «кос» и «жгутов». По мере потери вирулентности *M. bovis* быстрорастущего штамма изменяют способность образовывать микроколонии в виде «кос».

#### Cord-factor and virulence *M. bovis* quickly growing and atypical mycobacteria. A. Tkauchenko, V. Zazharskiy, V. Glebenyuk

Research of the cord-factor atypical mycobacteria and *M. bovis* quickly growing strain at passag through nutrient mediums with pH 6,5 and 7,0–7,2 is conducted. It is shown that atypical mycobacteria, as well as *M. bovis*, are capable at microcultivation in semisynthetic medium Shkolnikovoj form microcolonies in the form of «cord». In process of loss virulence, *M. bovis* quickly growing strain change ability to form a microcolony in the form «cord».