

## **Закономірності поліморфізму та мінливості *M. bovis* швидко- та повільнорослих та повільнорослих штамів**

О.А. Ткаченко, доктор ветеринарних наук  
М.В. Білан, В.В. Зажарський, кандидати ветеринарних наук  
Н.Г. Усеева, старший викладач  
Л.О. Ковальова, лікар ветмедицини  
Ю.М. Таран, П.О. Давиденко, аспіранти

*Показано, що M. bovis швидко- та повільнорослих штамів можуть дисоціювати в некіслотостійкі нитко- та паличкоподібні форми. У деяких випадках вони з'являються вже в першій генерації у разі посіву суспензії біологічного матеріалу, в інших – після тривалих пасажів через щільні живильні середовища.*

Різноманітність форм мікобактерій туберкульозу, які виявляли автори [1–4, 6, 7, 9] попередніх десятиліть, свідчить про поліморфізм та мінливість збудника хвороби. Проте й дотепер невідомі або остаточно нез'ясовані фактори, які призводять до появи, відмінних від діагностичної, інших 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 та оздоровчих протитуберкульозних заходів.

**Метою** роботи було дослідити вплив у динаміці 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-ти проб патолого-анатомічно не змінених лімфатичних вузлів, відібраних від великої рогатої худоби, реагуючої на ППД-туберкулін для ссавців, тривало неблагополучного щодо туберкульозу господарства. Передпосівний матеріал готували за методом В.А. Матузенка й співавт. [8].

Ступінь вірулентності *M. bovis* визначали заражаючи традиційним методом морських свинок (маса тіла 250–300 г), суспензією з лімфатичних вузлів (1 см<sup>3</sup>) або зависсю мікобактерій виділених культур (1 мг/см<sup>3</sup> фізіологічного розчину).

Поліморфізм та мінливість *M. bovis* швидко- та повільнорослих музейних та епізоотичних штамів досліджували в динаміці пасажів, використовуючи стандартне щільне ячне середовище (ДП “Ветеринарна

медицина”, м. Харків) з рН 7,1–7,2 та таке саме з підвищеним вмістом кислотних грам-еквівалентів – 6,5 та 6,7.

Для цього висів зависі мікобактерій, приготовленої в розрахунку 1 мг/см<sup>3</sup> фізіологічного розчину, проводили на одне і те ж середовище в об’ємі дві бактеріологічні петлі кожної із шести пробірок трьох варіантів досліду за традиційною у ветеринарній медицині методикою. Ріст колоній мікобактерій оцінювали перші сім діб щодоби, а в подальшому – один раз на тиждень.

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

**Результати досліджень.** Після висіву суспензії з лімфатичних вузлів 13-ти корів, реагуючих на алерген, колонії мікобактерій на середовищі з рН 7,1–7,2 виявлені у восьми (61,5 %) пробах на 12–30 добу (табл. 1), при цьому тільки три культури мікобактерій виростили в перші 20 діб.

### **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

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

Морфологія колоній – кольору слонової кістки, гладенькі, з рівними краями, сухуваті (в перші десять діб росту). Мікроскопія мазків, приготовлених з культур мікобактерій, засвідчила наявність червоних паличок довжиною 1–2, шириною 0,1–0,3 мкм з незначно вираженою грануляцією (в одній мікобактерії інколи знаходилася гранула).

Одержані дані підтвердили, 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 виділені штами *M. bovis* віднесені до середнього, оскільки морські свинки, реагуючи на туберкулін, загинули від генералізованої форми туберкульозу за 35–45 діб.

З досліджених в динаміці пересівів *M. bovis* восьми штамів (табл. 2) три (37,5 %), зі збільшенням кількості пасажів, стабільно формували колонії на другу–шосту добу після висіву на середовище зависі мікобактерій. Мікобактерії іншої частини штамів традиційно залишалися повільнорослими. Водночас з другої генерації мікобактерій, протягом подальших дев’яти, колонії формувалися на середовищі з рН 6,5 у середньому на 7,4 доби, з рН 7,1 – на 9,4 доби, що свідчить про повільніше розмноження досліджуваних

мікобактерій на середовищі, яке вміщує менше кислотних грам-еквівалентів.

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

## 2. Швидкість формування колоній *M. bovis* епізоотичних штамів (доба)\*

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

\*рН середовища: чисельник – 6,5; знаменник – 7,1.

Мікроскопія мікобактерій восьмої генерації усіх 16 варіантів штамів, культивованих на середовищі з різним рН показала, 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. Тобто 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 самі, але з менш помітною зернистістю, некислотостійкі палички й ниткоподібні мікобактерії. У той же час ледь помітні, поодинокі, некислотостійкі 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 дослідження мікобактерій штамів за № 7 та № 8. Перший в 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 другу–третю добу).

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

### 3. Ріст колоній *M. bovis* на щільному середовищі за багаточисельних пересівів одно–тридобові культури

Пересіви мікобактерій	Строки появи колоній, день				
	штам № 7		штам № 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			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			-	-	-

Як засвідчили дослідження (табл. 3), мікобактерії штаму за № 7 протягом 60 пересівів змінили швидкість розмноження в бік сповільнення і залишилися повільнорослими, у той час як у варіантів мікобактерій штаму за № 8 протягом дослідів встановлені динамічні суттєві відмінності: на середовищі з рН 7,1 – зниження строків формування колоній з 19-го пасажу, що визначило у подальшому як повільно росли; на середовищі з рН 6,7 та 6,5 це явище виявлено тільки на 109–120 пересівах. Саме тому на останніх середовищах одержано 180 генерацій швидкорослого штаму, а на середовищі з рН 7,1 тільки 132. Водночас, якщо культурально-морфологічні властивості у *M. bovis* штаму за № 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 до того чи іншого штучного живильного середовища. За досить тривалий період спостереження форми колоній змінювалися від дрібних, сухуватих, поодиноких до більш великих і вологих зі суцільним ростом за тривалого культивування до незначного росинчастого (“димка”, “наліт”) росту в останніх 20-ти генераціях по лінії посіву завдяки мікобактерій за стабільності кольору культури. Але в цілому на 14 добу 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 тільки на 21–28 добу спостереження, що свідчить про більш негативний вплив такого вмісту кислотних грам-еквівалентів на адаптивну здатність *M. bovis* до 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

змінювалися. На середовищі з рН 6,5 та 6,7, розпочинаючи з 90-тої генерації, в полі зору мікроскопа відмічалися товсті й тонкі, зернисті, короткі й довгі сегментовані палички червоного кольору та ледь помітні поодинокі паличко- та ниткоподібні некіслотостійкі, з нечіткою зернистістю форми. Зі 145-го пасажу з'явилися на фоні традиційних кислотостійких коротких й довгі форми мікобактерій, але з менш інтенсивно зафарбованою оболонкою, ніж в умовах перших пересівів. Це може свідчити про зміну біохімічного складу клітинної оболонки. Кількість некіслотостійких форм збудника та інтенсивність їх забарвлення залишалися на попередньому (90-та генерація) рівні.

*M. bovis* 168-ої генерації на середовищі з рН 6,7 стимулювали бурхливий, інтенсивний ріст R-колоній (рис. 1), подібних до штаму за № 5, описаного на першому етапі досліджень. Мікроскопія виявила кислотостійкі, різних розмірів форми збудника, у тому числі й не кислотостійкі, з нечітко вираженою зернистістю.



**Рис. 1. *M. bovis* R-форма колоній**

На 169-ій генерації горбкуватоподібного росту колоній мікроскопічно виявлено як кислотостійкі, так і чітко сформовані некіслотостійкі форми мікобактерій. Некіслотостійкі мікобактерії ниткоподібної форми превалювали над кислотостійкими у співвідношенні 10 : 1.

Досліджуючи культуру на 170-ій і подальших генераціях, в полі зору мікроскопа виявляли як кислотостійкі палички, так і некіслотостійкі паличко- та ниткоподібні форми мікобактерій. Поява некіслотостійких форм мікобактерій змінила зовнішній вигляд, структуру, форму колоній та строки їх формування. Якщо до виникнення чітко сформованих некіслотостійких поліморфних форм кислотостійкі мікобактерії формували на середовищі окремі колонії з подальшим суцільним ростом по лінії посіву, то мішані, особливо на першій стадії явища, стимулювали “росинчастий” ріст культури по лінії посіву.

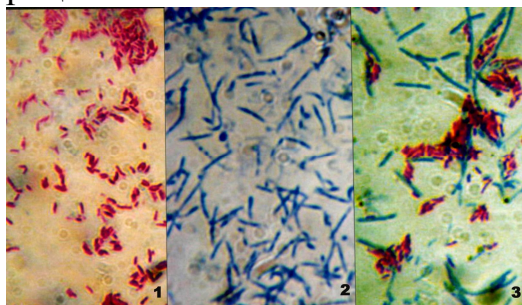
Практично ідентичні зміни зафіксовані й у *M. bovis* швидкорослого штаму, який пасажувався через штучне живильне середовище з рН 6,5. Але поява чітко сформованих некіслотостійких поліморфних мікобактерій відмічена на 176-ій генерації, тобто на дев'ять пасажів пізніше, ніж на середовищі з рН 6,7. Культура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

На середовищі з рН 7,1 варіант швидкорослого штаму *M. bovis* так само, як і два попередні, з появою некіслотостійких форм збудника стимулював

“росинчасту” культуру (наліт) по лінії висіву зависі. Проте чітка трансформація мікобактерій в некіслотостійкі форми відмічена на 124-му пересіві, тобто набагато раніше, ніж в двох попередніх випадках, з тенденцією деякого пришвидшення росту культури (наліт). На цьому середовищі поодинокі, нечітко сформовані, некіслотостійкі форми мікобактерій так само, як і на інших двох, відмічалися значно раніше, до появи чітко сформованих трансформованих форм (за 60 пересівів).

Паралельно зміні форми й структури колоній, морфологічних і тинкторіальних властивостей у пасажованих мікобактерій через середовище 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, у той час як інші, які були заражені *M. bovis*, що пасажувалися через середовище з рН 7,1, загинули від туберкульозу протягом 50–70-ти діб (для досліду відібрали мікобактерії трьох варіантів 100-го пересіву).

Зазначимо, що для одержання чистої лінії, клона мікобактерій, культивованих на середовищі з рН 6,7, пересіви мішаної культури проводили послідовно з ізольованих колоній відповідно часу їх формування (всього проведено чотири пересіви). На останньому пересіві окремих колоній одержаний клон некіслотостійких, кислотостійких і мішаних мікобактерій (рис. 2). Вочевидь, що поліморфізм та мінливість мікобактерій відіграють велику, а можливо, й головну роль в епізоотології туберкульозу. Без урахування їх не можна глибоко вивчити, адаптивну здатність мікобактерій до того чи іншого середовища, розроблена система профілактики й боротьби з хворобою не завжди забезпечує необхідний епізоотологічний та й економічний ефект. На наші глибокі переконання, саме ці невивчені форми збудника, які, залишаючись недіагностованими, з практично невідомими біологічними властивостями, формують особливості інфекційного й відповідно епізоотичного процесів.



**Рис. 2. Кислотостійкі (1), некіслотостійкі (2) та змішані (3) мікобактерії**

### **Висновки**

Для *M. bovis* швидко- та повільнорослих штамів властивий в однаковій мірі поліморфізм і мінливість.

1. Швидко- та повільнорослі *M. bovis* втрачають вихідну властивість – кислотостійкість, залежно від тривалості пасажування та вмісту в середовищі кислотно-лужних грам-еквівалентів. Характерним при цьому є поява в популяції кислотостійких мікобактерій, на початку поодиноких, ледь

помітних – нечітко сформованих, некислотостійких нитко- та паличкоподібних форм з подальшим практично різким їх збільшенням та чітко сформованими контурами клітинної оболонки трансформованих мікроорганізмів.

2. Некислотостійкі форми збудника на яєчному середовищі формують росинчасті колонії (“димка”, “наліт”), які з’являються на третю–десяту добу з часу висіву зависі.

3. Етіологічне значення та біологічні властивості некислотостійких мікобактерій так само, як і значення цих форм у самозбереженні збудника в природі, не зовсім ясне. Для розуміння цього явища необхідні більші поглиблені й розширені дослідження.

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

### **Бібліографія**

1. Вейсфейлер Ю.К. Биология и изменчивость микобактерий туберкулёза и атипичные микобактерии / Ю.К. Вейсфейлер. – 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.] // Науковий вісник ЛНУВМ та БТ імені С.З. Гжицького. – 2007. – Т. 9, № 3 (34). – С. 11–19.

3. Калина Г.П. L-трансформация бактерий / Г.П. Калина. – М.: Медгиз, 1962. – С. 574–595. – Руководство по микробиологии, клинике и эпидемиологии инфекционных болезней.

4. Космодамианский В.Н. Бактериология и патогенез туберкулёза / В.Н. Космодамианский. – 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. Елисеева, Е.М. Бабич, Ю.Л. Волянський [и др.] // Аналі Мечніковського інститута. – 2006. – № 1. – С. 12–46.

7. Прозоровський С.В. L-форми бактерій / С.В. Прозоровський, Л.Н. Кац, Г.Я. Каган. – М.: Медицина, 1981. – 239 с.

8. А.С. № 1734699. СССР. Способ обогащения биологического материала при бактериологическом исследовании на туберкулёз / В.А. Матузенко, В.А. Бусол, А.А. Ткаченко [и др.]; опубл. Бюл № 10. – 1992. – 8 с.

9. *Dominque G.J.* Bacterial Persistence and Expression of Disease / G.J. Dominque, H.B. Woody // *Clinical Microbiol. Rev.* – 1997. – Vol. 10, № 2. – P. 320 – 344.