

САНІТАРНА ЯКІСТЬ МОЛОКА КОРІВ З НЕГАТИВНИМ РЕЗУЛЬТАТОМ РУТИННОГО БАКТЕРІОЛОГІЧНОГО ДОСЛІДЖЕННЯ НА *MYCOBACTERIUM BOVIS*

*I. А. Бібен, канд. вет. наук, доцент,
О. І. Сосницький, д-р вет. наук, професор,
В. В. Зажарський, канд. вет. наук, доцент,
А. О. Сосницька, студентка магістратури ФВМ*

Дніпровський державний аграрно-економічний університет,
вул. С. Єфремова 25, м. Дніпро, 49600, Україна
bibenvet@ukr.net

Патогенні і потенційно-патогенні мікобактерії здатні персистувати в організмі ссавців і птиці в номінальному виді і в некультивуєчому стані – НКС і L-трансформованому варіанті. Такі фізіологічно і морфологічно змінені форми існування мікобактеріальних інфектопатогенів не ідентифікуються рутинними лабораторними методами, а індуковані ними патології мають нетипові або латентні клініко-епізоотологічні ознаки. Це дуже небезпечне явище, тому що продукція тваринництва від латентно інфікованих мікобактеріями корів буде біологічно небезпечною для споживачів.

*При вибіркового несистемного дослідженні молока корів індивідуального сектору в одній із проб молока, отриманого на несаціонованому пункті торгівлі, були ізольовані і ідентифіковані *M. bovis*. Ізольована епізоотична культура *M. bovis* володіла типовими морфотинкторіальними властивостями, індукувала ГСТ і була високо вірулентною для мурчаків і кроликів, апатогенною для курчат. Культуральне дослідження рутинними методами дало негативний результат. Ізольувати культуру збудника вдалося лише в біопробі на мурчаках при інтратестикулярному зараженні концентрованої проби молока. І вже з позитивного біоматеріалу загиблих від генералізованої форми тbc (туберкульозу) мурчаків отримали на середовищі Stonebrink, польського виробництва, чисту культуру *M. bovis*. На інших середовищах для мікобактерій первинного росту не було.*

Молоко мало якісні органолептичні властивості, було дуже смачним і добре сквашувалось при кімнатній температурі і за зовнішнім видом було доброякісним. Але воно було інфіковано емерджентним збудником летального антропозоонозу. Цей випадок показує нагальну потребу в експрес-індикації патогенних і потенційно-патогенних мікобактеріальних прокаріот у кожній пробі молока.

Ключові слова: ПАТОГЕННІ І ПОТЕНЦІЙНО-ПАТОГЕННІ МІКОБАКТЕРІЇ, НКС, L-ФОРМИ, БІОПРОБА, БІОБЕЗПЕКА, МОЛОКО КОРІВ.

SANITARY QUALITY OF MILK FROM COWS WITH A NEGATIVE RESULT ROUTINE BACTERIAL RESEARCH FOR *MYCOBACTERIUM BOVIS*

I. A. Biben, O. I. Sosnyskiy, V. V. Zazharskiy, A. O. Sosnyska

Dnipro State Agrarian-Economic University
25, S. Efremova str., Dnipro, 49600, Ukraine
bibenvet@ukr.net

Pathogenic and potentially pathogenic mycobacteria are able to persist in the body of

mammals and birds in the nominal form and in the non-cultivating state - NKS and L-transformed variant. Such physiologically and morphologically altered forms of existence of mycobacterial infectious pathogens are not identified by routine laboratory methods, and the pathologies induced by them have atypical or latent clinical and epizootological signs. This is a very dangerous phenomenon, because livestock products from cows latently infected with mycobacteria will be biologically dangerous for consumers.

M. bovis was isolated and identified in one of the samples of milk obtained at a non-sanctioned point of trade during a selective unsystematic examination of the milk of cows of the individual sector. The isolated epizootic culture of *M. bovis* possessed typical morpho-tinctorial properties, induced HST and was highly virulent for ants and rabbits, apathogenic for chickens. A cultural study gave a negative result. It was possible to isolate the culture only in a bioassay on houseflies with intratesticular contamination of a concentrated milk sample. And already from the positive biomaterial of ants that died from the tbc genoform, a pure culture of *M. bovis* was obtained on the Stonebrink medium of Polish production. There was no primary growth on other media.

The milk had high-quality organoleptic properties, was very tasty and fermented well at room temperature, and was of good quality in appearance. But it was infected with an emerging pathogen of lethal anthroponosis. This case shows the urgent need for express indication of pathogenic and potentially pathogenic mycobacterial prokaryotes in each milk sample.

Keywords: PATHOGENIC AND POTENTIALLY PATHOGENIC MYCOBACTERIA, NKS, L-FORMS, BIOPROBE, BIOSAFETY, COW'S MILK.

Продукція тваринництва є критично необхідною для забезпечення фізіологічних потреб організму людини в незамінних поживних речовинах органічного походження. Одним з найважливіших і розповсюджених продуктів тваринного походження є молоко корів, яке є не тільки звичайним і дуже корисним продуктом живлення, але і дієтичною речовиною, нагальною необхідною для харчування дітей, людей похилого віку і хворих (Gorbatyuk, 2004; Martin-Casabona et al., 2004; Murray et al., 2005; Yankovskiy, 2005; Apatenko & Kopietskiy, 2008; Kislichkina et al., 2009; Vlizlo et al., 2012; Zavgorodniy, 2013; Kalashnik, 2017; Zazharskiy et al., 2021].

Зрозуміло, що молоко повинно бути повністю біобезпечним для споживачів і не нести ніякої інфекційної або токсичної загрози. Це можливо лише за умови отримання молока від абсолютно здорових корів, вільних від збудників антропонозних інфекційних захворювань. Одними з таких інфектопатогенів є різноманітні мікобактерії, які супроводжують людство увесь цивілізаційний період його існування, тому що ознаки туберкульозних уражень ідентифіковані ще в дописемний період розвитку людської спільноти і перші патологічні зміни туберкульозної етіології, які виявили на кістках людей співпадають в часу з початком доместифікації великої рогатої худоби. З доісторичних часів і до наших днів, збудники туберкульозу і мікобактеріозів, які знаходяться в молоці інфікованих корів є постійною потенційною біологічною небезпекою для споживачів і це потребує перманентного прискіпливого мікробіального контролю з використанням експрес-методів лабораторної діагностики санітарної якості молока корів (Yankovskiy, 2005; Skripnik, 2007; Kislichkina et al., 2009; Makarova, 2010; Vlizlo et al., 2012; Zavgorodniy, 2013; Kalashnik, 2017; Zazharskiy et al., 2021).

Патогенні мікобактерії (збудники туберкульозу), потенційно-патогенні мікобактерії (збудники мікобактеріозів) і сапрофітні або нетипові мікобактерії (індуктори антигенної перверзії клітинно-опосередкованої імунної відповіді – ГСТ) в організмі пойкилотермних тварин (ссавці та птиці) здатні персистувати у формі номінальних бактеріальних клітин, яких ізолюють як рутинними методами на елективно-селективних середовищах за типовим характером зростання, так і у некультивуємому стані (НКС) та трансформованому вигляді, у формі дефектних (повністю або частково) за клітинною стінкою L-форм прокариот та

гігантських куль з ультрадрібними гранулами (зерна Муха), які є вегетонеспроможними на звичайних мікобактеріальних середовищах, внаслідок занадто високої фізіологічної адаптації до внутрішнього середовища тварин і вираженої дизадаптації до штучних умов культивування з тенденцією до відмирання неадаптованих епізоотичних клонів у перших генераціях (Аратенко & Копієтський, 2008; Magee & Ward, 2015; Kassish et al., 2019; Zazharskyi et al., 2021).

Туберкульозна або мікобактеріальна інфекційна патологія, індукована трансформованим збудником може бути неманіфестованою, мати транзиторну, субклінічну, нетипову або латентну форму перебігу, що може призводити до хибно негативного клініко-епізоотологічного діагнозу на тлі негативних бактеріологічних результатів індикації мікобактеріальних прокаріот (Skripnik, 2007; Makarova, 2010; Sosnitskiy & Alekseeva, 2015; Magee & Ward, 2015; Kassish et al., 2019).

Мета роботи – мікробіологічний контроль санітарної якості молока корів відносно мікобактеріальної контамінації реалізованого на несанкціонованому пункті продажу без офіційного дослідження біобезпеки.

Матеріали і методи. Лабораторні дослідження проводили за офіційними і оригінальними методами індикації та ідентифікації патогенних і потенційно-патогенних мікобактерій в науково-виробничій лабораторії кафедри інфекційних хвороб тварин ФВМ ДДАЕУ.

Органолептичну оцінку молока проводили для визначення його якості з позиції пересічного споживача в рамках вимог ДСТУ 3662-97. Для цього визначали колір, запах, смак, консистенцію і наявність вад. Механічну чистоту молока визначали відповідно до ГОСТ 8218089. Бактеріальну забрудненість молока сапрофітними прокаріотами визначали непрямим методом – підрахунком колоній, що вирости на МПА після посіву десятикратних послідовних розведень фізрозчином. Біобезпечність молока встановлювали за результатами біопробу на білих мишах.

Концентрацію мікобактеріального збудника для біопробу та культивування проводили так: молоко центрифугували 30 хв при 3000 об/хв. Середній шар рідини відсмоктували, осад і вершки змішували і до 5 см³ суміші додавали 5 см³ 96° етанолу, 5 см³ ефіру і 10 см³ 25 % антиформіну. Суміш ретельно перемішували і ставили в термостат при 37-38 °С до повної гомогенізації. Потім додавали 25 см³ фізрозчину і центрифугували 30 хв при 3000 об/хв. Осад промивали стерильним фізрозчином і робили мазки, посіви і зараження лабораторних тварин.

Препарати-мазки фарбували за методом Циль-Нільсена та Грама, посіви робили на МПА і МПБ та середовищі Левенштейна-Йенсена та Stonebrink польського виробництва і культивували впродовж 3 місяців за 37-38 °С, біопробу ставили на мурчаках і кроликах. Осад молока перед посівами та біопробу підлягав стандартній процедурі превентивної обробки 3 % розчином сірчаної кислоти впродовж 25-30 хв і промиванню 3 рази стерильним фізрозчином за методом Алікаєвої А.П.

Біопробу на мурчаках провели за офіційною методикою і за оригінальною. Інфікували рандомізованих безпородних мурчаків, живою масою 300-350 г, по 4 тварини на кожний спосіб зараження. Дослідний матеріал (1,0 см³ нерозведеного молока) вводили підшкірно в ділянці паху (офіційна методика) і інтратестикулярно (оригінальна методика) по 0,1-0,2 см³ дослідної суміші з осаду молока.

Двох кроликів сірого окрасу, живою вагою 2,5 кг, заражали звичайним методом – внутрішньовенно. В крайову вену вуха ввели по 0,1 мг дослідної ізольованої культури мікобактерій.

Спостерігали за інфікованими лабораторними тваринами три місяці. Через 4 тижні проводили внутрішньошкірне алергічне дослідження РРД-туберкуліном для ссавців.

Результати й обговорення. При органолептичному дослідженні молока корів з несанкціонованого пункту продажу встановили, що молоко було білого кольору, приємного

запаху і смаку, однорідної консистенції, без слизу, пластівців білка, нетягуче, вад кормового походження і механічних домішок не виявлено.

У препаратах-мазках з концентрованого осаду молока, пофарбованих за Грамом і Циль-Нільсеном, спостерігали велику кількість різноманітних форм мікроорганізмів, грам-позитивних і грам-негативних, але кислотостійких мікобактерій не знайшли. Сапрофітна мікрофлора була представлена переважно короткими ланцюжками з 6-8 крупних коків, сплюснутих з полюсів, диплококами, стафілококами, грам-негативними ентеробактеріями та грам-позитивними споровими антракоїдними гнильними сапрофітами. За мікрокартиною можна стверджувати, що молоко забруднено сапрофітною мікрофлорою, яке призведе до його швидкого псування. При визначенні мікробного забруднення непрямим методом, тобто висівом десятикратних розведень молока на МПА встановили, що концентрація сапрофітів сягає до 18×10^6 КУО/см³ і таке молоко є умовно придатним. Але в біопробі на шести білих мишах, живою вагою 20-22 г, при введенні нерозведеного молока підшкірно в дозі 1,0 см³ впродовж 10 діб спостереження, патологічних змін не спостерігали, тобто молоко є умовно біобезпечним, тому що сапрофіти інфекційної патології не викликають.

В посівах на МПА і МПБ виявили суміш сапрофітної мікрофлори, палички і коки, які не володіли патогенністю до білих мишей.

Посіви з осаду молока на середовищі Левенштейна-Йенсена і Stonebrink при культивуванні за 37-38 °С впродовж трьох місяців залишались чистими, росту мікобактерій не було.

В загальноприйнятій біопробі на мурчаках отримали негативний результат. Тварини не захворіли, тобто введення нерозведеного молока не виявило мікобактеріальної інфекції. Але введення концентрованого осаду молока за оригінальною методикою інтратестикулярно мурчакам дало позитивний результат по мікобактеріях туберкульозу.

Мурчаки через 30 діб після інтратестикулярного інфікування реагували на інтракутанне введення РРД-туберкуліну для ссавців у вигляді вираженого набряку в місці ін'єкції, почервоніння, локусів некрозу і болісності. Середній розмір набряку склав $24 \pm 3 \times 18 \pm 1$ мм.

Через два тижні після зараження мурчаки почали худнути і перестали набирати вагу при тому, що апетит зберігався. Цей процес схуднення носив прогресивний характер, в порівнянні з контролем дослідні мурчаки втратили в середньому по групі 134 ± 17 г живої ваги. Мурчаки загинули через 4-6 тижнів з ознаками туберкульозної кахексії і глибокої депресії.

На розтині реєстрували типову патологічну картину генералізованої форми tbc (туберкульоз), маніфестні патологічні зміни були локалізовані в селезінці, печінці і легенях. Селезінка дуже сильно збільшена в розмірах із закругленими краями, бугристою поверхнею, яскравого червоно-малинового кольору. Печінка значно збільшена в розмірах із закругленими краями, дрябкої консистенції червоного кольору, мармурова, з локусами некрозів. Легені світло-рожевого кольору з великою кількістю міліарних вузликів. Патологічна картина розтину мурчаків представлена на рисунку 1.



Рис. 1. Внутрішні органи мурчаків з генералізованою формою tbc.

Патологічний матеріал від загиблих мурчаків обробляли за методом Алікаєвої А.П. і робили посіви на середовище Левенштейна-Йєнсена і Stonebrink. Через 8 тижнів отримали дуже незначний первинний ріст культур епізоотичного варіанту *M. bovis* на середовищі Stonebrink в R-формі, на середовищі Левенштейна-Йєнсена росту не було. При фарбуванні за Циль-Нільсеном препаратів-мазків з первинних колоній мікобактерії мали типові морфотинкторіальні ознаки – це були короткі палички, рубіново-червоного кольору, розташовані поодинокі або скупченнями.

Первинний ріст епізоотичної культури *M. bovis* на елективно-селективному середовищі представлений на рис. 2.



Рис. 2. Ріст *M. bovis* на середовищі Stonebrink.

Ізольовані мікобактерії росли дуже повільно, бактеріальна маса колоній збудника була дуже маленька. Культура погано адаптувалась до штучних умов існування. В другому пасажі культура дала теж незначний і повільний ріст, а вже в третьому пасажі спостерігали відмирання культури.

Біологічні властивості збудника у другому пасажі вивчали в біопробі на кроликах за офіційною методикою. Кролики загинули від туберкульозного сепсису на 30 і 32 добу з явищами туберкульозної кахексії. В термінальній стадії захворювання з'явилась профузна діарея і глибока депресія. На розтині спостерігали типову патологічну картину генералізованої форми туберкульозу і виснаження.

Ізольована епізоотична культура була високо адаптованою і спеціалізованою до умов існування у внутрішньому середовищі макроорганізму і при потраплянні на щільне живильне середовище не адаптувалася до нього, проявила дуже погані вегетативні потенції і вже на третьому пересіві загинула. Відмирання культури вказує на те, що мікобактерії знаходились в НКС, їх ізоляція була можлива лише за рахунок оригінальної методики біопробі, тому що інтратестикулярне інфікування супроводжується нативною імунодепресією і це значно покращує висівання. Також використовували середовище польського виробництва, воно дає найкращі результати.

Результати дослідження вказують на нагальну проблему існування збудника туберкульозу в НКС зі зниженими вегетативними потенціями, що призводить до хибнонегативних результатів рутинної бактеріологічної діагностики і розповсюдженню емерджентної інфекції в біосфері, що складає біологічну небезпеку для споживачів.

ВИСНОВКИ

1. Молоко корів при задовільних органолептичних характеристиках може бути інфікованим патогенними прокаріотами і представляти біонебезпеку за мікобактеріальними показниками, які не володіють гнильними і зброджувальними ферментними системами і тому не впливають на зовнішній вигляд молока.

2. Епізоотичні варіанти мікобактеріальних інфектопатогенів, які знаходяться в НКС або в L-трансформованому стані, при звичайних засобах клініко-епізоотичного обстеження тварин і рутинних лабораторних методах індикації та ідентифікації збудника в молоці корів можуть бути не виявлені і заражати людей емерджентною хворобою.

3. Ізольована епізоотична культура *M. bovis* володіла типовими морфотинкторіальними властивостями, була патогенною і високо вірулентною для мурчаків і кроликів, індукувала ГСТ, але була не вегетоспроможною і не здатною адаптуватись до штучних умов культивування, тобто знаходилась в НКС і рутинними методами не виділялась.

Перспективи досліджень. Розробка інструментальних методів масової експрес-діагностики збудників мікобактеріальних інфекцій, передусім збудників туберкульозу в молоці і молочних продуктах.

References

Apatenko, V.M. & Kопietskiy, V.F. (2008). Prevolyutsiya mikrobiv yak epizootologichniy chinnik. Vet. meditsina Ukrayini, 4, 11-12. [in Ukrainian].

Gorbatyuk, B.I. (2004). Metodichni rekomendatsiyi z diagnostiki ta doslidzhennya zagalnogo stanu organizmu tvarini. Lviv, 72. [in Ukrainian].

Kalashnik, M.V. (2017). Epizootologichniy monitoring ta udoskonalennya laboratornoyi diagnostiki tuberkulozu velikoyi roगतoyi hudobi: avtoref. dis. ... kand. vet. nauk. Harkiv, 20. [in Ukrainian].

Kassish, V.Yu., Ukhovskiy, V.V., Sosnytskyi, O.I., Biben., I.A., Zazharskiy., V.V. & Kassish, O.V. (2019). Ecologically safe method to control the epidemic situation on animal tuberculosis in Ukraine. Biology. Svit medicini i biologii. 2 (68), 220–225. [in Ukrainian].

Kislichkina, A.A., Stepanshina, V.I., Shemyakin, I.G. (2009). Mikobakteriozyi, Problemyi tuberkuleza i bolezni legkih. 5, 3-9. [in Russian].

Magee, J.G. & Ward, A.C. (2015). Mycobacterium. Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. – Chichester, UK: John Wiley & Sons, 1-84.

Makarova, M.V. (2010). Vydelenie i identifikatsiya netuberkuleznyih mikobakteriy u patsientov ftiziatricheskikh uchrezhdeniy: avtoref. dis. ... d-ra biol. nauk. Moskva, 48. [in Russian].

Martin-Casabona, N., Bahrmand, A.R., Bennedsen, J. (2004). Non-tuberculous mycobacteria: patterns of isolation, a multy-country retrospective survey. The international journal of tuberculosis and lung disease the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease. 8,10. 1186-1193.

Murray, P.R., Rosenthal, K.S., Pfaller, M.A. (2005). Medical microbiology. Elsevier Mosby, 963.

Skripnik, A.V. (2007). Molekulyarno-genetichna diferentsiatsiya mikobakteriy, vidlennih v Ukraini, ta yih fliogenetichni vzaemozvyazki: dis. ... kand. vet. nauk: Harkiv. 150. [in Ukrainian].

Sosnitskiy, O.I. & Alekseeva, N.V. (2015). Viniknennya vognisch proliferativnogo netuberkuloznogo zapalennya v limfatichnih vuzlah vidgodivelnih pidsvinkiv. Naukovo-tehnichniy byulleten Derzhavnogo naukovo-tehnichnogo kontrolnogo Institutu veterinarних preparativ ta kormovih dobavok i Institutu biologiyi tvarin. Lviv. 16, 2. 229-234. [in Ukrainian].

Vlizlo, V.V., Fedoruk, R.S., Ratich, I.B. et al. (2012). Laboratorni metodi doslidzhen u biologiyi, tvarinnitstvi ta veterinarних meditsini: dovidnik; za red. V.V. Vlizla. Lviv: SPOLOM, 764. [in Ukrainian].

Yankovskiy, D.S. (2005). Mikrobnaya ekologiya cheloveka: sovremennyye vozmozhnosti ee podderzhaniya i vosstanovleniya. K., 362. [in Russian].

Zavgorodniy, A.I. (2013). Naukove zabezpechennya protituberkuloznych zahodiv v Ukrayini. Vet. meditsina Ukrayini. 10, 15-16. [in Ukrainian].

Zazharskyi, V., Bigdan, O., Parchenko, V., Parchenko, M., Fotina, T., Davydenko, P. et al. (2021). Antimicrobial activity of some furans containing 1,2,4- triazoles. Archives of pharmacy practice. 12 (2), 60-65.