

УДК 619:616.98:579.873.21
© 2017

О.А. ТКАЧЕНКО,
доктор ветеринарних наук

**М.В. БІЛАН,
І.М. ШЕНДРИК,**
кандидати ветеринарних наук

Ю.В. СЕВЕРИНА,
студентка

Дніпропетровський державний
аграрно-економічний університет,
Україна
E-mail: epizooodaeu@gmail.com
вул. С. Єфремова, 25, м. Дніпро

ОЗНАКИ ТА ВЛАСТИВОСТІ
Mycobacterium bovis
В АСПЕКТІ
ШТАМОВИХ ВІДМІННОСТЕЙ

Наведено матеріали багаторічних досліджень M. Bovis, які свідчать про складність визначення штамових особливостей. Показано, що вона ґрунтується на біологічному циклі розвитку. Акцентовано увагу на необхідності за визначення штаму оцінювати біологічні властивості конкретної субкультури мікроорганізмів, особливо за динамічного біологічного циклу розвитку. Стверджується, що морфологічні форми певних стадій розвитку володіють специфічними біологічними властивостями, які впливають на штамові особливості.

Ключові слова: штам, туберкульоз, мікобактерії, L-форми, дисоціація, біологічний цикл.

Постановка проблеми. Штам (від нім. Stamm – стовбур, основа, рід) – в енциклопедичному виданні визначається як “генетично однорідна культура мікроорганізмів з однаковими морфологічними ознаками та біологічними властивостями, виділена із певного джерела і підтримувана в пересівах” [9]. Підкреслено, що бактерії і віруси одного і того самого виду можуть мати істотні штамові відмінності.

Проте інколи недостатньо зрозуміло, як визначати й оцінювати культури мікроорганізму зі зміненими ознаками, властивостями, які одержані з вихідного штаму за пересівів через штучне живильне середовище чи макроорганізм.

Мета роботи: на підставі даних біологічного циклу розвитку *M. bovis* у динаміці

багаторазових пересівів через штучне живильне середовище обґрунтувати штамові відмінності певних морфологічних форм мікроорганізмів.

Матеріали та методи досліджень. У багаторічній роботі досліджували вихідний високовірулентний штам *M. bovis*, виділений з біологічного матеріалу реагуючої на туберкулін (ППД) для ссавців корови. У динаміці 240 пересівів вивчали основні біологічні властивості мікобактерій, їх ліпідний склад за традиційними методиками ветеринарної медицини.

Результати дослідження та їх обговорення. Найбільш показовим прикладом штамових відмінностей може бути VCG, селекціонованих Кальметтом і Гереном із вірулентного штаму *M. bovis*. У процесі

багаторазового пасажування останніх через штучне живильне середовище вченим удалось одержати змінені мікобактерії, які втратили (або суттєво знизили активність) ген вірулентності, але зберегли імуногенність та здатність розмножуватися. Ця особливість поряд з іншими (які безперечно супроводжують процес селекціонування), у тому числі й мутація генів, визначила можливість стверджувати про одержання згаданими дослідниками штаму мікобактерій. Тобто неатенуйованого варіанта чи субштаму вихідного вірулентного штаму, а окремого штаму з відповідними властивостями. Тривале зберігання, відповідно багаторазові за різних умов пересіви, в країнах світу, в які було доставлено селекціоновані Кальметтом та Гереном мікобактерії, сприяло появі нових штамів, що відрізняються від вихідного штаму BCG. За цього сучасні штами в тій чи іншій країні є генетично поліморфні та за своєю морфологією, імуногенністю, вірулентністю та іншими властивостями різняться між собою. Одні зі штамів знизили імуногенність, інші набули певної вірулентності, деякі, можливо, на цьому тлі змінили морфологію, тинкторіальні властивості. Усе це, й незаперечно інше, визначило певні штами BCG: Russia (Moscow), Japan (Tokio), Moreau (Brazil, Rio), Sweden (Gothenburg), Birkhaug, Danish (Denmark, Copenhagen), Prague (Czechoslovakian), Glaxo (London), China, Phipps (New York, Park, Philadelphia), Tice (Chicago), Frappier (Montreal), Pasteur (Paris, French), Bulgaria (Sophia), Connaught (Toronto) та ін. [26, 27].

З першого погляду все ясно й зрозуміло. Проте на тлі мутації чи модифікації генетичного коду мікроорганізмів штаму BCG за пасажів через штучне живильне середовище (які й визначають відмінності між штамми) відбувається конверсія в наступну морфологічну форму. Але як тоді можна стверджувати, що штам BCG, генетично мutowаний, який до введення в макроорганізм представлений у формі паличок (кислотостійких), зерен, ниток, за час персистенції (3–4 міс.), якщо він трансформується в L-форми (везикулярні форми) з різною оптичною густиною поверхні. Тобто численними до-

слідами в цьому контексті встановлено, що бактеріальна форма мікроорганізму штаму BCG є однорідною, із закріпленими на генетичному рівні змінами. Проте мутація генів мікобактерій штаму BCG не є стабільною за персистенції в тканинах макроорганізму. Така мутація не впливає (не попереджає, не стабілізує) на природний біологічний цикл розвитку *M. bovis* узагалі. Це зумовлено мутацією певних генів, що відповідають за конкретні властивості й, напевно, вона не стосується біологічного циклу розвитку, а тільки вірулентності за збереження імуногенності. Наші дослідження в цьому напрямі засвідчили, а деякі моменти підтверджені й іншими дослідниками, що передостанньою стадією біологічного циклу розвитку *M. bovis* узагалі є L-форми сферопластного, протопластного типу з різною оптичною густиною поверхні [2, 14, 19, 20, 25]. Такі форми збудника можуть культивуватися на штучних живильних середовищах. Кінцевою стадією складного біологічного процесу розвитку є елементарні тільця (звільняються з перехідних, адаптивних ниткоподібних та овальних L-форм) – вони не культивуються або погано культивуються на штучних живильних середовищах, а отже, і не ідентифікуються [16]. Тобто, якщо мікобактерії штаму BCG вибірково генетично мutowані, про що існує багато повідомлень, то в макроорганізмі вони зберігають певну здатність змінюватися, принаймні морфологічно. Подібне виявляється і з іншими штамми.

Українські дані, отримані нами й при дослідженні біологічного циклу розвитку некіслотостійких зернистих паличкоподібних форм *M. bovis*. Цей штам мікобактерій одержаний з вірулентного штаму збудника туберкульозу. Морфологія таких форм була стабільною протягом 40–50 пересівів через штучне живильне середовище [19].

Проте, провівши пасажі таких морфологічних форм мікобактерій через організм морських свинок, встановлено, що за другого та третього пасажів в організмі дослідних тварин персистують не зерна та короткі некіслотостійкі палички, а L-форми везикулярного та протопластного типу, які в подальшому з однієї клітини на штучному живильному середовищі конвертують в нитко-

подібні форми, з яких звільняються елементарні тільця так само, як із L-форм – овалів з різною оптичною густиною поверхні.

Поряд з цим на третьому пасажі в організмі морських свинок (термін досліду три місяці) виявлено розвиток інфекційного процесу туберкульозу, який ідентифікувався гістологічними дослідженнями біологічного матеріалу від них [11].

З'ясовуючи біологічні властивості швидкорослого високовірулентного штаму *M. bovis* [ріст колоній в перших субкультурах (генераціях) на 2–4 добу] у динаміці численних пересівів виявлено [21], що поряд з особливостями швидкості формування колоній на штучному живильному середовищі через 40–60 пересівів на тлі кислотостійких мікобактерій почали з'являтися некіслотостійкі палички, згодом поряд з ними – ниткоподібні некіслотостійкі форми. Того ж часу швидкість утворення колоній на середовищі рН 7,3 дещо сповільнилася (з 19–24 пересіву) натомість на такому з рН 6,5–6,7 – тільки на 115–120 [1]. Це свідчить про те, що середовище, на якому мікобактерії розмножуються, сприяє зміні біологічних властивостей: в одних випадках сповільнюється обмін речовин у мікробній клітині, в інших спостерігається на попередньому рівні або ж пришвидшується. Звичайно, інтенсивність обміну речовин (якщо це тривалий період його підтримання за певних умов) може суттєво впливати на синтетазні системи мікробної клітини взагалі та призводити до загальних зрушень біологічної активності мікроорганізму [6, 7].

Паралельно з традиційними формами мікобактерій популяції перших генерацій утворюються й адаптивні їх варіанти (некіслотостійкі палички та ниткоподібні форми). Відомо, що культури патогенних мікобактерій, які виділені з біологічного матеріалу реагуючої на туберкулін (ППД) для ссавців великої рогатої худоби одного господарства, мають різну вірулентність, що може свідчити про різні штами збудника туберкульозу, які циркулюють у певному стаді тварин. І не тільки від різних тварин. Існують повідомлення про персистенцію мікобактерій одного виду, але з різною вірулентністю в одному макроорганізмі, тобто в процесі розмно-

ження мікобактерій в тканині з'являються такі з високою чи низькою вірулентністю. Традиційно відомо, що пасажі мікобактерій через організм морських свинок, чутливих до цього виду збудника, сприяють підвищенню вірулентності. Проте, досліджуючи ідентифікований та вивчений нами швидкорослий штам мікобактерій перших генерацій в динаміці прямих пасажів через організм морських свинок, встановлено, що існують й такі штами, які не вписуються в загальну думку дослідників. Так, протягом десяти пасажів через організм морських свинок зареєстровано поступове скорочення тривалості інфекційного процесу до п'ятого пасажу, а в наступних – подовження; і вже на десятий патолого-анатомічно хвороба не виявлялася, але стан алергії збудник стимулював [8].

Такі результати прямих пасажів мікобактерій швидкорослого штаму через організм морських свинок, з однієї сторони, визначають особливості конкретного штаму, а з іншої, суперечать думці, що з кожним пасажем підвищується ступінь ураження тварин, оскільки інколи з окремими штамами все відбувається навпаки. Виявилось, що в організмі морських свинок, чутливих до *M. bovis*, високовірулентний штам динамічно втрачає свою агресивність.

Того ж самого часу можна стверджувати, що змінена певна властивість у мікроорганізмі в динаміці пасажів чи під впливом інших чинників, яка традиційно ідентифікується у вихідного материнського штаму, може характеризувати певний штам, навіть якщо така властивість гіпотетично може змінитися.

Безумовно, на визначення штаму впливають й швидкість розмноження, здатність культивуватися на середовищах. Саме тому традиційним вважається наявність повільнорослих й швидкорослих штамів, зокрема [5, 10, 19]. Мікобактерії бичачого виду, штами, які культивуються на одних середовищах й не культивуються на інших (із натрієм саліцилово-кислим), свідчить про певні зміни в синтетазних системах, які відбулися внаслідок активізації одних й пригнічення інших генів мікроорганізму.

Вочевидь, такі особливості біологічної активності певних штамів пов'язані з хіміч-

ною будовою мікробної клітини. І це правдоподібно, так як регуляція вмісту хімічних речовин клітинної оболонки тісно пов'язана з активністю певного гена й прямо вказує на інтенсивність метаболізму клітини в цілому. Так, зниження вмісту загальних ліпідів з 8–10 % до 2–3 % супроводжується зниженням ступеня вірулентності аж до повної втрати [3, 4, 12, 22]. І, як свідчать дослідження, триразові прямі пасажи мікобактерій через організм морських свинок не призводять до поновлення вихідної патогенності. Звичайно, що не тільки вміст загальних ліпідів може визначати та характеризувати той чи інший штам.

Динамічні зрушення вмісту загальних ліпідів свідчать й про інші процеси, які відбуваються в мікробній клітині, про перебудову синтетазних систем у тих чи інших умовах. Проте фракції загальних ліпідів, незалежно від рівня їх загального вмісту, якісно стабільні, але кількісно динамічно змінюються, що, правда, не завжди зі статистичною достовірністю. Це підтверджує, що фракції ліпідів не можуть характеризувати відмінності штаму мікобактерій [3, 4, 22, 24].

Водночас за окремими показниками ліпідів все ж таки можна встановити штамові особливості. Це вміст вільних жирних кислот [3, 4]. Дослідженнями доведено, що на тлі динамічних змін культуральних, біохімічних властивостей та морфології мікобактерій, які призводять до суттєвого зниження вірулентності мікобактерій, перелаштовується якісний склад та кількісний вміст вільних жирних кислот: у вірулентних штамів превалюють довголанцюгові, а в слабковірулентних чи атипових – коротколанцюгові вільні жирні кислоти. До того ж не тільки знижується вміст довголанцюгових кислот, але й спостерігається їх зникнення з більшим числом атомів вуглецю до рівня ($C_{23:0}$ – $C_{27:0}$), не діагностованого за хроматографічним методом.

Як бачимо, детекція мікобактерій за вмістом ліпідів може свідчити про новий штам, оскільки мікобактерії з таким хімічним складом набувають й нових властивостей, непридатних материнському вихідному штаму. З таким умістом ліпідів, зокрема вільних

жирних кислот, ідентифікуються мікобактерії, які виділяються (ізолюються з біологічного матеріалу) з організму інших тварин; і в цьому випадку стверджується, що виділено штам мікобактерій, які характеризуються тими чи іншими показниками. Звичайно, хімічний склад мікроорганізму безпосередньо зв'язаний з метаболізмом мікробної клітини, що визначає її біологічну активність в цілому та здатність проявляти (набувати) нову властивість, яка забезпечує виживання в довікллі. Безпосередню участь у цих складних й доки ще остаточно нез'ясованих процесах беруть гени. Саме вони регулюють, активізують чи пригнічують, адаптивні процеси мікобактерій та визначають прояв необхідної здатності до виживання в певних умовах. На цьому тлі можуть з'являтися ще не ідентифіковані властивості: здатність розмножуватися за низьких плюсових температур, на простих живильних середовищах, з умістом різних індикуючих речовин [13, 17, 23].

Такі властивості мікобактерій, навіть за умови їх тимчасовості, можуть визначати специфічність штаму, оскільки ці мікроорганізми володіють досить високою лабільною здатністю. Адже змінена біологічна активність, здатність інтенсивно розмножуватися на простих живильних середовищах закріплюється досить стійко, бо протягом 140 пересівів через елективне живильне середовище вона не втрачалася. Водночас змінені мікобактерії розмножуються й на простих живильних середовищах. Цей феномен, за умови відсутності чи присутності інших описаних вище незвичайних властивостей, також може свідчити про особливість штаму мікобактерій.

У досліджених мікроорганізмів, без сумніву, змінюється біохімічна активність (чинники невідомі). Результати досліджень доводять, що окремі штами мікобактерій дисоціативних форм володіють вищою ферментативною активністю, ніж мікроорганізми материнського штаму *M. bovis*, та підтверджують набуття ними підвищених ферментативних властивостей (каталазна, пероксидазна, дегідрогеназна), які непридатні патогенним мікобактеріям, натомість характерні атиповим.

Відомо, що штамові особливості мікобактерій можуть включатися й за можливості утворювати корд-фактор, оскільки одні вірулентні штами збудника його утворюють,

інші ж позбавлені такої здатності, натомість окремі види атипових мікобактерій достатньо інтенсивно формують “косички” та “джуги” [15].

Висновки

Деякі аспекти біологічних властивостей мікобактерій бичачого виду, досліджених у динаміці численних пересівів через штучне живильне середовище, організм морських свиней свідчать про різноманітність та складність детекції штаму, особливо за умови біологічного циклу розвитку мікроорганізму [18, 25]. Морфологічні форми окремих стадій розвитку мають свої особливі біологічні властивості, свою активність у біологічному світі. За таких обставин наступна субкультура, навіть з адаптивними морфологічними формами,

одержана від материнського патогенного (різного ступеня вірулентності) штаму за окремими, а можливо, зі значно зміненими властивостями, може вважатися як новий штам, одержаний з певного джерела: чи то макроорганізм, чи то материнська субкультура (культура) мікроорганізмів, зокрема мікобактерій.

Штамові відмінності визначаються певними специфічними біологічними властивостями конкретної популяції, раси мікобактерій (мікроорганізмів) субкультури незалежно від того, з якого джерела вони отримані.

Бібліографія

1. Адаптивна здатність *M. bovis* на щільних яєчних живильних середовищах з різним рН / О.А. Ткаченко, Г.І. Хільченко, М.В. Зеленська [та ін.] // *Вет. медицина України*. – 2004. – № 7. – С. 18–21.
2. Аспекти морфогенезу та культуральні й тинкторіальні властивості *M. bovis* дисоціативних форм за різних температур культивування / О.А. Ткаченко, І.М. Шендрик, В.В. Місків [та ін.] // *Вет. медицина: міжвідомчий тематичний науковий збірник*. – 2013. – № 97. – С. 143–144.
3. Білан М.В. Вільні жирні кислоти – фактори патогенності *M. bovis* / М.В. Білан, О.А. Ткаченко, Л.О. Ковальова // *Вет. науки: зб. наук. праць Луган. НАУ, присвячений 10-річчю заснування факультету вет. медицини*. – Луганськ, 2007. – № 78/101. – С. 613–620.
4. Білан М.В. Порівняльна характеристика вільних жирних кислот *M. bovis* / М.В. Білан, О.А. Ткаченко, Л.О. Ковальова // *Проблеми зооінж. та вет. медицини: зб. наук. праць ХДЗВА, присвячений 100-річному ювілею кафедри мікробіології та біотехнології ХДЗВА*. – Харків: РВВ ХДЗВА, 2007. – Вип. 15 (40), т. 1, ч. 2. – С. 85–90. – (Серія: Вет. науки).
5. Біологічна активність епізоотичних та музейних штамів *M. bovis* / О.А. Ткаченко, Н.Г. Усєєва, В.В. Глебенюк, О.М. Кулішенко // *Науковий вісник Львівського НУВМ та БТ ім. С.З. Гжицького*. – 2007. – № 3(34), ч. 1, т. 9. – С. 218–224.
6. Біологічні властивості дисоціативних форм *M. bovis*: культуральні особливості за температур 3 і 37° С / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, В.В. Місків [та ін.] // *Вет. медицина України*. – 2010. – № 3. – С. 33–35.
7. Біологічні властивості дисоціативних форм *M. bovis*: морфологічні ознаки та тинкторіальні властивості за температур 3 та 37° С / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, В.В. Зажарський [та ін.] // *Вет. медицина України*. – 2010. – № 12. – С. 27–30.
8. Вільні жирні кислоти *M. bovis* та інфекційний процес / В. Бусол, О. Ткаченко, М. Зеленська, Л. Ковальов // *Вет. медицина*. – 2007. – № 3. – С. 10–13.
9. *Ветеринарный энциклопедический словарь* / Под ред. В.П. Шишкова. – М.: Советская энциклопедия, 1981. – 576 с.
10. Глебенюк В.В. Видова належність мікобактерій, виділених від тварин у Дніпропетровській області [Електронний ресурс] / В.В. Глебенюк, К.В. Теліженко // *Науково-технічний бюлетень НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК*. – 2015.

- Т. 3, № 1. – С. 61–64. – Режим доступу: <http://www.biosafety-center.dp.ua/>
11. Глебенюк В.В. Мікроструктурні зміни органів морських свинок, заражених дисоціативними варіантами *Mycobacterium bovis* швидкорослого штаму / В.В. Глебенюк, О.Г. Глебенюк, Ю.О. Верченко // Вісник Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету. – 2016. – № 2(40). – С. 62–65.
12. Давиденко П.О. Ліпідний склад *M. bovis* дисоціативних форм, пасажованих через щільне живильне середовище з рН 7,1 за різних температур культивування / П.О. Давиденко, О.А. Ткаченко // Матеріали III Всеукр. з'їзду екологів з міжнар. участю [“Екологія–2011”] (Вінниця, 2011 р.) / М-во освіти і науки, молоді та спорту України; М-во екології та природн. ресурсів України; Вінницький національний техн. ун-т [та ін.]. – Вінниця, 2011. – Т. 2. – С. 485–488.
13. Закономірність морфологічних ознак та тинкторіальних властивостей *M. bovis* дисоціативних форм від температури культивування / О.А. Ткаченко, П.О. Давиденко, В.В. Місків [та ін.] // Збірник наук. праць Луган. НАУ. – 2011 – № 31. – С. 212–216.
14. Елементарні тільця в біологічному циклі *M. bovis* / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, Л.О. Ковальова [та ін.] // Наук.-техн. бюлетень ін-ту біології тварин і держ. наук.-дослідн. контрольного ін-ту ветпрепаратів та корм. добавок. – Львів, 2009. – Вип. 10, № 4. – С. 212–216.
15. Корд-фактор та вірулентність *Mycobacterium bovis* швидкорослого штаму та атипичних мікобактерій / О.А. Ткаченко, В.В. Зажарський, В.В. Глебенюк // Вет. медицина України. – 2012. – № 3 – С. 10–13.
16. Лабораторна діагностика туберкульозу тварин: практичний посібник / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, В.В. Зажарський, Л.О. Ковальова. – Дніпропетровськ: Вид-во “Свідлер А.Л.”, 2010. – 208 с.
17. Ліпідний склад дисоціативних форм *M. bovis* / О.А. Ткаченко, П.О. Давиденко, В.В. Зажарський [та ін.] // Вет. медицина України. – 2011. – № 11. – С. 33–35.
18. Морфологічні особливості реверсії некіслотостійких *M. bovis* у бактеріальну кислотостійку форму / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, П.О. Давиденко [та ін.] // Вет. медицина України. – 2009. – № 6 – С. 28–30.
19. Поліморфізм і мінливість *M. bovis* швидко- та повільнорослих штамів / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, В.В. Зажарський [та ін.] // Вет. медицина України. – 2009. – № 3. – С. 30–33.
20. Ткаченко О.А. Швидкоростучі *M. bovis* у проблемі туберкульозу / О.А. Ткаченко // Вет. медицина України. – 2004. – № 7. – С. 14–17.
21. Ткаченко О.А. Біохімічний склад швидкорослого штаму *M. bovis* в залежності від тривалості пасажування / О.А. Ткаченко, В.О. Бусол, М.В. Зеленська [та ін.] // Вет. медицина України. – 2006. – № 2. – С. 20–22.
22. Ткаченко О.А. Вільні жирні кислоти *M. bovis* та інфекційний процес / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, В.О. Бусол [та ін.] // Вет. медицина України. – 2007. – № 3. – С. 10–13.
23. Ткаченко О.А. Вплив температури культивування на вірулентність мікобактерій / О.А. Ткаченко, В.В. Глебенюк // Вісник Дніпропетровського державного аграрного університету. – 2008. – № 2. – С. 112–114.
24. Ткаченко О.А. Вплив пасажу через морських свинок на біологічну активність та ліпідний склад *M. bovis* швидкорослого штаму / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, В.В. Глебенюк // Науковий вісник Львівського НУВМ та БТ ім. С.З. Гжицького. – 2008. – Т. 10, № 2(37), ч. 2. – С. 262–267.
25. Ткаченко О.А. Біологічний цикл розвитку *Mycobacterium bovis* / О.А. Ткаченко // Вет. медицина України. – 2014. – № 10. – С. 15–20.
26. Influence of BCG vaccine strain on the immune response and protection against tuberculosis / Nicole Ritz, Willem A. Hanekom, Roy Robins-Browne [et al.] // FEMS Microbiol Rev. – 2008. – Vol. 32, № 2. – P. 821–841.
27. Variable virulence and efficacy of bcg vaccine strains in mice and correlation with genome polymorphisms / Lu Zhang, Huan-wei Ru, Fu-zeng Chen [et al.] // Molecular Therapy. – 2016. – Vol. 24, № 2. – P. 398–405.