



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **50641** (13) **U**  
(51) МПК (2009)  
С12N 1/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

(54) СПОСІБ АТЕНУАЦІЇ *M. BOVIS* ШВИДКОРОСЛИХ ШТАМІВ

1

2

(21) u200805083

(22) 21.04.2008

(24) 25.06.2010

(46) 25.06.2010, Бюл.№ 12, 2010 р.

(72) ТКАЧЕНКО ОЛЕКСІЙ АНДРІЙОВИЧ, БІЛАН  
МАРИНА ВОЛОДИМИРІВНА, ЗАЖАРСЬКИЙ ВО-  
ЛОДИМИР ВОЛОДИМИРОВИЧ, КУЛІШЕНКО  
ОЛЕГ МИКОЛАЙОВИЧ, ГЛЕБЕНЮК ВОЛОДИМИР  
ВОЛОДИМИРОВИЧ, КОВАЛЬОВА ЛІЛІЯ ОЛЕКСІЙ-  
ВНА

(73) ДНІПРОПЕТРОВСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ АГРА-  
РНИЙ УНІВЕРСИТЕТ

(57) Спосіб атенуації *M.bovis* швидкорослих шта-  
мів шляхом пасажування їх через середовища, які  
містять речовини, що послаблюють вірулентність  
збудника (ектерицид, жовч), який **відрізняється**  
тим, що як фактор, що знижує вірулентність, вико-  
ристовують кисле рН середовище, яке дорівнює  
6,5.

Корисна модель належить до ветеринарної мі-  
кробіології і може бути використана в біологічній  
промисловості для отримання вакцин і біопрепа-  
ратів для профілактики та боротьби з туберкульо-  
зом.

Відомий спосіб одержання штамів мікобактерій  
туберкульозу для приготування вакцин на живиль-  
ному середовищі, що містить гліцерин, перевар  
Хотингера, картопляні клинці та розчин ектерици-  
ду в концентрації від 1 до 14%, який додають по  
мірі зростання кратності пасажу (Пат. 29711А  
Україна, МКИ А61К39/04. Спосіб одержання шта-  
мів мікобактерій туберкульозу для приготування  
вакцин: Пат. 29711 Україна, МКИ А61К39/04. Коч-  
марський Віктор Андрійович. - №97020457; Заяв-  
лено 04.02.1997; Опубл. 19.07.1999. Бюл. №4.)

Існуючий на сьогоднішній день вакцинний  
штам БЦЖ, отриманий Кальметом і Гереном шля-  
хом тривалого пасажування збудника через сере-  
довище з жовчю, не забезпечує достатнього імун-  
нологічного захисту поголів'я великої рогатої  
худоби, а самі автори вказували на можливість  
реверсії даного штаму у вірулентний і рекоменду-  
вали проводити через певний час додаткову ате-  
нуацію (Туберкулёз животных и меры борьбы с  
ним / Ю.Я. Кассич, А.Т. Борзяк, А.Ф. Кочмарський  
и др.; Под ред. Ю.Я. Кассича. // - К.: Урожай, 1990.  
- 340с.).

Вочевидь, внесення до складу штучного живи-  
льного середовища речовин, які послаблюють

вірулентність збудника, не попереджають в майбу-  
тньому його реверсії в патогенний штам.

Найбільш близьким за біологічним рішенням  
до передбачуваної корисної роботи є пасажування  
*M.bovis* швидкорослого штаму через штучне живи-  
льне середовище із зміненним рівнем рН (від слаб-  
колужного до слабо-кислого).

Задачею корисної моделі є розробка способу  
атенуації епізоотичного швидкорослого штаму  
*M.bovis* шляхом пасажування його через живильні  
середовища з підвищеним вмістом кислотних  
грам-еквівалентів, з метою отримання атенуова-  
них штамів.

Поставлена мета досягається тим, що епізо-  
тичний швидкорослий штам *M.bovis* пасажують  
через щільне яєчне живильне середовище з рН  
6,5. Зниження рівня рН здійснювали шляхом вне-  
сення в живильне середовище соляної кислоти  
перед його згортанням.

Приклад 1

Висівають на живильне яєчне середовище з  
рН 7,1 (контроль) та 6,5 завись мікобактерій, попе-  
редньо виділених з лімфатичних вузлів великої  
рогатої худоби неблагополучного господарства, в  
об'ємі дві бактеріологічні петлі на кожну з чотирьох  
пробірок.

Далі посіви поміщують в термостат для куль-  
тивування за температури +37°C з наступним об-  
ліком початку росту, кожного дня перші 10 днів і  
через 5 днів наступні 80 днів згідно настанови по  
діагностиці туберкульозу тварин.

(19) **UA** (11) **50641** (13) **U**

Вивчали форму, структуру та строки формування колоній, морфологічні, тинкторіальні властивості мікобактерій (Настанова по діагностиці туберкульозу / В.М. Манченко, З.Р. Троценко, М.С. Павленко та ін. - Київ, 1994. - 39с.).

Сенсibiliзуючі властивості, ступінь вірулентності *M.bovis* першої та наступних генерацій кожного пасажованого штаму визначають, заражаючи традиційним методом, двох морських свинок, вагою 250-300г, зависсю мікобактерій накопиченої культури (1мг/см<sup>3</sup> фізіологічного розчину). Сенсibiliзуючу здатність та вірулентність оцінюють за традиційними у ветеринарній медицині методами, а ступінь патолого-анатомічних змін у внутрішніх органах лабораторних тварин - за схемою М.С. Триус (Ященко Т.Н., Мечева И.С. Руководство по лабораторным исследованиям при туберкулезе. - М.: Медицина, 1973. - 260с.).

Досліджували *M.bovis*, на яєчному середовищі для культивування мікобактерій з двома значеннями рН, формували на 2 добу випуклі, гладенькі, блискучі, кольору слонов'ячої кістки, сухувато-маслянистої консистенції, відокремлені одна від одної колонії.

Мікроскопія мазків, виготовлених з культур мікобактерій, засвідчила наявність червоних паличок, довжиною 1-3, шириною 0,3-0,5мкм з помірно вираженою грануляцією (в одній мікобактерії інколи знаходилася гранула), що є характерним для мікобактерій бичачого виду.

За біохімічними властивостями, визначений швидкорослий епізоотичний штам *M.bovis*, характеризувався наступним: мікобактерії утворювали корд-фактор, не редукували нітрати, не володіли каталазою активністю, не росли за температури 22 та 45°C, формували колонії на середовищі зі саліцилатом натрію в концентрації 0,5мг/см<sup>3</sup> (при мікроскопічних дослідженнях виявлені змінені червоні палички - на фоні нормальної морфології збудника спостерігалися зігнуті, деформовані, в два-три рази довші, ніж у мазках, які були виготовлені з колоній, зареєстрованих на середовищі без саліцилату натрію).

За ступенем вірулентності *M.bovis* досліджуваного штаму віднесені до середнього, оскільки морські свинки, реагували на введений туберкулін на 20 і 30 добу та гинули від генералізованої форми туберкульозу на 34-40 добу після інюкаляції зависі мікобактерій.

Вивченням ліпідного складу у вихідного штаму *M.bovis* (методика Фолча в модифікації Блайя-Дайера) встановили, що кількість загальних ліпідів на наважку становить 8,05% (Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов. - М.: Мир, 1975. - 322с.).

Після розділення загальних ліпідів на фракції методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) встановили, що більшу частину останніх складають фосфоліпіди (27,97%) та триацилгліцероли (18,32%). Вміст вільних жирних кислот та ефірів стеринів становить 14,47%, диацилгліцеролів - 12,54%, стеринів - 12,23%.

Газорідним хроматографічним аналізом (ГРХ) фракції вільних жирних кислот виявили велику кількість насичених жирних кислот (72,61%),

що зумовлено суттєвим вмістом довголанцюгових кислот (C<sub>21:0</sub>-C<sub>27:0</sub> - 35,56%). Поряд з цим виявлена велика кількість пальмітинової кислоти (19,62%).

Серед ненасичених жирних кислот відзначимо переважання олеїнової кислоти (23,87%), що становить 87,14% від їх загальної суми.

#### Приклад 2

Вивчення впливу пасажів через штучне живильне середовище з різним рН на культуральні властивості колоній та морфологію збудника засвідчило (табл.1), що *M.bovis* епізоотичного швидкорослого штаму в другій та наступних генераціях проявляють різну інтенсивність розмноження.

Таблиця 1

Швидкість росту колоній *M.bovis* на щільному середовищі за багаточисельних пересівів

Пасаж мікобактерій	Строки появи колоній, день	
	рН середовища	
	7,1	6,5
1-12	2,0	2,0
13-24	7,0	3,5
25-36	11,0	2,5
37-48	7,2	2,7
49-60	6,5	2,9
61-72	10,2	2,3
73-84	12,0	3,0
85-91	13,0	2,3
97-108	14,2	2,7
109-120	12,5	6,5
121-132	-	7,7
133-144	-	11,2
145-156	-	13,1
157-168	-	10,1

Як засвідчили дослідження, мікобактерії протягом дослідів на середовищі з рН 7,1 знизили строки формування колоній з 19 пасажу, що визначило їх в наступному як повільнорослі; на середовищі з рН 6,5 - це явище виявлено тільки на 115 пересіві. Саме тому на останніх середовищах одержано 168 генерацій швидкорослого штаму, а на середовищі з рН 7,1 тільки 120.

Культуральні властивості *M.bovis* зі збільшенням кількості пасажів через живильні середовища динамічно суттєво змінювалися в залежності від вмісту у середовищі кислотних грам-еквівалентів. Насамперед, це стосується форми, структури колоній й 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 суцільного росту. При цьому *M.bovis*, пасажовані через живильне середовище з рН 7,1-7,2, втратили швидкість розмноження на 13-24 пересіві, в той час як на середовищі з рН 6,5 - на 109-120. Але, в цілому (табл.2), на 14 день від початку формування колоній на середовищі з рН 6,5 відмічався суцільний ріст практично до 114 пасажу, на середовищі з рН 7,1 тільки на 21-28 день спостереження

до 61-66 пасажу, що свідчить про більш негативний вплив такого вмісту кислотних грам-

еквівалентів на адаптивну здатність *M.bovis* щодо живильного середовища.

Таблиця 2

Вплив середовища на інтенсивність росту колоній мікобактерій за багаточисельних пересівів 1-3 денної культури

Пасаж	Кількість колоній в пробірці (на день)			
	7-й	14-й	21-й	28-й
1	2	3	4	5
1-6	3,75/5,5	5,25/с.р.	с.р./с.р.	с.р./с.р.
7-12	4,75/5,75	6,75/с.р.	с.р./с.р.	с.р./с.р.
12-18	4,25/5,5	8,5/18,25	с.р./с.р.	с.р./с.р.
19-24	0,25/5,25	5,25/52,25	53,0/с.р.	83,0/с.р.
25-30	7/10,25	0,5/с.р.	4,75/с.р.	с.р./с.р.
31-36	7/12,75	5,25/с.р.	63,25/с.р.	с.р./с.р.
37-42	1,25/19,25	14,0/с.р.	с.р./с.р.	с.р./с.р.
43-48	1,75/9,0	43,0/с.р.	с.р./с.р.	с.р./с.р.
49-54	5,75/16,5	26,25/с.р.	с.р./с.р.	с.р./с.р.
55-60	8,0/12,5	46,5/с.р.	с.р./с.р.	с.р./с.р.
61-66	7/10,5	6,25/с.р.	8,75/с.р.	20,5/с.р.
67-72	7/31,0	6,25/с.р.	8,0/с.р.	10,5/с.р.
73-78	7/10,5	2,25/с.р.	6,5/с.р.	13,7/с.р.
79-84	7/12,5	4,5/с.р.	13,5/с.р.	с.р./с.р.
85-90	7/25,0	4,25/с.р.	7,0/с.р.	12,75/с.р.
91-96	7/45,0	4,75/с.р.	12,25/с.р.	с.р./с.р.
97-102	7/61,0	7,25/с.р.	14,75/с.р.	с.р./с.р.
103-108	7/19,75	7/с.р.	4,5/с.р.	6,25/с.р.
109-114	7/25,5	7/с.р.	6,25/с.р.	9,75/с.р.
115-120	7/-	1,0/9,75	1,25/с.р.	с.р./с.р.
121-126	7/-	7/8,0	7/13,5	7/с.р.
127-132	7/3,75	7/12,5	7/24	7/с.р.
133-138	7/-	7/6,5	7/16,5	7/с.р.

Продовження таблиці 2

1	2	3	4	5
139-144	∕-	∕5,5	∕с.р.	∕с.р.
145-150	∕-	∕2,75	∕с.р.	∕с.р.
151-156	∕-	∕2,0	∕с.р.	∕с.р.
157-162	∕-	∕14,75	∕с.р.	∕с.р.
163-168	∕-	∕с.р.	∕с.р.	∕с.р.

Примітки: 1 - чисельник - кількість колоній на яєчному середовищі з рН 7,1;  
знаменник - кількість колоній на яєчному середовищі з рН 6,5;  
2 - с.р. - суцільний ріст культури.

Водночас, морфологія та тинкторіальні властивості мікобактерій в залежності від середовища змінювалися зі збільшенням кількості пересівів за винятком таких, які культивувалися на середовищі з рН 7,1, де згадані властивості практично не змінилися. На середовищі з рН 6,5, розпочинаючи з 90-ої генерації, в полі зору мікроскопа відмічалися товсті й тонкі, зернисті, короткі й довгі сегментовані палички червоного кольору. Зі 120-130 пасажу з'явилися надзвичайно довгі (15-20мкм - у 6-10 разів довші за традиційні) палички на фоні вихідних форм збудника. В останніх генераціях, розпочинаючи зі 145, на середовищі з рН 6,5 починали

з'являтися й поодинокі ниткоподібні кислотостійкі сегментовані, з великою кількістю зерен, форми мікобактерій з менш інтенсивніше зафарбованою оболонкою, ніж в умовах перших пересівів, що може свідчити про зміну біохімічного складу клітинної оболонки.

168 генерація *M.bovis* на середовищі з рН 6,5 стимулювала інтенсивний ріст горбкуватих колоній. Мікроскопія засвідчила кислотостійкі, різних розмірів, в тому числі й поодинокі ниткоподібні сегментовані форми збудника.

Встановлено відмінність у біохімічних властивостях пасажованих *M.bovis* (табл.3).

Таблиця 3

Біохімічні властивості пасажованих *M.bovis*

№ пасажу	Властивість																
	Редукція нітратів	Активність						Реакція гідролізу ТВИН-80	Акумуляція заліза	Толерантність до 5% NaCl	Корд-фактор	ріст на середовищі зі саліцилатом натрію					
		каталазна		пероксидазна													
	рН середовища																
7,1	6,5	7,1	6,5	7,1	6,5	7,1	6,5	7,1	6,5	7,1	6,5	7,1	6,5	7,1	6,5		
2	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
59	-	-	+	++	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	+
100	-	-	++	++	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	±	-	+
164	*	-	*	++	*	+	*	+	*	-	*	-	*	-	±	*	+

Примітки: результат

"+" - позитивний;

"-" - негативний;

"±" - сумнівний;

"\*" - пасажування не проводилось.

Для оцінки каталазної активності:

"++" - помірне виділення пухирців у першу хвилину;

"+" - поодинокі пухирці у першу хвилину.

*M.bovis* швидкорослого штаму при пасажуванні (59 та 100 разів) через штучне живильне середовище з рН 7,1 не редукували нітрати, не акумулювали залізо, не росли на середовищі з додаванням саліцилату натрію (0,5мг/см<sup>3</sup>), не росли на середовищі з додаванням 5% NaCl, прояв-

ляли слабку та середню каталазну активність, формували корд-фактор. На 100-му пересіві проявляли пероксидазну активність.

При пересівах *M.bovis* через середовище з рН 6,5 встановлено, що мікобактерії володіли середньою каталазною і слабкою пероксидазною актив-

ністю до 164-го пасажу, гідролізували ТВИН-80, росли на середовищі з додаванням саліцилату натрію і не редукували нітрати, не акумулювали залізо, не росли на середовищі з додаванням 5% NaCl. Інтенсивність корд-фактору на цьому середовищі суттєво знизилася, починаючи із 100-го пересіву субкультури мікобактерій.

З метою вивчення впливу тривалого пасажування на ліпідний склад *M.bovis* використали культуру, пасажовану 2, 80, 130 та 150 разів і накопичену на середовищі для культивування мікобактерій з рН 6,5.

За результатами дослідження ліпідного складу встановлено зниження їх кількості у 1,3-2,2 раза зі збільшенням кількості пасажів (табл.4).

Таблиця 4

Вміст загальних ліпідів у *M.bovis*, (% на наважку)

Показник	Пасаж			
	2-й	80-й	130-й	150-й
Вміст загальних ліпідів	8,05±0,20	6,40±0,83	3,90±0,55**	3,66±0,42***

\*\*P≤0,01; \*\*\*P≤0,001.

Після розділення загальних ліпідів на фракції методом ТШХ встановили збільшення вмісту ді-

цилгліцеролів, стеринів та вільних жирних кислот в динаміці пасажів (табл.5).

Таблиця 5

Фракційний склад ліпідів у пасажованих *M.bovis* (% від суми)

Фракція загальних ліпідів	Пасаж			
	2-й	80-й	130-й	150-й
Фосфоліпіди	27,97±0,26	24,34±0,85*	20,72±0,85**	23,41±0,45***
Діацилгліцероли	12,54±0,27	19,05±0,37***	20,36±0,86***	16,71±0,43**
Стерини	12,23±0,20	16,93±0,78**	18,93±0,74***	16,00±0,70**
Вільні жирні кислоти	14,47±0,23	16,40±0,46*	16,07±0,36*	16,00±0,14**
Триацилгліцероли	18,32±0,16	12,17±0,59***	12,50±0,49***	15,61±0,32**
Ефіри стеринів	14,47±0,24	11,11±0,67**	11,42±0,80*	12,27±0,50*
Σ ліпідів	100	100	100	100

\*P≤0,05; \*\*P≤0,01; \*\*\*P≤0,001.

Пасажування мікобактерій призвело до зниження фракцій фосфоліпідів, триацилгліцеролів та ефірів стеринів.

ГРХ-аналізом фракції вільних жирних кислот (табл.6) виявлено велику кількість насичених жирних кислот, особливо на 80-му пересіві (за рахунок

пальмітинової та стеаринової кислот). В цілому, багаторазове пасажування призвело до збільшення кількості пальмітинової (C<sub>16:0</sub>) та стеаринової (C<sub>18:0</sub>) кислот (P≤0,001). Але зі збільшенням кількості пасажів, відмічається поступове зниження нонадеканової (C<sub>19:0</sub>) та арахинової (C<sub>20:0</sub>) кислот.

Таблиця 6

Вміст вільних жирних кислот у зразках, % від суми

Вільна жирна кислота	Код	Пасаж			
		2-й	80-й	130-й	150-й
1	2	3	4	5	6
Лауринова	C <sub>12:0</sub>	0,04±0,02	0,05±0,03	0,10±0,06	сліди
Тридеканова	C <sub>13:0</sub>	0,10±0,02	0,22±0,05	0,15±0,08	-
Миристинова	C <sub>14:0</sub>	0,27±0,04	0,22±0,08	0,51±0,30	сліди
Пентадеканова	C <sub>15:0</sub>	0,22±0,02	0,17±0,08	0,33±0,23	сліди
Пальмітолеїнова	C <sub>16:1</sub>	0,55±0,07	0,26±0,10	1,63±0,21*	0,08±0,05**
Пальмітинова	C <sub>16:0</sub>	19,62±0,53	30,35±0,95***	26,43±1,01**	28,97±0,91***
Маргарінова	C <sub>17:0</sub>	0,81±0,07	0,70±0,19	3,05±0,4**	0,91±0,07
Олеїнова	C <sub>18:1</sub>	23,87±0,60	23,37±0,70	44,72±1,55***	27,16±0,55*
Стеаринова	C <sub>18:0</sub>	7,42±0,11	25,72±1,79***	10,57±0,64**	13,58±0,52***
Лінолева+ліноленова	C <sub>18:2</sub> +C <sub>18:3</sub>	2,97±0,16	1,86±0,68	3,86±0,02**	8,96±0,57*

Продовження таблиці 6

1	2	3	4	5	6
Нонадеканова	C <sub>19:0</sub>	3,34±0,06	1,60±0,74**	1,22±0,07***	1,13±0,36**
Арахінова	C <sub>20:0</sub>	5,23±0,14	0,63±0,32***	сліди	сліди
Генейкозанова	C <sub>21:0</sub>	6,74±0,23	1,74±0,77**	2,14±0,03***	3,39±0,38**
Бегенева	C <sub>22:0</sub>	5,78±0,18	2,11±0,64**	3,17±0,01***	10,17±0,54**
Трикозанова	C <sub>23:0</sub>	5,89±0,35	1,09±0,66**	-	сліди
Тетракозанова	C <sub>24:0</sub>	5,57±0,19	1,28±0,62**	-	сліди
Пентакозанова	C <sub>25:0</sub>	7,43±0,26	7,93±1,13	2,12±0,02***	5,65±0,65
Гексакозанова	C <sub>26:0</sub>	2,53±0,30	0,70±0,44*	-	-
Гептакозанова	C <sub>27:0</sub>	1,62±0,19	сліди	-	-
Σ ненасичених		27,39±0,44	25,49±2,16	50,21±1,80***	36,20±0,70***
Σ насичених		72,61±0,50	74,51±1,50	49,79±1,70***	63,80±0,75***
Σ коротколанцюгових		64,44±0,61	85,15±0,54	92,57±0,53	80,79±0,50
Σ довголанцюгових		35,56±0,47	14,85±0,47	7,43±0,40	19,21±0,32

\* P≤0,05; \*\* P≤0,01; \*\*\*p≤0,001.

Примітки:

1. C<sub>A:0</sub> - насичена жирна кислота (A - кількість атомів вуглецю);
2. C<sub>A:H</sub> - ненасичена жирна кислота (H - кількість подвійних зв'язків);
3. Сліди - наявність кислоти менше 0,01%.

Пасажування призвело до збільшення суми ненасичених жирних кислот у досліджуваної культури *M.bovis*. Серед ненасичених жирних кислот відмічається переважання олеїнової кислоти (C<sub>18:1</sub>) у всіх зразках, особливо на 130-му пасажі, де виявлено також максимальну кількість пальмітолеїнової (C<sub>16:1</sub>) кислоти та 150-му, де спостерігається найбільше лінолевої та ліноленої кислот (C<sub>18:2</sub>+C<sub>18:3</sub>).

Багаторазове пасажування суттєво впливало на співвідношення коротколанцюгових (C<sub>12</sub>-C<sub>20</sub>) та довголанцюгових кислот (C<sub>21</sub>-C<sub>27</sub>). Сумарна кількість довголанцюгових кислот зі збільшенням пасажів зменшувалася (в 2,4, 4,8 та 1,9 раза відповідно). На 150-му пасажі, подібно 130-му, на фоні поступового зниження не відмічено таких кислот як C<sub>26</sub>, C<sub>27</sub>, а C<sub>23</sub> та C<sub>24</sub> виявлялися у вигляді слідів, хоча останніх не встановлено на 130-му пасажі взагалі. У 1,8 рази збільшилась кількість бегенової

кислоти на 150-му пасажі, у 3,5 раза зменшилась кількість пентакозанової кислоти на 130-му пасажі.

Отже, у динаміці пасажів дослідженнями встановлено зниження кількості загальних ліпідів, фракцій фосфоліпідів, триацилгліцеролів та ефірів стеринів, суми насичених та довголанцюгових жирних кислот.

Приклад 3

На відміну від вихідного штаму, пасажовані мікобактерії, починаючи від 80-го пасажу почали втрачати вірулентні властивості (табл.7). Вочевидь, як свідчать дані, більш динамічними ці процеси відбувалися на середовищі з рН 6,5, хоча для живлення та розмноження мікобактерій, їх здатності утворювати колонії таке середовище є більш оптимальним. Це свідчить про відсутність зв'язку між швидкістю розмноження мікобактерій та їх вірулентністю.

Таблиця 7

## Сенсibiliзуючі та вірулентні властивості пасажованих мікобактерій

Живильне середовище, рН	№ пасажу	№ морської свинки	Алергічне дослідження, доба			Тривалість дослідження, днів	Специфічні ураження				Індекс ураження
			20	30	60		лімфатичні вузли	селезінка	печінка	легені	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
7,1	40	1	+	+	+	83	++	+++	-	++	16
		2	-	+	+	90	++	++	-	++	14
	59	3	+	+	-	59	++	+++	-	+++	18
		4	-	+	+	68	++	+++	-	++	16
	120	5	+	+	+	60	++	+++	-	++	16
		6	-	+	+	71	++	+++	-	++	16

Продовження таблиці 7

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
6,5	40	7	-	+	+	58	++	++	-	+++	18
		8	+	+	+	47	++	+++	-	+++	20
	80	9	-	+	-	85	++	+++	-	++	16
		10	-	+	+	90	++	++	-	++	14
	130	11	+	+	-	90	-	-	-	-	-
		12	-	+	+	90	-	-	-	-	-
	150	13	+	+	-	90	-	-	-	-	-
		14	-	+	+	90	-	-	-	-	-

Примітки: (результат)

1. "+" позитивний;

2. "-" негативний.

Для специфічних уражень:

1. "+" - поодинокі вузлики;

2. "++" - декілька вузликів;

3. "+++" - численні, рідко розташовані вузлики.

Встановлено, що хоча всі морські свинки і реагували на введення ППД-туберкуліну для свавців на 30-й день і більшість на 60-й день, проте пасажування мікобактерій через середовище з рН 6,5 до 150 пересіву призвело до втрати ними вірулентності і тварини були забиті на 90-й день дослідження. При розтині морських свинок патологоанатомічних змін, властивих туберкульозу, не ви-

явлено і індекс ураження внутрішніх органів підрахувати не можна.

Отже, паралельно зміні форми й структури колоній, морфології, тинкторіальних й біохімічних властивостей (зміни каталазної активності та здатності утворювати корд-фактор), ліпідного складу пасажованих мікобактерій на яєчному середовищі з рН 6,5 змінювалась і їх вірулентність до повного її зникнення.