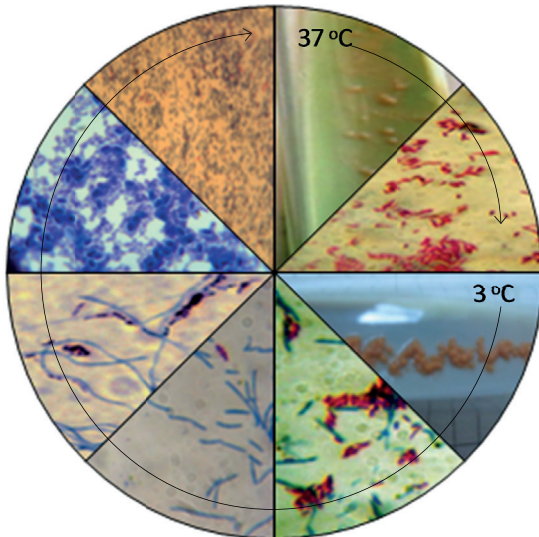


О.А. ТКАЧЕНКО

МІНЛИВІСТЬ
MYCOBACTERIUM BOVIS



О.А. ТКАЧЕНКО

МІНЛИВІСТЬ
MYSOBACTERIUM BOVIS

МОНОГРАФІЯ

І том

Житомир – 2017

УДК 619:616.98:579

РЕЦЕНЗЕНТИ:

О.І. Сосницький – доктор ветеринарних наук, професор (Дніпровський державний аграрно-економічний університет);

О.Є. Галатюк – доктор ветеринарних наук, професор (Житомирський національний агроекологічний університет).

Затверджено вченою радою Дніпровського державного аграрно-економічного університету (протокол № 11 від 29.06.2017 р.) та рекомендовано до друку науково-методичною радою “Науково-методичного центру інформаційно-аналітичного забезпечення діяльності вищих навчальних закладів “Агроосвіта” (протокол № 5 від 31.09.2017 р.).

Ткаченко О.А. Мінливість *Mycobacterium bovis*: монографія / О.А. Ткаченко. – Житомир: Полісся, 2017. – Т. I. – 396 с.

У монографії узагальнені результати багаторічних експериментальних досліджень автора, а також дані вітчизняної і зарубіжної літератури по одному з найбільш актуальному і недостатньо вивченому питанню сучасної мікробіології – про L-форми мікобактерій туберкульозу та їх біологічний цикл розвитку.

Послідовно викладений в динаміці пасажів через щільне живильне середовище біологічний цикл розвитку *M. bovis* характеризується закономірною зміною культуральних, тинкторіальних властивостей на тлі мінливості морфології, зміни (зниження) біологічної активності, вмісту загальних ліпідів, довго- і коротколанцюгових вільних жирних кислот та дисоціацією збудника (палички, ниткоподібні форми, зерна, L-форми, елементарні тільця) туберкульозу, набуттям можливості розмножуватися та накопичуватися за низької плюсової температури (3 °С), коли прикінцевою стадією розвитку є некислотостійкі зерна (за 37 °С – елементарні кислотостійкі тільця), а також імуногенною активністю на тлі низької / відсутньої сенсibiliзуювальної здатності.

Одержані дані розкривають один із можливих патогенетичних механізмів ендогенної туберкульозної інфекції та обґрунтовують можливі шляхи подальшої профілактики та боротьби з нею.

УДК 619:616.98:579

ISBN

© О.А. ТКАЧЕНКО,
2017

O.A. TKACHENKO

**THE VARIABILITY
OF *MYCOBACTERIUM BOVIS***

MONOGRAPH

I tom

Zhytomyr – 2017

UDK 619:616.98:579

REVIEWERS:

O.I. Sosnic'kij – Doctor of Veterinary Science, Professor (Dnipro State Agrarian and Economic University);

O.E. Halatiuk – Doctor of Veterinary Science, Professor (Zhytomyr National Agroecological University).

Approved by the Academic Council of Dnipro State Agrarian and Economic University (transactions No. 11 from 29.06.2017) and it is recommended for printing under recommendation of “Scientific-and-methodical Centre” of information and analytical coverage of activity of Higher Educational Institutions “Agroosvita” (transactions No. 5 from 31.09.2017).

Tkachenko O.A. The variability of *Mycobacterium bovis*: monograph / O.A. Tkachenko. – Zhytomyr: Polissia, 2017. – T. I. – 396 p.

In the monograph are summarized the results of long-term experimental researches of the author, as well as the data of domestic and foreign literature, concerning one of the most pressing and insufficiently studied problems of modern microbiology – L-forms of mycobacterium tuberculosis and their biological life cycle.

Consistently described in the dynamics of passages through dense nutrient medium biological cycle of *M. bovis* is characterized by natural changes in cultural, tinctorial properties on the background of variability of morphology, change (decrease) of biological activity, content of total lipids, long-chain and short-chain fatty acids, and dissociation of causative agent (bacillus, thread-like forms, grains, L-forms, elementary small bodies) of tuberculosis, acquisition of possibility to propagate and accumulate at low plus temperature (3 °C) in which as the final stage of development is non-acidproof grains (at 37 °C – elementary acidproof small bodies) and immunogenic activity on the background of low / missing sensitizing capacity.

The received data reveal the possible pathogenic mechanisms of endogenous tuberculosis infection and justify the possible ways to further prevent and fight against it.

UDK 619:616.98:579

ISBN

© O.A. TKACHENKO,
2017

Зміст

Передмова	9
РОЗДІЛ 1. Поширеність туберкульозу та економічні збитки від нього.....	13
1.1. Огляд літератури	13
1.1.1. Теоретико-експериментальні дані щодо проблеми агипових мікобактерій і зумовленої ними мікобактеріозної інфекції.....	17
1.1.1.1. Економічні збитки.....	22
1.2. Експериментальні дослідження.....	24
1.2.1. Збитки від туберкульозу великої рогатої худоби в окремих господарствах.....	24
1.2.2. Ретроспективне вивчення фактичних економічних збитків від туберкульозу великої рогатої худоби в Україні за 1960–2010 рр.	28
РОЗДІЛ 2. Історичний екскурс у цитологію та мінливість мікобактерій туберкульозу	35
2.1. Огляд літератури	35
2.1.1. Культуральні властивості L-форм	52
2.1.2. Морфологічні особливості L-форм	52
2.1.3. Можливі етапи L-трансформації і реверсії CWDB у вихідні бактеріальні форми.....	56
2.1.4. Метаболічна активність L-форм.....	60
2.2. Експериментальні дослідження.....	62
2.2.1. Видова належність мікобактерій, виділених від великої рогатої худоби, реагуючої на ППД-туберкулін для ссавців, неблагополучних щодо туберкульозу господарств.....	63
2.2.2. Біологічні властивості <i>M. bovis</i> швидкорослих штамів...	67
2.2.3. Частота ізоляції колоній та швидкість росту <i>M. bovis</i> епізоотичних штамів.....	74
2.2.4. Вивчення швидкості формування колоній <i>M. bovis</i> епізоотичних штамів 2–10-ї генерацій на щільному яєчному середовищі з рН 6,5 та 7,1–7,2.....	78
2.2.5. Особливості адаптивної здатності та мінливість <i>M. bovis</i> швидкорослого штаму на штучному щільному середовищі за численних пасажів.....	82

2.2.6.	Строки появи некислотостійких мікобактерій та деякі особливості характеру формування колоній	88
2.2.7.	Дослідження “чистоти” досліду та виділення чистого клону кислото- та некислотостійких мікобактерій.....	89
2.2.8.	Некислотостійкі ниткоподібні <i>M. bovis</i> та морфологічний аспект їх реверсії в бактеріальну кислотостійку форму....	90
	РОЗДІЛ 3. Дисоціація мікобактерій	96
3.1.	Огляд літератури	96
3.2.	Експериментальні дослідження.....	102
3.2.1.	Залежність морфологічних форм збудника від температури культивування	103
3.2.2.	Особливості культуральних, тинкторіальних, сенсibiliзуювальних, вірулентних властивостей та морфологічних ознак <i>M. bovis</i> дисоціативних L- та інших форм у динаміці пасажів через щільне середовище за температури 3 і 37 °С	114
3.2.3.	Біохімічна активність <i>M. bovis</i> дисоціативних форм	122
3.2.4.	Особливості росту <i>M. bovis</i> дисоціативних L- та інших форм на МПА; МПБ, та на елективному живильному середовищі (Левенштейна-Йенсена) із вмістом натрію саліциловокислого за різних температур культивування	124
3.2.5.	Вплив температури культивування в динаміці пересівів на морфогенез <i>M. bovis</i> дисоціативних L- та інших форм ...	136
3.2.6.	Вплив вмісту кислотно-лужних грам-еквівалентів (рН) середовища на морфологію, тинкторіальні властивості та пігментоутворення <i>M. bovis</i> дисоціативних форм.....	145
3.2.7.	Дослідження культуральних, тинкторіальних властивостей та морфології <i>M. bovis</i> чотирьох дисоціативних форм 100, 110 та 120 генерації.....	155
3.2.8.	Ріст субкультур <i>M. bovis</i> дисоціативних форм 117а, б, в та 118 варіантів на щільному живильному середовищі з 0,5 та 1 мг/см ³ натрію саліциловокислого.....	162
	РОЗДІЛ 4. Фільтривні форми мікобактерій туберкульозу	169
4.1.	Огляд літератури	169
4.2.	Експериментальні дослідження.....	171
4.2.1.	Дослідження фільтривних форм дисоціативних <i>M. bovis</i> 117а, б, в та 118 генерацій.....	172

РОЗДІЛ 5. Корд-фактор та біологічна активність мікобактерій	180
5.1. Огляд літератури	180
5.2. Експериментальні дослідження.....	189
5.2.1. Корд-фактор та зв'язок його з біологічною активністю мікобактерій.....	189
5.2.2. Динаміка “косоутворення” у <i>M. bovis</i> швидко- та повільно-рослого штамів.....	190
5.2.3. Корд-фактор та біологічна активність мікобактерій бичачого виду.....	190
5.2.4. Корд-фактор та біологічна активність <i>M. bovis</i> швидко-рослого штаму, пасажованого через живильні середовища	194
5.2.5. Корд-фактор та біологічна активність атипових мікобактерій	196
5.2.6. Корд-фактор та біологічна активність мікобактерій, виділених від зараженої морської свинки	199
5.2.7. Некислотостійкі мікобактерії та корд-фактор	204
РОЗДІЛ 6. Ліпіди мікобактерій	207
6.1. Огляд літератури	207
6.2. Експериментальні дослідження.....	218
6.2.1. Ліпідний склад мікобактерій еталонного штаму <i>Vallee</i> та вакцинного <i>BCG</i>	220
6.2.2. Ліпідний склад епізоотичного повільнорослого штаму <i>M. bovis</i> та атипових мікобактерій	223
6.2.3. Ліпідний склад <i>M. bovis</i> епізоотичних штамів – повільно-та швидкорослих	226
6.2.4. Вплив окремих факторів на ліпідний склад мікобактерій ...	228
6.2.5. Залежність ліпідного складу мікобактерій від рН штучного живильного середовища.....	234
6.2.6. Дослідження ліпідного складу <i>M. bovis</i> дисоціативних L-та інших форм перших генерацій культивованих за 3, 20 та 37 °С	264
6.2.7. Ліпідний склад <i>M. bovis</i> , виділених з ґрунту	278
6.2.8. Ліпідний склад мікобактерій, виділених від морських свинок, заражених різновіковою культурою <i>M. bovis</i> швидкорослого штаму	281

6.2.9.	Ліпідний склад <i>M. bovis</i> швидко- та повільнорослого штаму, культивованих на щільному середовищі з рН 7,1 та 6,5	285
6.2.10.	Залежність рівня вмісту ліпідів <i>M. bovis</i> від гідрогумату ...	290
6.2.11.	Ліпіди (фосфоліпіди) багаторазово пасажованих <i>M. bovis</i> дисоціативних форм	296
	РОЗДІЛ 7. Вживання мікобактерій	304
7.1.	Огляд літератури	304
7.2.	Експериментальні дослідження.....	308
7.2.1.	Властивості та стійкість мікобактерій залежно від фізико-хімічних показників ґрунту на різних глибинах залягання.....	308
	РОЗДІЛ 8. Ефективність імунізації великої рогатої худоби вакциною <i>BCG</i> та дисоціативними формами <i>M. bovis</i> ...	324
8.1.	Огляд літератури	324
8.2.	Експериментальні дослідження.....	340
8.2.1.	Епізоотологічна ефективність виробничого застосування вакцини <i>BCG</i> в системі оздоровчих заходів за туберкульозу великої рогатої худоби	340
8.2.2.	Досліди з вивчення імуногенної активності <i>M. bovis</i> дисоціативних форм, культивованих і накопичених за 3 і 37 °С	350
8.2.3.	З'ясування стабільності та нешкідливості <i>M. bovis</i> дисоціативних форм 120 генерації, культивованих за 3 °С ...	357
	ТЕЗИСНІ РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ	375
	БІБЛІОГРАФІЧНИЙ СПИСОК	387

ПЕРЕДМОВА

Пізнання людством проблеми туберкульозу відбувається тривало та неабияк складно – з давніх часів до наших днів. Хвороба людини та тварин як завдавала соціально-економічних втрат, так і завдає, щоправда, розповсюдження інфекції на континентах децю відрізняється так само, як і в окремих країнах того чи іншого континенту. Причини цьому різні і в загальному зводяться до впливу чинників біотичного і абіотичного (форм господарювання й соціально-економічних складових) характеру.

Однак біологічні чинники у виникненні інфекційного та епізоотичного процесів туберкульозу відіграють першочергову роль.

Минуло понад 130 років з часу відкриття збудника хвороби Р. Кохом. За цей період проводилися різноманітні численні дослідження вчених світу з вивчення біологічних властивостей мікобактерій: було встановлено, не без значних суперечностей наукових думок, та визначено декілька видів збудника туберкульозу, на знанні яких розроблена з подальшим удосконаленням практичними фахівцями ветеринарної медицини, вченими система профілактики й викорінення туберкульозної інфекції.

За відносно невеликий проміжок часу з відкриття збудника хвороби був селекціонований імуногенний вакцинний штам, який використовується й дотепер для специфічної профілактики туберкульозу в людини. Проте втрата генів вакцинного запасу за більше як 90-річне його застосування (умови зберігання, пасажування тощо) децю знизила імуногенність всесвітньо відомої вакцини (тому ведуться пошуки мікобактерій нових імуногенних штамів).

Тривала персистенція мікобактерій в організмі видів тваринного світу, й зокрема великої рогатої худоби, за багаторічного епізоотичного процесу не може не впливати на їх біологічні властивості. Це може супроводжуватися зміною метаболізму мікробної клітини, вмісту ліпідів та інших хімічних складових клітинної стінки й, відповідно, різноманітними мутаціями та модифікаціями, дисоціативними явищами в тій чи іншій популяції мікобактерій.

Особливо такі зміни стають помітними за удосконалення методів діагностики на рівні генетичного апарату мікобактерій. Результати досліджень останніх десятиліть з'ясували майже практичну ідентичність генного набору видів патогенних мікобактерій, що обґрунтовує об'єктивність суперечки вчених часів Р. Коха щодо видової належності трьох патогенних мікобактерій та визначає відновлення дискусії щодо цього питання з урахуванням сучасних результатів досліджень на молекулярному рівні.

Без сумніву, мінливість мікобактерій, відсутність досконалих знань про неї визначає ефективність профілактики й викорінення інфекції.

Розвиток методів, техніки досліджень мінливості мікобактерій може сприяти вирішенню цієї проблеми. Проте, як засвідчили дослідження, нові знання про мінливість можуть надати й прості, традиційні методи досліджень: систематичний пасаж через щільні живильні середовища за різних температур культивування, що відкриває принципово нову інформацію про

можливості мікобактерій виживати (розмножуватися) за температури, про яку не згадується в жодному науково-практичному виданні світу.

Пізнання біологічного циклу розвитку мікобактерій, на якому акцентується увага деякими вченими в останні 30–40 років, ще й досі не повністю сприймається більшістю вчених світу, але може суттєво розширити знання про збудника туберкульозу й докорінно змінити систему профілактики та викорінення хвороби оскільки кожна морфологічна форма збудника, на певному етапі циклу розвитку має особливі біологічні властивості, які часто не ідентифікуються, але, без вагань, мають суттєве (специфічне) значення в інфекційному та епізоотичному процесах, у тому числі й формуванні специфічного захисту макроорганізму від агресивного (патогенного), достатньо вивченої форми збудника туберкульозу.

У монографії наведені результати багаторічних досліджень (2002–2016 рр.), які проведені автором за наполегливої, ретельної та сумлінної безпосередньої участі кандидатів ветеринарних наук, доцентів кафедри епізоотології та інфекційних хвороб ДДАЕУ М.В. Білан, В.В. Глебенюка, П.О. Давиденка, О.М. Кулішенка, Л.О. Ковальової, Н.В. Алексєєвої, І.М. Шендрик, В.В. Зажарського, А.В. Ковальова. Викладені матеріали стосуються біологічного циклу розвитку *M. bovis* *in vitro*, *in vivo*, питань морфогенезу, біологічних властивостей форм збудника туберкульозу певних циклів розвитку, процесу конверсії (трансформації) та реверсії в умовах численних пасажів через щільне живильне середовище без індукуючих чинників за 3 і 37 °С культивування, організму морських свинок, розмноження мікобактерій на простих живильних середовищах, вмісту в клітинній стінці різних форм збудника ліпідів, імуногенної активності дисоціативних варіантів мікобактерій тощо.

У книзі наведено 183 рисунки, 146 таблиць. Автор прагнув послідовно, в доступній формі викласти матеріали, які стосуються мінливості мікобактерій, виходячи з власних багаторічних експериментальних досліджень, для того щоб вони були корисними не тільки лікарям ветеринарної та гуманної медицини, які працюють над цією глобальною проблемою, але й усім, хто досліджує мікроорганізми взагалі.

PREFACE

Cognition by the humanity of tuberculosis problem is in progress over a long period of time and not in a common way difficult – from the ancient times to the present days. The human and animal diseases inflicted the social and economic losses in former times and inflict theirs nowadays. However, spread of infection on continents is slightly different as well as in some countries of a continent. The reasons for that are different and in a general sense they boil down to the influence of factors of biotic and abiotic (forms of economic management and socioeconomic components) character.

However, biological factors play a top priority role in beginning of infection and epizootic processes of tuberculosis.

*Since discovering of the causative agent by R. Koch passed more than 130 years. During this period, wide variety and multiple investigations were carried out by scientists of the world to study the biological properties of mycobacteria. The several species of causative agent of *Mycobacterium tuberculosis* was found and identified not without considerable contradictions of scientific opinions. On the knowledge of theirs was developed the system of prevention and eradication of tuberculosis infection with the further improvement by practical experts of veterinary medicine, scientists.*

In a relatively short period from the time of discovery of the causative agent was selected an immunogenic vaccine strain, used till the present day for specific prevention of tuberculosis in humans. However, the loss of vaccine stock genes for more than 90 years of its utilization (conditions of storage, passage of microorganisms etc.) somewhat reduced immunogenicity of the world-known vaccine (and therefore are conducted searches of new immunogenic mycobacteria strains).

The long mycobacteria persistence in the organism of some species of animal kingdom, and in particular at the horned cattle, at long-term epizootic process should influence on their biological properties. This may be accompanied by the change in the metabolism of microbial cells, lipid content and other chemical components of the cell wall and, accordingly, various mutations and modifications, dissociative symptoms in some populations of mycobacteria.

Especially such changes become visible on the basis of improving diagnostic methods at the level of apparatus of mycobacteria genes. The research results of the last decades appeared the almost practical identity of genic set of pathogenic mycobacteria species, that is as substantiation of objective argumentations between scientists dating from the times of R. Koch relative to specific belonging to three pathogenic mycobacteria and determine the recovery of discussions on this problem with regard to up-to-date results of researches on the molecular level.

Undoubtedly, the variability of mycobacteria, the absence of thorough knowledge about it determines the effectiveness of prevention and eradication of the infection.

The development of methods, research techniques of mycobacteria variability can help in solving of this problem. However, as shown the researches, new knowl-

edge about the variability can provide and simple, traditional methods of research: the systematic passage through dense nutrient media at different temperatures of cultivation, that opens up entirely new information about the possibility of mycobacteria survive (multiply) at the temperature of which was not mentioned in any scientific and practical edition of the world.

The knowledge of the biological cycle of development of mycobacteria, on which is focused an attention of some scientists in the last 30–40 years, is still not fully accepted by most scientists in the world, but can significantly expand knowledge of Mycobacterium tuberculosis and fundamentally change the system of prevention and eradication of the disease, as every morphological form of causative agent, at some stage of the development cycle has the specific biological properties, that are often not identified, but undoubtedly have a significant (specific) importance in infectious and epizootic processes, including the formation of specific protection of microorganism from aggressive (pathogenic) sufficiently studied forms of Mycobacterium tuberculosis.

In the book are presented the results of long-term researches (2002–2016), which was conducted by the author at persistent, careful and conscientious direct participation of the Candidates of veterinary sciences, associate professors of Department of epizootology and infectious diseases of Dnipropetrovsk State Agrarian and Economic University M.V. Bilan, V.V. Hlebeniuk, P.O. Davydenko, O.N. Kulishenko, L.O. Kovaliova, N.V. Alekseeva, I.M. Shendryk, V.V. Zazharskyi, A.V. Kovaliov. The stated materials are concerned in the biological cycle of M. bovis in vitro, in vivo, problems of morphogenesis, biological properties of certain forms of causative agent of Mycobacterium tuberculosis under certain cycles of development, process of conversion (transformation) and reversion in conditions of the many passages through dense nutrient medium without inducible factors at 3 and 37 °C cultivation, the organism of guinea pigs, breeding of mycobacteria on simple nutrient media, content of lipids in the cell wall of various forms of causative agent, immunogenic activity of dissociative variants of mycobacteria etc.

In the book are presented 181 figures, 145 tables. The author sought sequentially in the accessible form to present the materials, concerning to the variability of mycobacteria, on the assumption of own long-term experimental researches, in order to make them useful not only for doctors of veterinary and humane medicine, working on this global problem, but also to all persons, which investigates the microorganisms in general.

ПОШИРЕНІСТЬ ТУБЕРКУЛЬОЗУ ТА ЕКОНОМІЧНІ ЗБИТКИ ВІД НЬОГО

Профілактика та викорінення туберкульозу тварин багато в чому залежать від розуміння значення впливу прояву хвороби на безпеку людини через харчові продукти й сировину тваринного походження.

Вагомим аргументом, який суттєво може впливати на епізоотичну ситуацію, є знання та усвідомлення неабияких економічних втрат, що можуть обумовлюватися проявом туберкульозу. Саме це й попереднє визначило проведення досліджень з цих питань як у межах окремих господарств, так і в Україні в цілому. Розкриття економічних збитків, які туберкульоз завдав країні за останні 50 років, визначить не тільки фінансову складову, а й виявить та обґрунтує переконливі, фундаментальні підходи, з урахуванням дослідженого нами біологічного циклу розвитку *M. bovis* щодо необхідності зміни методів викорінення туберкульозної інфекції, зокрема, великої рогатої худоби.

1.1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Туберкульоз тварин, зокрема великої рогатої худоби, зустрічається на всіх континентах земного шару, хоча і має неоднакову інтенсивність епізоотичного процесу та масштаби поширення. Ступінь прояву туберкульозу тварин в кожній окремо взятій країні залежить від рівня та повноти профілактичних і оздоровчих заходів, від якості та фінансового забезпечення науково обґрунтованих програм.

У 1987 році ураженість туберкульозом у державах світу коливалася від 0,05 до 1 % і більше. За середньосвітової зараженості, яка становила 0,5 % за рік, хворіє близько 6389 тис. тварин великої рогатої худоби. М.П. Овдієнко в 1989 році повідомляє, що станом на 1.01.1988 року туберкульоз тварин не реєструвався в 53 країнах світу, спорадичні випадки виявлялися в 64, а середня та часта захворюваність відмічалася в 37 державах.

І. Pavlik у 1996 році зазначив, що, за даними Міжнародного симпозіуму з проблеми туберкульозу, який відбувався в Балтімурському університеті (США) на американському континенті (1990–1993 рр.), було три епізоотичні категорії територій з туберкульозу тварин. До категорії “А” віднесено території, серед тварин яких туберкульоз реєструвався до 0,1 %. До цієї групи ввійшло 164, 4 млн тварин, що становить 37,7 % від усієї популяції тварин на американському континенті (США, Канада, Белізе, Колумбія, Куба, Панама, Уругвай і Венесуела). До другої категорії “В” віднесено країни з поширенням туберкульозу більше 0,1 % і загальним поголів'ям 251,3 млн тварин, тобто

57,6 % від усієї популяції тварин на американському континенті (Домініканська Республіка, Костарика, Гватемала, Мексика, Аргентина, Бразилія, Чилі і Парагвай). До третьої категорії “С” включено території з невідомою за офіційними даними епізоотичною ситуацією. На цих територіях розміщувалося 20,5 млн тварин, що становить 4,7 % від усіх тварин континенту (Болівія, Еквадор, Сальвадор, Гуана, Гаїті, Гондурас, Нікарагуа, Перу і Суріман).

Автор цих статистичних даних відмічає, що в Канаді епізоотична ситуація з туберкульозу стабілізована. Правда, в 1990–1992 рр. було знищено 29 стад. З 1987 року туберкулінація не проводиться.

У США в 1991 році туберкульоз реєструвався лише в 0,002 % тварин. Проте за останні роки хвороба зареєстрована в 11 стадах. Проблема туберкульозу останніх років зумовлена систематичним завозом тварин, інфікованих збудником туберкульозу, з прикордонних територій Мексики, в якій налічується скомпromетованих відносно туберкульозу приблизно 30 % стад. При туберкулінації поголів'я 38 562 стада в 1993 році позитивні результати одержані у 2,37 млн тварин, що становить 0,23 % від досліджених.

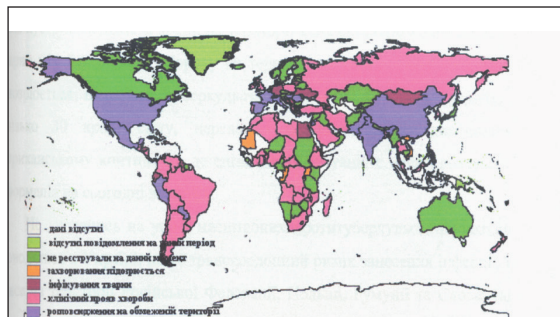
Посилаючись на інших авторів, І. Pavlik у 1996 році відмічає, що в окремих країнах Південної Америки епізоотична ситуація з туберкульозу тварин далека до вивченої.

Відсоток інфікованих стад / відсоток інфікованих тварин становить: в Гуані 5,2 % / невідомо; Сурінам 5,5 % / 0,01 %; Бразилії 5,1 % / 0,15 %; Перу 52 % / невідомо; Болівії 18,6 % / невідомо; Аргентині 37 % / 3,0 %; Парагваї 4,4 % / 0,1 %.

В Австралії і Новій Зеландії туберкульоз, зумовлений мікобактеріями бичачого виду в 1988–1994 рр. реєструвався в 52 стадах.

Найбільш напружена епізоотична ситуація з туберкульозу спостерігається в Африці. У минулому 70 % стад було уражено збудником туберкульозу. Натепер майже в два рази знизилася напруженість епізоотичної ситуації з туберкульозу на цій частині Земної кулі.

Б. Ликов зі співавторами в 1995 році повідомили, що в Болгарії за 1983–1990 рр. зареєстровано 71 епізоотичне вогнище туберкульозу великої рогатої худоби в 11 районах, які в 77,46 % розміщувалися в північно-східній частині держави.



За даними, які повідомив А.П. Палій, у 2013 році туберкульоз сільськогосподарських тварин реєструється на всіх континентах і практично в усіх

Рис. 1. Епізоотична ситуація з туберкульозу великої рогатої худоби у світі (2007–2012 рр.)

країнах світу як серед домашніх тварин, так і серед дикої фауни. Установлено, що дана інфекція характеризується нерівномірним розповсюдженням та довготривалістю еволюційного поліпшення епізоотичної ситуації і в багатьох країнах має клінічний прояв (рис. 1, табл. 1).

За цього, спостерігається поступове зменшення кількості країн, вільних від туберкульозної інфекції (з 63 у 2007 р. до 46 у 2011 р.), збільшення кількості країн, стаціонарно неблагополучних щодо туберкульозу великої рогатої худоби (ВРХ), де інфекція має клінічний прояв (з 68 у 2007 р. до 80 у 2011 р.). Зазначимо, що щорічно збільшується і кількість країн, на території яких спостерігається інфікування тварин мікобактеріями; у середньому 10 країн світу підозрюються на наявність туберкульозної інфекції. Стабільно залишається близько 30 країн світу, переважна більшість яких розташована на Африканському континенті, де епізоотична ситуація є непередбачуваною, з відсутньою натепер інформацією.

Незважаючи на успіх масштабних протитуберкульозних заходів, що проводяться в Україні, існує транскордонний ризик занесення збудника інфекції, перш за все з території Російської Федерації, Польщі, Румунії та Словаччини, а також з інших неблагополучних щодо туберкульозу країн у результаті імпорту тварин та продуктів тваринного походження.

1. Епізоотична ситуація з туберкульозу великої рогатої худоби у світі (2007–2011 рр.)

Статус країни	Кількість країн, що надали звітність до МЕБ				
	2007 р.	2008 р.	2009 р.	2010 р.	2011 р.
Туберкульоз не виявлено	63	66	44	47	46
Прояв інфекції з кількісними даними	41	47	52	54	59
Прояв інфекції без кількісних даних	27	28	25	19	21
Інфікування тварин без клінічних ознак	13	16	17	17	16
Захворювання підозрюються	5	7	11	9	7
Інформація відсутня	21	18	34	29	31

Наведені статистичні дані поширеності туберкульозу у тварин, зумовленого мікобактеріями бичачого виду, свідчать про те, що захворювання має місце на всіх континентах.

Між тим, за нашими даними, у 1998 році туберкульоз великої рогатої худоби на території України мав нерівномірне розповсюдження. Найбільш напружена епізоотична ситуація відмічалася у двох з чотирьох природно-географічних зон держави – в лісостеповій, а особливо – в степовій зонах. Це підтверджують дані з патолого-анатомічного прояву туберкульозу у тварин. У 1990–1994 рр. в степовій зоні частота патолого-анатомічного прояву хвороби у тварин становила $417,3 \pm 42,4$; у лісостеповій – $377,5 \pm 79,6$; у гірській та передгірській зонах Карпат – $78,7 \pm 6,9$ і поліській – $120,7 \pm 31,6$ на 100000 оглянутих на секції тварин. Про ензоотичність розповсюдження туберкульозу свідчать і повідомлення Б. Ликова зі співавт. в 1995 році.



Рис. 2. Епізоотична ситуація з туберкульозу ВРХ в Україні (2007–2012 рр.)

траплялися у Вінницькій (3), Житомирській (1), Запорізькій (2), Кіровоградській (1), Полтавській (1), Тернопільській (2), Харківській (1), Херсонській (1), Чернігівській (4) областях України. Поширення туберкульозу серед ВРХ у цих областях було пов'язано з рядом чинників, головними з яких є поглиблення міжгосподарських зв'язків, відсутність літньо-табірного утримання тварин,

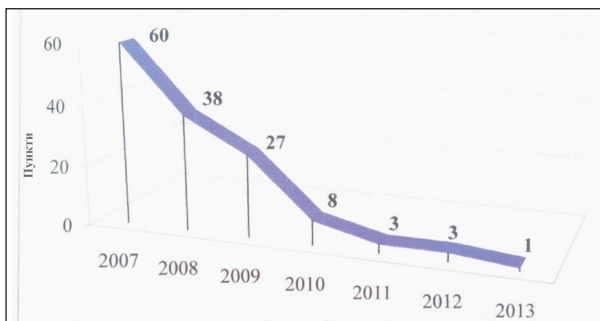


Рис. 3. Динаміка неблагополучних пунктів щодо туберкульозу ВРХ в Україні

Як повідомляє в 2013 році А.П. Палій (рис. 2), з 2007 по 2012 рік надзвичайного поширення туберкульозна інфекція досягла у 38 господарствах Київської області. За цей період захворювання ВРХ на туберкульоз було зареєстровано в 10 господарствах Черкаської та у 16 Сумської областей. Спорадичні випадки захворювання тварин на туберкульоз траплялися у Вінницькій (3), Житомирській (1), Запорізькій (2), Кіровоградській (1), Полтавській (1), Тернопільській (2), Харківській (1), Херсонській (1), Чернігівській (4) областях України. Поширення туберкульозу серед ВРХ у цих областях було пов'язано з рядом чинників, головними з яких є поглиблення міжгосподарських зв'язків, відсутність літньо-табірного утримання тварин, несвоєчасний забій хворих на туберкульоз тварин, неякісне виконання ветеринарно-санітарних заходів, відсутність пастеризаторів для знезараження молока та відвіюк. В інших 12 областях України та АР Крим жодного випадку захворювання ВРХ на туберкульоз зареєстровано не було.

З 2007 року завдяки проведеним широкомасштабним плановим протиту-беркульозним заходам кількість неблагополучних пунктів значно зменшилась і на початок 2013 р. залишилося тільки одне господарство, де зареєстровано туберкульозну інфекцію (Кіровоградська обл.) – рис. 3.

Незважаючи на те, що поголів'я великої рогатої худоби України на 01.04.2013 р. оздоровлено від туберкульозу у 18–20 областях за планових алергічних досліджень у 320–340 благополучних господарствах щорічно виявляють сенсibilізованих щодо туберкуліну (ППД) для ссавців тварин.

Бактеріологічним дослідженням 20372 проб біологічного матеріалу,

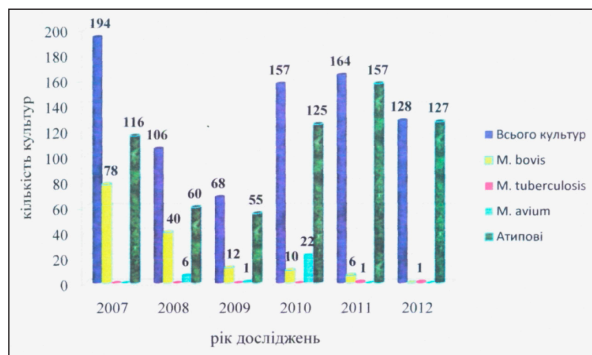


Рис. 4. Виділення культур мікобактерій в Україні

відібраного від реагуючих на туберкулін тварин обласними лабораторіями ветеринарної медицини України з 2007 по 2012 рік, було виділено 817 культур мікобактерій. Із них до збудника *M. tuberculosis* віднесено 2 культури, до *M. bovis* – 146 культур, до *M. avium* – 29 культур, до атипових мікобактерій – 640 культур (рис. 4).

Отримані результати підтверджують значне поширення мікобактерій на території нашої країни. Поряд із цим зазначимо, що з 640 культур атипових мікобактерій значна їх частина віднесена до видів *M. triviale*, *M. gordonae*, *M. xenopi*, *M. ulcerans*, *M. diernhoferi*, *M. peregrinum*, *M. phlei*, *M. thamnopheos*, *M. vaccae*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*.

1.1.1. Теоретико-експериментальні дані щодо проблеми атипових мікобактерій і зумовленої ними мікобактеріозної інфекції

Неспецифічна сенсibilізація досить поширена серед великої рогатої худоби, благополучної щодо туберкульозу, і зустрічається в багатьох господарствах (50–80 %) тієї чи іншої області. При цьому реагує значна кількість тварин, але в окремі роки не більше 19 % за чотириразового алергічного дослідження за рік. Природа алергічних реакцій встановлюється бактеріологічним дослідженням біологічного матеріалу, одержаного від забитих тварин, які реагували на ППД-туберкулін для ссавців. Із проб біологічного матеріалу виділяються культури атипових мікобактерій (Овдiенко М.П., 1990; Донченко О.С., 1991; Кассіч Ю.Я. і співавт., 1996, 1997), тому реакція на ППД-туберкулін свідчить про стан зараження тварини, в організм якої проникли та адаптувалися до нього мікобактерії.

При інокуляції в макроорганізм атипичних мікобактерій для розвитку стану алергії необхідний такий самий відрізок часу (5–45 днів), як і при туберкульозі (Кассіч Ю.Я. і співавт., 1985; Донченко О.С. і співавт., 1985; Ткаченко О.А., Шевців М.В., 1993). Ці дані свідчать про те, що з моменту проникнення атипичних чи типових мікобактерій в макроорганізм до прояву алергічної реакції необхідний певний час для розмноження та накопичення збудника, тобто інкубаційний період, який є елементом інфекційного процесу. Лише згодом змінюється, підвищується реактивність, яка при туберкульозі є складовою інфекційного процесу і зберігається у хворих тварин більше року. В окремих тварин (Найманов А.Х. і співавт., 1995) інтенсивність алергії зникає або ж знижується при шостому дослідженні через 45–60 днів. Це може бути зумовлене інкапсулюванням первинного вогнища і самовилікуванням окремих тварин (Кузін О.І., 1991).

У більшості тварин, інфікованих атипичними мікобактеріями, стан алергії на туберкулін зникає через 30–45 днів (Щуревський В.Е. і співавт., 1984; Донченко О.С. і співавт., 1985; Ткаченко О.А., 1985; Падалиця А.М., 1995), що свідчить про короткочасність імунобіологічних процесів.

Разом з тим йдеться не лише про неспецифічну сенсibiliзацію тварин щодо ППД-туберкуліну для ссавців (Кассіч Ю.Я. і співавт., 1996, 1997), оскільки до 63 % антигенів атипичних мікобактерій та мікобактерій бичачого виду є спорідненими (Лисенко А.П., 1987; Завгородній А.І., 1997), а сам туберкулін, навіть за 10-кратного повторного введення, не сенсibiliзує здорових корів. Водночас у хворих на туберкульоз тварин змінена реактивність виявляється алергеном, одержаним із штамів атипичних мікобактерій.

У 50 % великої рогатої худоби з реакцією на алерген, обумовленою атипичними мікобактеріями, в різних органах виявляються продуктивні параспецифічні й дуже рідко некротичні зміни, які характеризуються запальними вогнищами з наявністю гігантських клітин Пирогова-Лангханса, типових для інфекційних гранулом (Піддубський І.В. і співавт., 1966; Шишков В.П. і Урбан В.П., 1991), зокрема туберкульозних. Це в багатьох випадках призводить до помилки при постановці діагнозу на туберкульоз.

Водночас атипичні мікобактерії, за окремими повідомленнями (Schlisser T., 1965; 1978; Charagas S.D., 1982; Мартма О.В. і Тяхнас К.К., 1986; Павлас М., 1991), можуть сприяти розвитку макроскопічних патолого-анатомічних змін, подібних до туберкульозних, на підставі чого ще в 1978 р. Ю.Я. Кассіч із співавторами обґрунтували здатність атипичних мікобактерій приживатися в організмі морських свинок та стимулювати в ньому інфекційний процес.

Подібний процес у великої рогатої худоби може протікати у формі латентного мікробіозу при інфікуванні її збудником туберкульозу бичачого виду послабленої вірулентності і невластивими для цього виду тварин мікобактеріями туберкульозу людського і пташиного видів, а також атипичними мікобактеріями.

Численні автори (Чепик Г.В., 1978; Шаров О.М., 1985; Урбан В.П. і співавт., 1986; Шаров О.М. і Ауштрова К.М., 1990; Кассіч Ю.Я. і співавт.,

1996, 1997) при визначенні стану інфікованості тварин атипovими мікобактеріями та мікобактеріями інших видів орієнтуються на туберкулінову пробу.

І це обґрунтовано, бо гістологічні зміни шкіри у хворих на туберкульоз та інфікованих атипovими мікобактеріями корів розвиваються за типовою схемою, характерною для гіперергічної реакції сповільненого типу. У зв'язку з цим за характером гістологічних змін шкіри неможливо диференціювати параспецифічні реакції (зумовлені атипovими мікобактеріями) у великої рогатої худоби від специфічних, стимульованих мікобактеріями бичачого виду.

Відомо, що атипovі мікобактерії не можуть сприяти розвитку характерних для туберкульозу патолого-анатомічних ознак, а тварина чи людина визнається хворою лише у випадку появи в органах відповідних макроскопічних уражень. В іншому випадку, за наявності тільки алергічної туберкулінової реакції як наслідку сенсibiliзації атипovими мікобактеріями чи мікобактеріями туберкульозу, йдеться лише про стан зараженості, тобто інфікованості (Рабухін А.Е., 1964; Щуревський В.Е., 1974; Овдієнко М.П., 1990; Косолапов Є.О., 1997). Згодом, за наявності в тканинах макроорганізму збудника з відповідною біологічною активністю, стан зараженості, інфекції може розвинути і перейти в явну хворобу. Доведено, що серед інфікованих людей впродовж життя захворюють на туберкульоз не менш 2–3 % (Schmidt, 1971).

У телят, заражених в умовах експерименту атипovими мікобактеріями, не вдалося відтворити інфекцію та підтвердити її наявність із застосуванням туберкулінової проби як діагностичного тесту (Ткачов-Кузьмін А.В., 1981; Кассіч Ю.Я. і співавт., 1995, 1996, 1997). Можливо, на це вплинув вік експериментальних тварин, бо відомо, що молодяк у віці від 1 до 24 міс. практично ніколи не реагує на туберкулін (Донченко О.С., 1987; Овдієнко М.П. і співавт., 1989; Ходун Л.М. і співавт., 1991; Румачик І.І., 1995; Смолянинов Ю.Я., Падалиця А.П., 1995; Ткаченко О.А., 1996, 1997). Цілкові ймовірно, що негативному результату сприяло помилкове застосування вибраного алергену-туберкуліну, оскільки в телят, заражених мікобактеріями-сапрофітами, алергія на гомологічний препарат проявлялася досить тривалий час (Піддубський І. В. і співавт., 1966).

На відміну від телят у корів, яких заражали атипovими мікобактеріями, вдалось відтворити не тільки стан інфекції з прихованим короткостроковим інфекційним процесом, а й визначити їх як джерело збудника інфекції.

У 1908 р. С.С. Стеріопуло описав казуїстичні випадки уражень різних органів людини нетипovими мікобактеріями, а в 1922 р. А.А. Calmette повідомив про мікобактерії, які відрізнялися від класичних збудників туберкульозу людини і великої рогатої худоби, а пізніше були віднесені до потенційно патогенних.

За даними С.Д. Полетаєва і В.М. Погорелова (1986), у світі спостерігається досить чітка нерівномірність у частоті висівання потенційно патогенних мікобактерій від хворих на туберкульоз людей по країнах – від частки відсотка до 8–9 %.

У людини мікобактеріози, зумовлені окремими видами атипових мікобактерій, виникають на тлі порушення імунної відповіді (Chararas S., 1982) та низької резистентності організму. Подібне явище спостерігається і у тварин.

Таким чином, узагальнюючи далеко неповний теоретичний та експериментальний власний та інших дослідників матеріал, можна стверджувати, що в господарствах окремих областей атипові мікобактерії II, III та IV груп, за класифікацією Раніона, здатні адаптуватися до організму великої рогатої худоби, яка починає реагувати на ППД-туберкулін для ссавців. Частота цих реакцій суттєво відрізняється (Ткаченко О.А., 1997). У степовій зоні в 1985–1994 рр. вона становила $1244,3 \pm 149,5$ тварини, в лісостеповій – $601,5 \pm 25,1$, у гірській та передгірській зоні Карпат – $252,2 \pm 78,1$ та в поліській зоні – $431,1 \pm 28,2$ на 100000 поголів'я.

Взаємодія атипових мікобактерій з організмом людини і тварини визначається вченими Пенсо та Френксоном (1957, 1960) терміном “мікобактеріози”. На наш погляд, у тваринництві, зокрема, коли йдеться про інфікування великої рогатої худоби атиповими мікобактеріями, епізоотологічно виправданим та обгрунтованим є використання терміну “мікобактеріозна інфекція”. Ця форма не характеризується виникненням патолого-анатомічних змін типу туберкулів (горбиків), що не дає підстав для віднесення її до туберкульозної інфекції, але, завдяки динамічному розвитку імунобіологічних ознак, може розглядатись як інфекція, що протікає приховано (Кассіч Ю.Я. і співавт., 1981; Найманов А.Х. і співавт., 1985; Донченко О.С., 1989; Овдієнко М.П., 1990; Tkatschenko A.A. und Schewziv M.W., 1994; Красников Г.А., 1997 та ін.).

Прояв алергічних реакцій на ППД-туберкулін для ссавців у тварин значної кількості господарств, благополучних щодо туберкульозу, без сумніву, потребує ретельного вивчення їх етіології та відповідно збереження, як показали дослідження (Ткаченко О.А., 1986), високопродуктивного поголів'я (корів).

Тому з метою пізнання можливого зв'язку проявлення внутрішньошкірних алергічних реакцій на введення ППД-туберкуліну для ссавців і персистенції в організмі атипових мікобактерій провели (Ткаченко О.А.) в 1985 році дослідження 283 проб біологічного матеріалу від реагуючої на діагностикум великої рогатої худоби благополучних щодо туберкульозу господарств Рівненської області та забитої в різні строки після виявлення алергічної реакції. Такі дослідження обгрутовувалися короткостроковим проявом алергічної реакції у тварин, благополучних щодо туберкульозу.

У результаті встановлено, що з досліджених 38 проб у перші п'ять днів у 27 пробах (71,05 %) – ізольовані культури атипових мікобактерій, з 10 проб у перші 10 днів – у 5 (50,0 %), з 78 в перші 15 днів – у 23 (29,49 %), з 13 проб у перші 20 днів – у 3 (23,08 %), з 54 в перші 25 днів – у 6 (11,11 %), з 39 в перші 30 днів – у 2 (5,13 %) і з 51 в перші 40 днів – у 3 (5,88 %).

Одержані дані свідчать про те, що зі збільшенням термінів між виявленням алергії у тварин і забоем реагуючої на ППД-туберкулін для ссавців великої рогатої худоби знижується частота ізоляції культур атипових мікобакте-

рій. Висока результативність бактеріологічних досліджень виявлена в разі дослідження біологічного матеріалу протягом перших п'яти діб після туберкулізації (71,05 %) і дещо менше – в період від 6 до 10 діб (50,0 %). Проте в ці два періоди в усіх випадках не менш ніж від однієї тварини ізолювали культури атипичних мікобактерій. Виділені згадані культури мікобактерій і від партій проб, одержаних в період 21–25 діб, але в меншій кількості, ніж в перших двох – тільки в 11,11 % проб. Дуже низька результативність одержана за дослідження біоматеріалу після 26 діб виявлення алергічної реакції.

Про високу результативність бактеріологічних досліджень матеріалу, який поступив у перші 5 діб після виявлення алергії, свідчать дані по окремих господарствах. Так, численні дослідження матеріалу, який надійшов до лабораторії протягом п'яти діб від забитих тварин, що реагували на туберкулін із колгоспу “Маяк” Радзивилицьського району, підтверджували сенсibiliзуючу роль атипичних мікобактерій в 66, 67–100 % випадках, у період від 11 до 15 діб – у 16,67–60,0 % випадків, у період від 26 до 30 діб – жодному випадку і після 31 доби тільки в 9,09 % випадків.

Одержані результати досліджень свідчать про тісний зв'язок між наявністю в організмі атипичних мікобактерій, які виділені лабораторними дослідженнями, і тривалістю перетримок тварин, реагуючих на туберкулін ($r = -0,93$).

Наведені дані дають підставу припускати, що атипичні мікобактерії, після проникнення в організм, сенсibiliзують його. Через короткий період часу макроорганізм звільняється від атипичних мікобактерій, унаслідок чого зникає алергічна реакція. А можливо, це явище обумовлюється переходом атипичних форм мікобактерій в цей період в інші морфологічні форми з іншими біологічними властивостями, які погано або зовсім не культивуються на звичайних елективних середовищах.

Установлена закономірність взаємозв'язку має певне пізнавальне значення в епізоотології мікобактеріозної інфекції.

Аналіз показує, що на території України тільки в 1,9 % випадків піддають діагностичному забою тварин у перші п'ять діб після виявлення алергічних реакцій на ППД-туберкулін для ссавців. Це свідчить про необхідність перегляду методичних підходів щодо визначення термінів забою тварин.

Важливого практичного значення набуває питання диференціації звичайного туберкульозу й атипичної мікобактеріозної інфекції, особливо при проведенні алергічних досліджень з використанням ППД-туберкуліну в благополучних господарствах. Визначено, що застосування знижених доз алергену сприяє активному виявленню тварин, заражених збудником туберкульозу, за відсутності реакції на діагностикум у випадку інфікованості їх тільки атипичними мікобактеріями.

За три роки впровадження зменшеної дози ППД-туберкуліну збережено значну кількість тварин.

Водночас оптимізація співвідношення інгредієнтів штучного живильного середовища (Ткаченко О.А., 1998) та застосування більш специфічного й ак-

тивного алергену (Ткаченко О.А. і Короленко Л.С., 1998) буде сприяти подальшому підвищенню диференціації туберкульозу від мікобактеріозної інфекції.

Підсумовуючи результати роботи, можна відзначити таке. Адаптація атипичних мікобактерій до організму тварин супроводжується зміною реактивності їх організму, формуванням стану зараженості, яка може виявлятися як ППД-туберкуліном для ссавців, так й алергенами, виготовленими з атипичних мікобактерій. Стан мікобактеріозної інфекції характеризується короткостроковим доброякісним проявом інфекційного процесу, що перебігає приховано.

Через тісну антигенну спорідненість атипичних мікобактерій з мікобактеріями туберкульозу, зокрема мікобактеріями бичачого виду, необхідно переглянути визначення прояву алергії як “неспецифічна сенсибілізація щодо ППД-туберкуліну для ссавців” (у разі зараження атипичними мікобактеріями) й замінити на “алергічні реакції, зумовлені атипичними мікобактеріями” (на випадок виділення таких мікроорганізмів з біологічного матеріалу та виявлення сенсибілізувальних властивостей на морських свинках).

Рекомендовані оптимальні терміни проведення діагностичного забою тварин сприяли підвищенню результативності бактеріологічних досліджень на мікобактеріозну інфекцію в 4 рази.

Концентрація ППД-туберкуліну для ссавців 5000 МО дала можливість зменшити кількість випадків прояву реакцій на алерген, зумовлених атипичними мікобактеріями у великій рогатій худоби в благополучних щодо туберкульозу господарствах, що дозволило тільки за три роки зберегти близько 3500 тварин, причому в основному високопродуктивних корів.

Дані наукової літератури доводять, що, незважаючи на розробку достатньо ефективної епізоотологічно виправданої системи профілактики та боротьби з туберкульозом, зокрема у великій рогатій худоби, ця проблема з різних біотичних та абіотичних факторів ще й сьогодні стоїть на одному з перших місць серед особливо небезпечних антропозоонозних захворювань.

1.1.1.1. Економічні збитки. Ступінь прояву, поширеності хвороби тварин на конкретній території, як стверджують в 1991 р. В.А. Седов і А.А. Бойко, визначаються якістю науково обґрунтованих програм боротьби з хворобою та, що надзвичайно важливо, їх фінансовим забезпеченням, оскільки проблема ліквідації туберкульозу залежить впершу чергу від матеріальної підтримки державою. Проте, як засвідчили дослідження, не тільки це може суттєво впливати на епізоотичний процес.

Значне поширення збудника туберкульозу, й хвороби зокрема, завдає сільськогосподарським підприємствам економічні збитки, які за різними методиками розрахунків по періодах суттєво відрізняються, що може бути пов'язано й з недосконалістю підрахунків, з різною епізоотичною ситуацією в тому чи іншому господарстві.

У 1976 році О.І. Кузін наводить дані про опосередковані збитки від проведення алергічного дослідження 1000 голів великої рогатой худоби за одноразового проведення внутрішньошкірної і очної туберкулінізації. Вони становили 12 руб. 95 коп. (по 1,3 коп. на одну тварину); вартість дезінфекції 1 м² підлоги

лужним розчином формальдегіду – 3,8 коп. Загальні витрати в перерахунку на одну хвору тварину дорівнювали 280,4±55,7 руб. (у цінах того періоду).

О.С. Донченко в 1971 році повідомляє, що величина збитку від туберкульозу тварин залежить також від ефективності протитуберкульозних заходів, які проводяться в господарстві. Він наводить приклад, коли в господарстві за безсистемної оздоровчої роботи збитки від захворювання тварин туберкульозом на одну захворілу тварину сягали 443,2 руб.

Розмір збитку від туберкульозу в кожному господарстві, районі, області, державі неоднаковий. На його рівень впливає перш за все ступінь поширеності і прояв інфекційного та епізоотичного процесів туберкульозу, величина витрат на проведення протиепізоотичних заходів (Luengo L.J. й співавт., 1995). Повідомляється (Кассіч Ю.Я. й співавт., 1990), що в Угорщині щорічно збитки від бракування м'яса хворих на туберкульоз тварин у середньому становить 5–6 млн форинтів, а в 1965 році від туберкульозу великої рогатої худоби держава зазнала збитків в 1 млрд форинтів. Чехословаччина на кожній хворій тварині щорічно втрачала до 50 кг м'ясних продуктів. У Румунії від втрат м'яса спостерігалися більш значні збитки, оскільки бракували від 10 до 20 % туш хворої великої рогатої худоби, а в Чилі (1986 р.) та Ефіопії (1985–1990 рр.) – лише 0,38 % (Luengo L.J. й співавт., 1995) та 0,4 % (Yehualaeshet I., 1995) відповідно. На подібні результати втрат вказують й інші дослідники (Бокун А.О. й співавт., 1987; Авилов В.М. і Пилинин В.Ф., 1992).

У США збиток від туберкульозу великої рогатої худоби щорічно сягав 80 млн доларів, Англії – 20 млн фунтів стерлінгів, Франції – 15 млн франків (Villedas D.M., 1965). У Швейцарії туберкульоз тварин до 1950 року щорічно завдавав збитків у сумі 20 млн (Allenspach V. Arch, 1960; Fluekiger G. i Water W., 1956), а в наступні роки – 50 млн франків.

У 1967 році Т. Schliesser повідомляє, що в Західній Німеччині на одну захворілу на туберкульоз тварину збиток становив 80–100 марок, а в 1965 році він досяг 200 марок; із цієї причини в державі щорічно вибракували до 60 тис. свинячих туш; збитки сягали 5–6 млн марок.

Надзвичайно вражаючі витрати спрямовані на боротьбу з туберкульозом великої рогатої худоби. 1954 року вони становили: в Австрії – 101,5 млн шилінгів, Бельгії – 165,3 млн. франків, Англії – 12,3 фунтів стерлінгів, в Австралії в 1973–1979 рр. – 125 млн, а в 1984 році – більше 230 млн доларів (Armstrong J.R., 1985). У Великобританії витрати на протитуберкульозні заходи протягом 25 років становили 130 млн фунтів стерлінгів. У Голландії за 1951–1956 рр. – 80 млн форинтів, у Франції лише в 1958 році – 5,5 млрд франків (Благодарний Я.А., 1972), в УНР тільки на закупівлю тварин, замість забитих хворих корів, виділено 1.252.225.200 форинтів (Denes L.A., 1983 р.).

Саме тому й за відсутності глибоких та різнобічних досліджень в масштабі України нами вивчалися економічні показники збитків, як на групі господарств, так і в межах держави, за досить тривалий період (1960–2010 рр.), який характеризується зміною соціально-політичної формації суспільства взагалі та системи господарювання, зокрема.

1.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

За вихідні дані економічної оцінки збитків від туберкульозу були взяті основні виробничо-економічні показники (зокрема закупівельні ціни), які відповідають загальним нормам статистичної звітності і господарської діяльності, та власні дані, одержані за алергічного та патолого-анатомічного дослідження тварин окремих неблагополучних щодо туберкульозу гуртів.

1.2.1. Збитки від туберкульозу великої рогатої худоби в окремих господарствах

Визначення суми величини фактичних збитків від захворювання великої рогатої худоби туберкульозом проводили відповідно до структури економічних збитків (табл. 2).

2. Вихідні показники розрахунку економічних збитків від туберкульозу великої рогатої худоби

№ п/п	Показник	Усереднені дані по семи господарствах
1	2	3
1.	Кількість корів на початок встановлення діагнозу на туберкульоз	357
2.	Кількість поголів'я великої рогатої худоби на той самий час	838
3.	Кількість додаткових туберкулізацій за період неблагополуччя	3,1
4.	Кількість реагуючих на туберкулін тварин/усього корів	247/142
5.	Кількість туш, відправлених на: стерилізацію утилізацію	72 53
6.	Середньодобовий надій на корову, кг	3,2
7.	Продуктивність на корову, кг	582
8.	Кількість реалізованого несортного молока, т	89,5
9.	Закупівельна ціна молока від здорових корів, грн/т	312
10.	Витрати на пастеризацію молока, грн	665,4
11.	Закупівельна ціна молока, грн/т: 1-го сорту несортного	310 175
12.	Втрати від зниження надоїв від додаткових туберкулізацій, грн/корову	150

1	2	3
13.	Вихід телят на 100 корів	52
14.	Реалізаційна ціна, грн: племінної телиці реагуючої на туберкулін телиці, яка втратила племінну цінність	510 210
15.	Витрати на, грн: дезінфекцію санітарний ремонт приміщень вартість сепарації та стерилізації молока грн / т	769 636,6 26

Визначення збитків від зниження якості молока проводили за формулою

$$З = B_p \cdot (Ц_з - Ц_б),$$

де B_p – кількість неякісної продукції;

$Ц_з, Ц_б$ – закупівельна ціна продукції відповідно якісної та низької якості;

$$З = 89,5 \cdot (310 - 175) = 89,5 \cdot 135 = 12082,5 \text{ грн}$$

Збитки від зниження якості м'яса у випадку виявлення локальних змін в органах становили:

$$З = B_p \cdot (Ц_з - Ц_б),$$

де B_p – кількість м'яса, направлено на стерилізацію;

$Ц_з, Ц_б$ – закупівельна ціна продукції відповідно якісної та низької якості.

$$З = 8,2 \cdot (3200 - 1600) = 8,2 \cdot 1600 = 13120 \text{ грн}$$

Від зниження племінної цінності телиць збитки обчислювали в такий спосіб:

$$З = M_n \cdot (Ц_n - Ц_б),$$

де M_n – кількість племінних телиць;

$Ц_n$ – ціна племінної телиці;

$Ц_б$ – ціна телиці, яка втратила племінну цінність.

$$З = 78 \cdot (510 - 210) = 78 \cdot 300 = 23400 \text{ грн.}$$

Збитки господарства від зниження надоїв у результаті проведення додаткових туберкулінізацій розраховували за формулою:

$$З = \frac{M_o \cdot 3,08 \cdot 6}{100} \cdot M \cdot Ц \cdot A;$$

де M_o – середньодобовий надій на корову;

3,08 та 6 відповідно коефіцієнт та кількість днів зниження надою при туберкулінізації;

M – кількість додаткових туберкулінізацій;

$Ц$ – закупівельна ціна 1 кг молока, грн;

A – кількість корів.

$$З = \frac{3,2 \cdot 3,08 \cdot 6}{100} \cdot 3,1 \cdot 0,17 \cdot 3,57 = 111,2 \text{ грн.}$$

Захворювання корів туберкульозом призводить до передчасного їх вибракювання, а значить, і до недоотримання приплоду. Цей збиток становив:

$$Z_{вп} = 0,38 \cdot K_{рк} \cdot 104,6 \text{ грн},$$

де 0,38 – середній коефіцієнт тільних корів від загальної кількості реагуючих на туберкулін;

$K_{рк}$ – середня кількість реагуючих корів;

104,6 грн – вартість 1 голови приплоду при народженні; обчислювали шляхом множення вартості молока, яке витрачається на одержання приплоду, на його кількість, тобто 31 грн · 3,61 ц = 111,9 грн.

$$Z_{вп} = 0,38 \cdot 142 \cdot 111,9 = 6038,1 \text{ грн}.$$

Розрахунок збитку, одержаного від утилізації туш встановлювали різницею між вірогідною і фактичною вартістю продукції, попередньо розрахувавши вірогідну вартість продукції,

$$Z = V_{т} \cdot B_{т} \cdot Ц_{я},$$

де $V_{т}$ – кількість утилізованих туш;

$B_{т}$ – маса туш, кг;

$Ц_{я}$ – закупівельна ціна якісної продукції, грн/кг;

$$Z = 53 \cdot 130 \cdot 3,2 = 22048 \text{ грн}.$$

Далі визначали фактичну вартість продукції

$$Z = V_{т} \cdot B_{т} \cdot Ц,$$

де $V_{т}$ – кількість утилізованих туш;

$B_{т}$ – маса туш, кг;

$Ц$ – вартість утилізованої продукції, коп/кг;

$$Z = 53 \cdot 130 \cdot 0,03 = 206,7 \text{ грн}.$$

Різниця між фактичною і можливою вартістю (22048 – 206,7) склала збиток від утилізації: 21841,3 грн.

Витрати на пастеризацію молока в середньому дорівнюють 2,6 грн за 1 ц (200 т = 2,0 тис. ц), тобто 5,2 тис. грн.

Витрати на санітарний ремонт приміщень – 636,6 грн.

Прямі витрати на проведення ветеринарних заходів, зокрема, туберкулізації і дезінфекції, приймали як:

$$V_3 = 1,20,$$

де 1,20 – витрати на 1 наявну тварину; загальне поголів'я великої рогатої худоби в неблагополучному щодо туберкульозу господарстві дорівнює

$$V_3 = 1,20 \cdot 838 = 1005,6 \text{ грн}.$$

Таким чином, розрахунки економічних показників свідчать про те, що прямі збитки в середньому на одне неблагополучне господарство становлять:

- втрати племінної цінності тварин – 23400 грн (30,5 %);
- утилізації туш (генералізований туберкульозний процес) – 21841,3 грн (28,5 %);
- зниження якості: м'яса – 13120 грн (17,2 %);
- молока – 12082,5 грн (15,8 %);
- недоотримання приплоду – 6038,17 (7,9 %);

- зниження надоїв від додаткової
туберкулізації

– 111,2 грн (0,1 %);
76593,1 грн (92,1 %).

Питома вага кожного окремо взятого показника, як показали дослідження, суттєво відрізняється – від 0,1 % (зниження надоїв за додаткових туберкулізацій) до 30,5 % (втрата племінної цінності тварин). Перетримка хворих туберкульозом тварин сприяє усугубленню інфекційного процесу, перебігу його в генералізованій формі, що різко знижує якість продукції і формує другий за величиною економічний збиток, питома вага якого із загальної сукупності дорівнює 28,5 %.

Водночас витрати на проведення спеціальних ветеринарно-санітарних та організаційно-господарських заходів на одне господарство, за такий самий період неблагополуччя, дуже малі порівняно з прямими збитками.

Вони формувалися лише з витрат:

- пастеризація молока	– 5200 грн (78,7 %);
- дезінфекція	– 769 грн (11,7 %);
- проведення інших ветеринарно-санітарних заходів	– <u>636,6 грн (9,6 %)</u> ; 6605,6 грн (7,9 %).

Загальний збиток у середньому на господарство за 6 місяців неблагополуччя становив 83198,7 грн; на одну хвору тварину – 585,9 грн.

D.M. Villedas в 1965 році стверджував, що профілактика туберкульозу великої рогатої худоби коштує дуже дорого, але хвороба тварин – ще дорожче. Вартість профілактики оцінюється приблизно 1/10 вартості витрат, які формує захворювання великої рогатої худоби туберкульозом. Тому необхідно ретельно проводити профілактику туберкульозу, щоб не втратити усієї користі, досягнутої оздоровленням тварин від цієї хвороби (Perpere L., 1984; Joubert L., 1984).

Разом з цим, наші дослідження свідчать про низькі витрати, що направляються на проведення ветеринарно-санітарних та організаційно-господарських заходів, насамперед на дезінфекцію та санітарний ремонт. Безперечно, це зумовлено економічним станом держави. Але благополуччя по інфекції після оздоровлення в майбутньому прямо залежить від якості та повноти оздоровчих заходів (Овдієнко М.П., 1990; Кузін О.І., 1992). Комплексне та системне їх проведення дає можливість своєчасно встановити етіологію алергічних реакцій, зумовлених атиповими мікобактеріями чи мікобактеріями бичачого виду, організувати заходи з локалізації епізоотичного вогнища туберкульозу та його ліквідацію в епізоотологічно обґрунтовані терміни і попередження забою тварин з мікобактеріозною інфекцією, яка не несе епізоотологічної небезпеки, як туберкульоз, хоча це питання остаточно не з'ясовано.

Лише такий комплексний підхід до вирішення проблеми диференціальної діагностики мікобактеріозної і туберкульозної інфекції, якісне проведення, з урахуванням епізоотологічних особливостей прояву епізоотичного процесу

туберкульозу в конкретному господарстві, районі, області, профілактично-оздоровчих заходів, забезпечує практичну ліквідацію туберкульозу великої рогатої худоби (Закордонєць А.О. й співавт., 1983; Кузін О.І., 1992).

Отже, дослідження довели, що в умовах реформування аграрного сектору економіки, протягом шести місяців неблагополуччя господарства, економічний збиток на одну інфіковану збудником туберкульозу тварину становить 585,9 грн.

На 92,1 % збиток формують прямі втрати від захворювання. Водночас відсутність коштів та відповідно низька якість проведених спеціальних ветеринарно-санітарних та організаційно-господарських заходів може спричинити на такому тлі тривале неблагополуччя, трансформацію персистуючих в організмі тварин мікобактерій з різною біологічною активністю й властивостями, зокрема, та, без сумніву, рецидив хвороби в майбутньому.

1.2.2. Ретроспективне вивчення фактичних економічних збитків від туберкульозу великої рогатої худоби в Україні за 1960–2010 рр.

Розрахунки економічних збитків від цієї інфекції тварин за всю історію України були проведені вперше за такий тривалий період.

Фактичний економічний збиток визначали паралельними розрахунками за два періоди: 1960–1990 та 1991–2010 роки, використовуючи методику А.О. Бокуна зі співавторами (1987 р.). За вихідні дані економічної оцінки збитків від туберкульозу тварин урахували основні виробничо-економічні показники, що відповідають загальним нормам статистичної звітності Державної ветеринарної та фітосанітарної служби України, Держкомстату України. Для порівняння, за період аналізу розрахунки одержаних даних наведені в середніх величинах на сільськогосподарську продукцію та сировину тваринного походження 2010 року.

За результатами досліджень встановлено, що середньорічне поголів'я великої рогатої худоби у 1960–1990 рр. було більше в 2,2 раза, ніж у 1991–2010 рр., а кількість корів в 1,7 раза (*табл. 3*). Висока кількість реагуючих на туберкулін тварин у перший період, на наш погляд, пов'язана з тим, що господарства використовували метод поступової заміни поголів'я тварин, виводячи з гуртів сенсibilізованих тварин, причому порушуючи терміни їх ізоляції та забою, за відсутності експертних висновків з державної лабораторії ветеринарної медицини про якість проведеної дезінфекції. Завдяки налагодженим діям Державної служби ветеринарної медицини з господарствами різної форми власності в Україні за другий досліджуваний період (оздоровлення неблагополучних пунктів проводилося в основному шляхом повної заміни поголів'я неблагополучних господарств щодо туберкульозу великої рогатої худоби) середньорічна кількість реагуючих тварин зменшилась у 6,5 раза, а кількість реагуючих на туберкулін тварин – у 9,7 раза. При цьому зменшувалася кількість туш, направлених на знезараження і технічну утилізацію, в 9,0 та 5,7 раза відповідно.

3. Вихідні показники розрахунку економічного збитку від туберкульозу великої рогатої худоби в Україні

Показник	1960–1990 рр.	1991–2010 рр.
Всього поголів'я великої рогатої худоби, тис. гол.	24787,5	11350
Кількість корів, тис. гол.	8250,0	4847,0
Кількість реагуючих на туберкулін тварин, тис. гол., у тому числі корів	3051,2 2179,4	314,377 224,554
Середньорічна кількість реагуючих тварин, тис. гол.	101,71	15,72
Кількість додаткових туберкулінізацій за період неблагополуччя	3,2	-
Кількість туш, направлених на, тис. гол: знезараження технічну утилізацію	786,6 546,649	87,4 96,467
Середньодобовий надій на корову, кг	3,4	3,6
Продуктивність на корову, кг	592,0	654,7
Кількість реалізованого несортного молока, т	976037,4	109799,7
Закупівельна ціна молока, грн: здорових корів несортного молока		3200,0 1797,7
Витрати на пастеризацію молока, тис. грн	22229,9	2425,2
Витрати від зниження надоїв після додаткових туберкулінізацій, гр /тварину		3598,2
Вихід телят на 100 корів	53	58
Реалізаційна ціна, грн./племінну телицю		8000
Реалізація телиці, яка втратила племінну цінність, грн		2400
Витрати на, тис. грн: - дезінфекцію - санітарний ремонт приміщень	3119,5 1019,4	240,0 92,7
Вартість сепарації та пастеризації 1 т молока, грн		500,0
* Розрахунки за весь період аналізу наведено в середніх величинах на сільськогосподарську продукцію та сировину тваринного походження 2010 року.		

Збиток від зниження якості молока (Z_2) визначали за формулою

$$Z_2 = B_p \cdot (Ц_3 - Ц_6),$$

де B_p – кількість несортного молока, т;

$Ц_3$ – закупівельна ціна молока здорових корів, грн/т;

$Ц_6$ – закупівельна ціна несортного молока, грн/т;

$$3_2'_{(1960-1990)} = 976037,4 \cdot (3200 - 1797,7) = 1368697246 \text{ грн};$$

$$3_2'_{(1991-2010)} = 109799,7 \cdot (3200 - 1797,) = 153972119 \text{ грн.}$$

Збиток від зниження якості м'яса при виявленні локальних змін в органах ($3_2'$) обчислювали за формулою:

$$3_2' = B_p \cdot (C_3 - C_6),$$

де B_p – кількість м'яса, направлено на знезараження, т;

C_3, C_6 – закупівельна ціна відповідно якісної продукції та низької якості, грн. / кг;

$$3_2'_{(1960-1990)} = 109329800 \cdot (10 - 2,5) = 819973500 \text{ грн};$$

$$3_2'_{(1991-2010)} = 19293400 \cdot (10 - 2,5) = 144700500 \text{ грн};$$

Збиток від зниження надоїв у результаті проведення додаткових туберкулінацій ($3_2''$) розраховували як

$$3_2'' = \frac{M_o \cdot 3,08 \cdot 6}{100} \cdot M \cdot C \cdot A,$$

де M_o – середньодобовий надій на корову, кг;

$3,08$ – коефіцієнт зниження надоїв при туберкулінації;

6 – кількість діб зниження надою;

M – кількість додаткових туберкулінацій;

C – закупівельна ціна 1 кг молока, грн;

A – кількість корів.

$$3_2'_{(1960-1990)} = \frac{3,4 \cdot 3,08 \cdot 6}{100} \cdot 3,2 \cdot 3,2 \cdot 8250000 = 53080473,6 \text{ грн};$$

$$3_2'_{(1991-2010)} = \frac{3,4 \cdot 3,08 \cdot 6}{100} \cdot 3,2 \cdot 3,2 \cdot 4847000 = 33020028,5 \text{ грн};$$

Збиток від недоотримання приплоду (3_3) визначали за формулою

$$3_3 = (K_n \cdot P_o - H_{\phi}) \cdot B_n,$$

де K_n – коефіцієнт народжуваності;

P_o – кількість тільних корів;

H_{ϕ} – фактично народили телят;

B_n – вартість приплоду при народженні, грн;

$$3_3 = 0,38 \cdot K_{pk} \cdot B_n,$$

де $0,38$ – середній коефіцієнт тільних корів від загальної кількості;

K_{pk} – середня кількість реагуючих корів;

B_n – вартість телят при народженні, множення вартості молока, що витрачається на одержання приплоду, на його кількість; $3,61\text{ц} \cdot 320 = 1152$ грн.

$$3_3_{(1960-1990)} = 0,38 \cdot 2179400 \cdot 1155,2 = 956704294,4 \text{ грн};$$

$$3_3_{(1991-2010)} = 0,38 \cdot 224554 \cdot 1155,2 = 98573816,7 \text{ грн.}$$

Збиток від зниження племінної цінності телиць (3_4) обчислювали за формулою

$$3_4 = M_n \cdot (C_n - C_o),$$

де M_n – кількість племінних телиць;

C_n – ціна племінної телиці, грн;

C_6 – ціна телиці, що втратила племінну цінність;

$$Z_{4(1960-1990)} = 670615 \cdot (8000 - 2400) = 37554444000 \text{ грн};$$

$$Z_{4(1991-2010)} = 69094 \cdot (8000 - 2400) = 386926400 \text{ грн}.$$

Збиток від утилізації туш (Z_1) визначали шляхом встановлення різниці між вірогідною і фактичною вартістю продукції

$$A) \text{ вірогідна вартість } Z_1 = M \cdot Ж \cdot Ц,$$

де M – кількість туш, направлених на технічну утилізацію;

$Ж$ – середня маса тіла 1 туші, кг;

$Ц$ – ціна 1 кг маса тіла від здорової тварин, грн;

$$Z_{1(1960-1990)} = 546649 \cdot 140 \cdot 10 = 765308600 \text{ грн};$$

$$Z_{1(1991-2010)} = 96467 \cdot 140 \cdot 10 = 135053800 \text{ грн}.$$

$$B) \text{ фактична вартість } Z_1 = M \cdot Ж \cdot Ц,$$

де M – кількість туш, направлених на технічну утилізацію;

$Ж$ – середня маса тіла 1 туши, кг;

$Ц$ – ціна 1 кг маси тіла від хворих тварин, грн.;

$$Z_{1(1960-1990)} = 546649 \cdot 140 \cdot 2,5 = 191327150 \text{ грн};$$

$$Z_{1(1991-2010)} = 96467 \cdot 140 \cdot 2,5 = 33763450 \text{ грн}.$$

Різниця між фактичною та можливою вартістю становила:

$$Z_{1(1960-1990)} = 573981450 \text{ грн};$$

$$Z_{1(1991-2010)} = 101290350 \text{ грн}.$$

Витрати на пастеризацію молока в середньому становлять 500 грн/т.

Усього піддано пастеризації за 1960–1990: 2179400 корів \cdot 3,4 \cdot 6 діб = 44459,76 т молока.

Оскільки вартість пастеризації 1 т молока становить 500 грн, то за цей період витратили 44459,76 \cdot 500 = 22229880 грн.

За 1991–2010: 224554 корів \cdot 3,6 \cdot 6 діб = 4850,37 т молока, а вартість на пастеризацію становить 4850,37 \cdot 500 = 2425185 грн.

Прямі витрати на проведення ветеринарних заходів, зокрема туберкулізації та дезінфекції, визначали так:

$$B_6 = 1,2 \cdot \sum_n,$$

де 1,2 – витрати на 1 тварину, грн;

\sum_n – загальне поголів'я тварин у неблагополучному щодо туберкульозу господарстві;

$$B_{6(1960-1990)} = 1,2 \cdot 24787000 = 29744400, \text{ з них:}$$

- на дезінфекцію – 3119500 грн;

- на санітарний ремонт приміщень – 1019400 грн.

$$B_{6(1991-2010)} = 1,2 \cdot 11350000 = 13620000, \text{ з них:}$$

- на дезінфекцію – 239961,5 грн;

- на санітарний ремонт приміщень – 92672,7 грн.

Прямі економічні збитки від туберкульозу в країні представлені в *табл. 4*. Порівняльний ретроспективний аналіз фактичного економічного збитку від туберкульозу в Україні засвідчив, що у період 1991–2010 рр. усі показники економічного збитку нижчі, ніж у 1960–1990 рр., але не пропорційно: від зниження якості молока у 8,9 раза, м'яса та утилізації туш за генералізованого

процесу – у 5,7 раза, від недоотримання приплоду та зниження племінної цінності – у 9,7 раза, від зниження надоїв – у 1,6 раза відповідно.

4. Ретроспективний аналіз фактичного економічного збитку від туберкульозу великої рогатої худоби в Україні, грн

№ п/п	Показник	1960–1990 рр.	1991–2010 рр.
1.	Збиток від зниження:		
	якості молока	1368697246	153972119
	якості м'яса	819973500	144700500
	надоїв	53080473,6	33020028,5
2.	Збиток від недоотримання приплоду	956704294,4	98573816,7
3.	Збиток від зниження племінної цінності	3755444000	386926400
4.	Збиток від утилізації туш (генералізований процес)	573981450	101290350
Всього		7527880964,0	918483214,2

Витрати на проведення спеціальних ветеринарно-санітарних та організаційно-господарських заходів складаються з витрат:

- 1) пастеризація молока (1960–1990) – 22229880 грн;
(1991–2010) – 2425185 грн;
- 2) дезінфекція приміщень (1960–1990) – 3119500 грн;
(1991–2010) – 239961,5 грн;
- 3) санітарний ремонт приміщень (1960–1990) – 1019400 грн;
(1991–2010) – 92672,7 грн;
- 4) туберкулінація, інші витрати (1960–1990) – 2716878 грн;
(1991–2010) – 1246274 грн.

Результати порівняльно-історичного дослідження реагуючої на ППД-туберкулін для ссавців великої рогатої худоби демонструють залежність показника реагуючих на діагностикум тварин по періодах (рис. 5). Якщо в 1960–1990 рр. кількість великої рогатої худоби, яка реагувала на

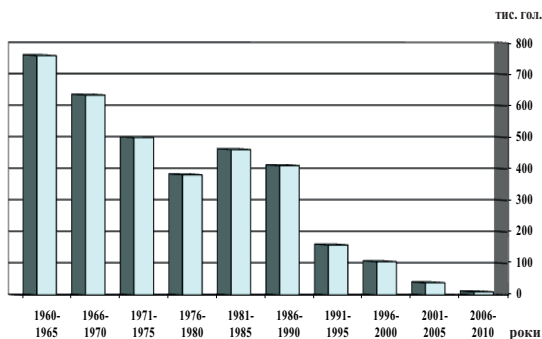


Рис. 5. Порівняльно-історичне дослідження виявленої реагуючої на ППД-туберкулін (сенсibiliзованої) великої рогатої худоби в Україні в 1960–2010 рр.

туберкулін, коливається в межах 760000–411000 голів, то в 1991–2010 рр. – 159000–10000 тварин. Найменшу кількість реагуючих тварин зареєстровано у 2010 році – 189 голів.

Аналізуючи багаторічну динаміку неблагополучних пунктів з туберкульозу великої рогатої худоби в Україні, встановлено, що в 1960–1990 рр. кількість неблагополучних пунктів на початок року коливається в межах 2700–209, тоді як у 1991–2010 рр. цей показник не перевищує 200 і становить 165-2 пункти. Найвищі показники отримані в 1960–1965 рр., причому з реєстрацією найбільшої кількості нових неблагополучних пунктів – 3435; найнижчі у 2006–2010 рр. – на початок року від 60 до 2, тоді як кількість нових неблагополучних пунктів коливається від 25 до 2.

Провівши порівняльний аналіз питомої ваги показників економічних збитків за досліджувані роки, встановили коливання від 49,9 та 42,1 % (збиток від зниження племінної цінності) до 0,8 та 3,6 % (збиток від зниження надоїв).

Стосовно витрат на проведення спеціальних ветеринарно-санітарних та організаційно-господарських заходів, то в основному кошти витрачалися на пастеризацію молока і дезінфекцію приміщень. На їх частку припадає 76,4 та 10,7 % відповідно, а на туберкулінізацію та санітарний ремонт приміщень – 9,4 та 3,5 % відповідно (рис. 6).

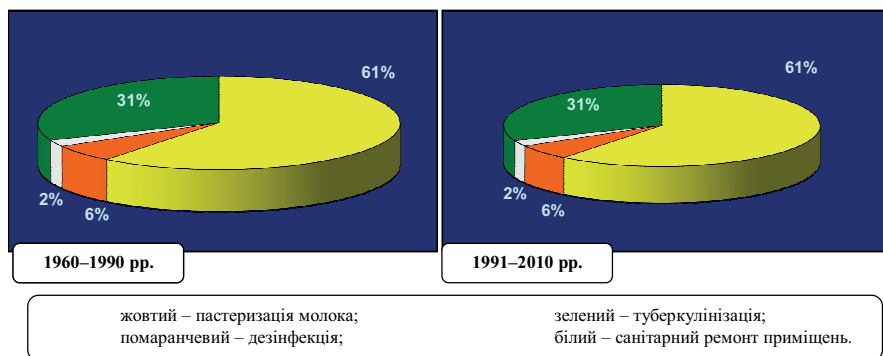


Рис. 6. Витрати на проведення спеціальних ветеринарно-санітарних та організаційно-господарських заходів за 1960–2010 рр.

Досліджуючи співвідношення фактичних економічних збитків та загальних ветеринарних витрат (рис. 7) визначено, що на частку загальних ветеринарно-санітарних та організаційно-господарських заходів припадає в 1960–1990 рр. 11,6 %, у той час як прямі збитки від захворювання складають 88,4 %, у 1991–2010 рр. питома вага цих показників становить 3,0 та 97 % відповідно.

Отже, ретроспективні численні економічні розрахунки збитків від туберкульозу великої рогатої худоби в Україні, які проведені вперше, засвідчили, що на їх рівень суттєво впливають методологічні підходи з оздоровлення тваринництва від інфекції. Безумовно, така закономірність обґрунтована властивостями мікобактерій, в яких генетично закладено цикл розвитку, мор-

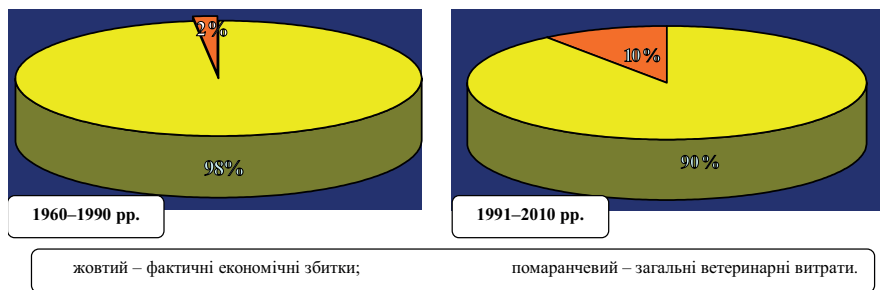


Рис. 7. Співвідношення фактичних економічних збитків до загальних ветеринарних витрат за 1960–2010 рр.

фологічні форми яких здатні стимулювати інфекційний процес (хворобу) з розвитком алергії, яка виявляється ППД-туберкуліном для ссавців чи ні. В останньому випадку тварина може виділяти ту або іншу морфологічну форму збудника в довкілля, заражаючи сприйнятливих тварин та викликаючи відповідний інфекційний процес, не реагуючи на діагностикум. Така здатність мікобактерій нерідко спричинює й рецидив захворювання тварин.

Тому повна заміна скомпromетованого відносно туберкульозу поголів'я, на нашу думку, повинна бути домінуючою за вибору методу викорінення туберкульозу великої рогатої худоби. Це суттєво низить економічні збитки, підвищить безпеку зараження людини збудником туберкульозу та ефективність ветеринарно-санітарних та організаційно-господарських заходів у цілому. Проведені дослідження, їх результати дали можливість сформулювати декілька висновків, а саме:

1. Динаміка кількості хворої на туберкульоз великої рогатої худоби (реагуючої на туберкулін) та неблагополучних пунктів визначається формою власності аграрних підприємств та методом оздоровлення господарств. Частота прояву туберкульозу великої рогатої худоби та кількість неблагополучних пунктів в Україні з 1960 по 2010 рік динамічно зменшується: з 760000 до 189 тварин та з 2700 до 2 пунктів відповідно. У період з 1960 по 1990 р. та з 1991 по 2010 рік аналогічні показники становили 760000 та 411000; 2700 та 209 і 159000 та 189; 165 та 2 відповідно.

2. Загальні фактичні економічні збитки від туберкульозу великої рогатої худоби в період з 1960 по 2010 рік становили 8446364178,2 грн, а на одну хвору тварину – 3090,6 грн. Із 1960 по 1990 рік – 7527880964 грн та 3112,5 грн, а з 1991 по 2010 рік – 918483214,2 грн та 2991,6 грн відповідно.

3. Частка основних витрат припадає на пастеризацію молока та дезінфекцію приміщень на території неблагополучних господарств: у 1960–1990 рр. аналогічні показники складають 22229,88 тис. грн та 3119,5 тис. грн, а в 1991–2010 рр. – 2425,185 тис. грн та 239,9615 тис. грн відповідно.

4. Метод повної заміни скомпromетованого відносно туберкульозу поголів'я повинен бути домінуючим за викорінення туберкульозу великої рогатої худоби.

ІСТОРИЧНИЙ ЕКСКУРС У ЦИТОЛОГІЮ ТА МІНЛИВІСТЬ МІКОБАКТЕРІЙ ТУБЕРКУЛЬОЗУ

У багатьох державах світу та в окремих регіонах, як свідчать наші й літературні дані, туберкульоз завдає значних економічних збитків: зниження продуктивності і племінних якостей тварин, погіршення санітарних якостей тваринницької продукції. Тривале підтримання епізоотичного процесу туберкульозу тварин на природно-географічних територіях може відбуватися за браком знань біологічних властивостей мікобактерій, що знижує рівень ефективності заходів профілактики та боротьби з захворюванням.

Дослідження фенотипових й генотипових властивостей мікобактерій туберкульозу проводяться фактично з часу відкриття цих мікроорганізмів Р. Кохом. Використовувалися різноманітні методи й способи. І бактерії, уперше розпізнані як причина захворювання, представлялися відносно стабільними формами, які мають клітинну стінку, здатні рости і проявляти свою метаболічну активність *in vitro*. Такі форми зберігали достатню вірулентність, пов'язати їх з певним захворюванням було не важко. З тих часів технології, які розвиваються в мікробіологічній діагностиці, включають селективні середовища культивування та фарбування, фазово-контрастну мікроскопію, скануючу електронну мікроскопію, ультратонкі зрізи, вирощування мікроорганізмів на міліпорових фільтрах, полімеразна ланцюгова реакція (ПЛР) й інші відкрили й продовжують відкривати різноманіття змінених мікроорганізмів, у тому числі й мікобактерій туберкульоза та атипових. Але таке питання, як спосіб розмноження збудника, все ще лишається остаточно не з'ясованим, оскільки домінуючою думкою вважається, що мікобактерії розмножуються поперечним діленням. Це є єдиний спосіб розмноження – поки що не з'ясовано.

2.1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Збудник туберкульозу відкритий Р. Кохом у 1882 р. За біологічними властивостями збудник віднесений до роду *Mycobacterium*. Практичне значення мають види *M. tuberculosis* (людський), *M. bovis* (бичачий), *M. avium* (пташиний). *M. bovis* є основним збудником хвороби як для великої рогатої худоби, так і деяких інших ссавців.

Відповідно до сучасної класифікації, мікобактерії розподіляються: I група – комплекс *M. tuberculosis*; II група – *M. leprae*; III група – всі інші види мікобактерій (атипові).

До першої групи, на підставі ідентичності послідовностей ДНК, віднесені: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, *M. caprae*, *M. canettii*, *M. pinnipedii*.

Таке групування обумовлено надзвичайно високою (99,9 %) подібністю хромосомної ДНК та ідентичністю послідовностей 16S рибосомальної ДНК. І це дає підставу деяким авторам відносити мікобактерії не до видів, а до підвидів. Це саме стосується й *BCG*.

Мікобактерії туберкульозу – як і всі мікобактерії – володіють кислото-стійкістю, чого й легко диференціюються від більшості мікроорганізмів, що не відносяться до мікобактерій. Переважно тонкі паличкоподібні мікроби довжиною 1,0–6,0 мкм і шириною 0,2–0,4 мкм, часто вміщують одне чи більше кислотостійких зерен.



Рис. 8. Поліморфізм туберкульозної палички за Мечниковим

У 1988 році І. Мечников показав (рис. 8), що за впливу зовнішніх чинників форма бацил Коха в культурах може бути різноманітною. На гліцеринових середовищах серед звичайних паличок зустрічалися дуже маленькі, інколи короткі і розташовані непарно, але тільки кокових форм не спостерігалось. Часто культури мікобактерій вміщують помірно короткі палички, проте в багатомісячних культурах виявляються й видовжені з бруньками на краях. За температури 43,6 °С уже через 20 діб утворюється багато видовжених паличок. У культурі 3-місячної давнини форми мікроба стають ще більш різноманітними і проходять ряд стадій, які вкладаються в певну схему. Сильно видовжені мікобактерії, вздуті на обох кінцях, мають посередині невеликі бруньки, які можуть розташовуватися і поблизу мікроба. У такий спосіб виникає гілляста колонія із вздуттям на кінцях. У більш рідких випадках перша генерація чи зовсім відділяється від материнських, чи утворює нову гілку. У результаті масового розвитку брунькоподібних форм характерний вигляд культури зовсім змінюється.

І. Мечников вважає, що видовжені і своєрідно розгалужені форми не обов'язково є дегенеративними, хоча вони і належать до категорії інволюційних. Він мав на увазі стадії розвитку, які виникають тільки за певних умов, неблагоприємних для нормального існування мікроорганізму.

Дослідження поліморфізму паличок туберкульозу і лепри проводив Кедровський в 1911 році. Він стверджував, що ниткоподібні форми цих мікроорганізмів розчіпляються на паличкоподібні і менш складні елементи, яким він дав назву дифтероїди. Серед цієї групи мікробів, на його думку, спостерігаються морфологічні і культуральні коливання; у групі туберкульозу і лепри, окрім кислотостійкої, необхідно враховувати і некислотостійку форму. Наскільки важко на той час було висловити подібні погляди, зрозуміло зі слів самого Кедровського; “він не хотів повідомляти в публікаціях про своє спостереження, так як воно зроблено в період повного панування вчення про мономорфізм мікробів” (1935). Роботи І. Мечникова і Кедровського відомі не тільки тому, що були опубліковані на ранніх етапах розвитку бактеріології туберкульозу, але й тому, що першими звернули увагу дослідників на питання

про значення зовнішнього середовища у виникненні різних форм мікроба, і на підставі філогенетичних зв'язків з грибами дають спробу розкрити природу різноманітності атипових форм бацил Коха.

Н. Much (1907) виявив, окрім цього, так звані гранули Муха, які є грам-позитивними, складаються головним чином з метафосфату і відіграють, на думку автора, велику роль в біології бактерій. Kolbel (1965) за допомогою фазовоконтрастної мікроскопії поряд з метафосфатними зернами виявив у культурі *M. avium*-інтра-екстрацелюлярні дрібні гранули. Ядерна речовина в бактеріальних клітинах виявлена Fontes (1910), Епштейн й співавт. (1935), Malek і Stezzl (1948) методом Фольгена. Ці автори виявили наявність дрібних включень, які вміщували хроматин.

Після перших електронно-мікроскопічних досліджень, які провели Lembre і Ruska (1940), ретельно вивчалися гранули, ядра і клітинна стінка мікобактерій туберкульозу. Mudd й співавт. (1942, 1951), Кнаysi й співавт. (1950) розглядали зерна як мітохондрії; Кнаysi (1957) – як вміщуючі еквівалент ядра. Bassegmann (1953, 1958) виявив на кінцях бактерій зерна метафосфату, а в цитоплазмі – вакуольні утворення, які відповідають ядрам.

Клітинна стінка вивчалася шляхом імпрегнації сріблом (Darzins, 1926) і фарбуванням нігрозином (Yeşian і Vanderlinde, 1947). За допомогою електронної мікроскопії можна розрізнити клітинну стінку як зовнішній шар товщиною 0,03 мкм (Bassegmann, 1967). Werner (1951) спостерігав, що у вірулентних бактерій клітинна стінка є непроникною для ефіра, тоді як в авірулентних бактерій вона пропускає ефір, унаслідок чого і утворюються вакуолі в клітині. Kolbel (1965) на ультратонких зрізах показав, що ядерна речовина має форму спіралеподібних ниток. Brieqer (1963) вважав, що структура ядра у мікобактерій туберкульозу ще не вивчена. Пізнішими дослідженнями Хейфеца і співавт. (1971), Єрохіна і співавт. (1971, 1972), Шахбанова і Кушнар'ова (1972) шляхом застосування ультратонких зрізів встановлено наявність тришарової цитоплазматичної мембрани, рибосом й полісом. У цитоплазмі вміщується ядерна речовина, яка знаходиться в ній у вигляді ниток, і трубчасті утворення, що з'єднуються з поверхнею клітини.

Вивчаючи *M. tuberculosis* вірулентного штаму в електронному мікроскопі (Кочемасова З.Н. й співавт., (1980), встановили деякий поліморфізм, який проявлявся різною довжиною (210 мкм), величиною та кількістю вакуолей, уперше описаних ще А. Lembke, Н. Ruska (1940). Клітину оточувала прошаркова клітинна стінка, яка складалася з прошарків, що чергувалися в площині: поверхневий прошарок клітинної стінки – електронно-оптично прозорий – контактував з міжклітинною речовиною і нагадував мікрокапсулу бактерій; під поверхневим прошарком клітинної стінки виявлялася мембрана клітинної стінки, яка складалася зі зовнішнього і внутрішнього електронно-оптично щільних прошарків і менш щільного середнього прошарку (рис. 9).

Щільно до клітинної стінки прилягає тришарова цитоплазматична мембрана, що виявлялася часто як одноконтурна, напевно, в результаті маскування її прилягаючим матеріалом цитоплазми і клітинної стінки. Цитоплазма була

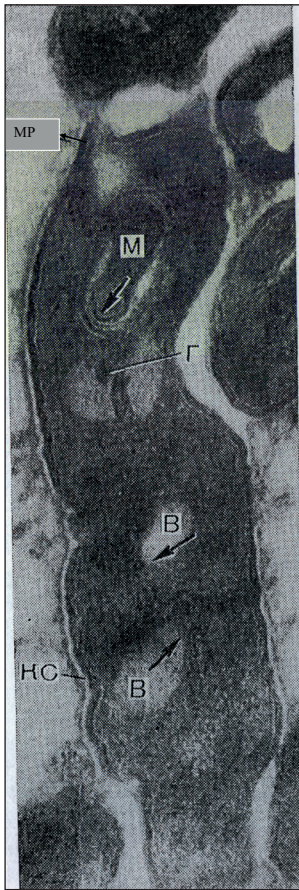


Рис. 9. Ультратонкий зріз клітини *M. tuberculosis* за З.Н. Кочемасовою зі співавт.:

MP – міжклітинна речовина; *КС* – клітинна стінка; *М* – мезосома; *В* – вакуолі, повністю заповнені речовинами незначної електронно-оптичної щільності; *Г* – електронно-оптичні щільні гранули, які знаходяться в середині вакуолей × 95 000

представлена гранулярним компонентом, подібним до рибосом інших бактерій.

Розташовані в цитоплазмі мезосоми мали концентричну чи ламелярну будову, склалися з трипрошаркових мембран, які є інвагінатами цитоплазматичної мембрани. Виявлялися також мембрани як однопрошаркові, що нагадували за структурою внутрішній прошарок клітинної стінки, як у деяких інших грам-позитивних бактерій.

У цитоплазмі клітин виявлялися електронно-оптично прозорі вакуолі круглої чи овальної форми діаметром від 0,06 до 0,3 мкм. Оточуюча їх мембрана виявлялася як однопрошаркова. Фосфатні гранули типу зерен валюїтину фіксувалися як у цитоплазмі, так і в середині вакуолей мікобактерій. Центральна частина клітин складалася з електронно-оптично прозорої зони, яка заповнена тяжами дезоксирибонуклеопроїтеїду, і представляла собою нуклеопроїтеїди клітин. Отже, підсумовують автори, досліджуваний штамп володів типовою для мікобактерій туберкульозу ультраструктурою.

За повідомленнями М. Daffe і Р. Draper (1998), бактерія туберкульозу має високий вміст ліпідів (10–40 %) і воску в оболонці, яка виконує роль бар'єра для анілінових барвників та інших хімічних речовин. Оболонка складається з мембрани з трьох, поверхневими шарами: внутрішнім, який пов'язаний з цитоплазматичною мембраною, середнім та зовнішнім слизовим, має власне стінку та мікобактеріальну субмікроскопічну капсулу. Цитоплазматична мембрана відіграє роль осмотичного бар'єра. Зовні клітинної стінки мікобактерій є прошарок, який обумовлює характерне розташування мікробних клітин у мікрокультурі у вигляді косичок, джгутів. Це зумовлено корд-фактором (6,6 – диміколат тригалола), про який повідомив у 1950 р. Bloch. Вважається, що наявність корд-фактора свідчить про патогенність мікобактерій. Між тим дослідження мікобактерій туберкульозу бичачого виду засвідчили (Ткаченко О.А. й співавт., 2010), що окремі штами з високою вірулентністю не утворюють

косичок та джгутів, а слабковірулентні чи такі, що тимчасово її втратили, навпаки, формують їх у мікрокультурах.

Роль гранул у мікобактерій може бути виявлена в першу чергу біохімічними методами. Гранули, як і в інших бактерій, вміщують з'єднання метафосфату, які є важливим джерелом енергії. Winterscheid і Mudd (1953) за допомогою фарбування Янус-зеленим і трифенілтетразолохлоридом показали, що ці гранули мають ензиматичну активність і можуть розглядатися як еквіваленти мітохондрій. Раніше роль гранул вивчалася здебільшого у зв'язку зі способом розмноження мікобактерій туберкульозу. Bezancon і Philibert (1926), Bezancon й співавт. (1924), Bezancon і Gastinel (1944), Kahn і Nonidez (1936) у поверхневих плівках спостерігали палички, які виростили із гранул й описали цикл розвитку мікроба. Роль гранул у розмноженні мікобактерій туберкульозу вважалася доведеною спостереженнями Zominsky (1933), Groh (1933), Grasset (1935), Дроботько й співавт. (1936), Космодамианським (1950), Berencsi (1957). Navas (1930) описав морфологічний процес розпаду мікобактерій туберкульозу в автолізаті мокроти, в процесі якого із зерен виростили нові бактерії. Rosenthal (1938), Rosenthal і Heaqa (1955) досліджували цикл розвитку бактерій BCG з гранулярною фазою, яка змінювалася утворенням некіслотостійких паличок. Neqre і Bretey (1955) виявили, що молоді мікобактерії туберкульозу є некіслотостійкими. Некіслотостійкі палички, які фарбуються за методом Ціль-Нільсена в синій колір, виявляються в більшості штамів мікобактерій туберкульозу. Пешков (1936) розробив метод фарбування, за допомогою якого поряд з бактеріями, які фарбуються за Ціль-Нільсеном в червоний колір, можна бачити також елементи, що фарбуються в зелений та синій коліри. Цей же принцип фарбування застосувала Alexander-Jackson (1945).

У 1948 році запропоновано (Dulos R., Middlebrok G., 1948) й дотепер відому цитохімічну реакцію, за допомогою якої автори визначали, орієнтовано, вірулентність мікобактерій туберкульозу. Реакція вважається позитивною, якщо осад, який випадає на дно пробірки, зв'язує нейтральний червоний і зафарбовується в червоний колір, що характерно для вірулентних мікобактерій, до складу яких входить велика кількість кислих ліпідів. У невірулентних мікобактерій осад має жовтуватий відтінок.

Дегідрогеназна активність певною мірою обернено пропорційно корелює з вірулентністю мікобактерій (Bloch H., 1950). Відповідно, дегідрогеназний тест є не тільки одним з показників окисно-відновного потенціалу мікробної клітини, але й свого роду показником його вірулентності (Wilson F., 1952; Дихно М.М. й співав., 1960); реакція враховується за швидкістю знебарвлення метиленового синього в 1 см³ завису, виготовленого з мікобактерій.

Deqonier (1960) показав також наявність синіх чи ацидофільних бактерій в патологічному матеріалі. За методом Дихно (1961) можна диференціювати живі бактерії, які зафарбовані в зелений, і мертві, що фарбуються в червоний колір.

Звичайно, що припущення про цикл розвитку в мікобактерій сприйма-

ється далеко не всіма дослідниками з далеких часів. Oerskov (1932), Mayer (1934), Wyckoff (1934), Smithburn (1936), Pryce (1941), Pickardt-Beck (1948) спостерігали розмноження мікобактерій туберкульозу тільки шляхом поперечного ділення. Поясненням для протилежних спостережень може бути відмічене Knausi (1944) явище, відповідно якому частинки, подібні до гранул, являють собою карликові бактерії з дуже тонким прошарком цитоплазми навколо зерна. Мікобактерії туберкульозу розмножуються надто повільно. Youmans і Youmans (1949) спостерігали одне ділення за 14 годин, Fenner і Leach (1953) в середовищі Дюбаса у фазі логарифмічного росту спостерігали одне ділення клітини за 18 годин. Будова колоній відображає також особливості розмноження бактерій. Ю.К. Вейсфелер (1933), Епштейн й співавт. (1936), Sula (1970) за гістологічного дослідження колоній спостерігали в них порожнини, які є результатом росту мікобактерій у вигляді джгутів і кіс.

Мікобактерії туберкульозу як на штучних живильних середовищах (*in vitro*), так і в макроорганізмі (*in vivo*) можуть проявляти значний поліморфізм, а їх кислотостійкість може значно змінюватись (Вейсфелер Ю.К., 1933; Космодаміанський, 1950). Це явище з часів відкриття туберкульозних мікобактерій вивчалось численними авторами.

Vandremet (1937) на бідному живильному середовищі, до складу якого входив картопляний відвар, культивував мікобактерії туберкульозу одного штаму, які добре розмножувалися у вигляді ниткоподібних, некислотостійких, часто розгалужених поліморфних бактерій. Пересів цих бактерій на ячне живильне середовище, яке вміщувало гліцерин, давав ріст звичайних, типових, кислотостійких паличок. Arloinq і Dufour (1925) повідомляли про подібні результати досліджень.

Кумбарі (1910) повідомив, що шляхом культивування мікобактерій туберкульозу на гліцериновій картоплі, яка оброблена 3%-вим етиловим спиртом і має лужну реакцію внаслідок внесення аміаку, одержав швидкорослу культуру, яка складалася в основному з некислотостійких паличок. Після декількох пересівів на цьому ж середовищі автор виділив стабільну культуру некислотостійких мікобактерій туберкульозу. Кедровський (1930), Мазур (1929), Лінчевська і Цвет (1936) застосували метод Кумбарі і одержали культуру, яка складалася переважно з некислотостійких бактерій. За пересіву на ячне середовище ці автори спостерігали типовий ріст кислотостійких мікобактерій, відповідно зміни були нестабільними.

Dostal (1916) спостерігав, що мікобактерії туберкульозу на бульйоні з гліцерином, який вміщував наростаючі концентрації сапоніну, зростають з переважним умістом некислотостійких паличок; ці культури за подальших пересівів стабілізуються, даючи ріст у некислотостійкій формі, причому незалежно від виду живильного середовища. Bretey і Imelik (1949), Brieqer і Glauert (1952, 1956), Brieqer і Fell (1946) за розмноження *M. avium* на розведеному екстракті ембріона курей спостерігали утворення ниток з розгалуженнями; ці міцелії розпадалися на короткі палички, які в подальшому рості знову видовжувалися. Xalabarder (1953) за допомогою електронного мікроскопа спосте-

рігав сферичні утворення, які розглядав як органи розмноження мікобактерій туберкульозу. Basserraun (1955) спостерігав в одного штама значний поліморфізм і розпадання мікроба на дрібні зерна, які він розглядав як L-форми. Stewart-Tull (1965) спостерігав цикл розвитку *M. phlei* за тривалого культивування на модифікованому середовищі Сотона з подальшим пересівом культури на агар, який вмщував екстракт м'яза серця коня: утворювалися поліморфні, частково некислотостійкі палички, які переходять в кокоподібну форму.

Поліморфізм мікобактерій туберкульозу спостерігається також у макроорганізмі тварин і людини. Brieqer (1963) із тканини легень кроля, який заражали великими дозами вірулентної культури мікобактерій, виділив гранули, які за введення в організм морських свинок викликали туберкульоз. Ті ж самі гранули, одержані шляхом диференціального центрифугування, перевірялися висівом на штучні живильні середовища, для контролю контамінації випадковими мікобактеріями туберкульозу й не виявили росту. Втрату кислотостійкості мікобактерій і розпад на гранули в організмі тварини спостерігав Шпанір ще в 1936 році.

Карасьова (1956), вивчаючи структуру мікобактерій туберкульозу 4–12-добового віку за допомогою електронного мікроскопа, встановила в різних штамів індивідуальну морфологію й ділення полярних тілець-гранул. За цього вакуолі спостерігалися тільки в мікобактеріях одного штаму, які вмщували також велику кількість гранул. Вічканова (1949), досліджуючи спосіб розмноження мікобактерій туберкульозу за використання мікроколоній, які вирощені на предметному скельці за методом Ргусе (1941), визначила, що розмноження відбувається шляхом поперечного ділення з утворенням характерних кіс і тяжів.

Ю.К. Вейсфелер (1975) досліджував локалізацію в мікобактеріях ензиму дегідрогенази за допомогою трифенілтетразолхлориду (ТТС). Для цього на чашку Петрі, що вмщувала агар з 0,1 % трифенілтетразолхлориду, висівали густий завис мікобактерій туберкульозу й залишали чашку на 24 годин за 37 °С. У мазках, приготовлених з цих культур, відмічено, що формазан, утворений з трифенілтетразолхлориду, фарбував бактерії і гранули в інтенсивно-червоний колір. Це свідчить про те, що в гранулах поряд з метафосфатом вмщується також дегідрогеназа.

В інших дослідах цей же дослідник зі співавторами спостерігали ріст бактерій із гранул. Відповідно, гранули вмщують не тільки метафосфат, у певних умовах у них конденсується і хроматин (ДНК) й деякі ензими. Цим пояснюється ріст бактерій із гранул.

Підсумовуючи та обмірковуючи результати багаторічних різнобічних комплексних досліджень, автор стверджує, що гранули є не тільки накопиченням резервних поживних речовин, а й вмщують ензими, а також частини ядерної речовини, тобто необхідні біохімічні складові частини, що можуть забезпечувати в подальшому розвиток бактерій (Вейсфелер Ю.К., 1975). При цьому розмноження мікобактерій туберкульозу може здійснюватися не тільки шляхом поперечного ділення, але і шляхом брунькоподібного росту із гранул. Гранули

можуть звільнятися із клітини після її автолізу чи після впливу неблагоприємних зовнішніх чинників, забезпечуючи в такий спосіб виживання клітин.

Що стосується поліморфізму, який виникає внаслідок неблагоприємних факторів, то це є результатом пристосування чи модифікації, що свідчить про пластичність мікобактерій. Коли ж відмічається ріст молодих некіслотостійких паличок із гранул, поліморфізм є зміненим способом розмноження й фазою факультативного циклу розвитку.

Питання про можливість глибоких змін мікобактерій туберкульозу й інших мікобактерій, які приводять до спадкової втрати кислотостійкості і, відповідно, до утворення стійких некіслотостійких форм, є одним із важливих проблем мікробіології і має загальнобіологічне значення. Ці явища обумовлюються спадковими змінами не однієї чи декількох властивостей мікроорганізму, а охоплює сукупність таких властивостей, які переходять межу роду мікобактерій.

Повідомлення про перетворення мікобактерій туберкульозу в некіслотостійкі форми, як показано в попередньому матеріалі, почали з'являтися з часу відкриття цього мікроорганізму. Проте ці повідомлення нерідко ґрунтувалися на помилкових спостереженнях, оскільки мікроби, які перебуваючи в довкіллі, попадають у ході досліду в культуру мікобактерій туберкульозу як забруднення, розглядалися як змінені мікобактерії. Одним із найбільш яскравих прикладів такої помилки є повідомлення Enderlein (1925, 1931) про те, що йому вдалося перетворити мікобактерії туберкульозу в *Aspergillus*. На підставі цього він зробив далекоюсяжні висновки про циклогенію бактерій, про поширення в природі мікобактерій в сапрофітній формі. Проте, особисто відвідавши лабораторію Enderlein в 1929 році, Ю.К. Вейсфелер спростував цю гіпотезу та з'ясував джерело помилки його роботи. Автор не вважав за потрібне дотримуватися умов стерильності в роботі. Повідомлення з цього питання необхідно оцінювати з особливою обережністю, але, звичайно, не можна всю інформацію про некіслотостійкі форми розглядати як помилкову, особливо в тривалих дослідях з мікобактеріями одного штаму.

Підкреслимо, що Ferran в 1897 році першим повідомив про досліди з глибоких змін властивостей мікобактерій туберкульозу. Культуру цих мікроорганізмів, яку вирощували в живильному бульйоні, він послідовно пересівав на бідні живильні середовища, в результаті чого одержав гомогенну, швидкорослу культуру кислотостійких мікроорганізмів. За подальших пересівів на 17-й генерації з'явилися грамнегативні палички, які володіли властивостями бактерій групи *B. coli*. Ці мікроорганізми він назвав альфа-бацилами і розглядав як сапрофітні форми мікобактерій туберкульозу. Ferran у 1923 році запропонував теорію про стадії перетворення мікобактерій туберкульозу. Він виготовив вакцину з альфа-бацил, яка застосовувалася в Іспанії і Латинській Америці, за повідомленнями Ferran (1928), Vacarezza (1929). Ця вакцина пропонувалася також для лікування туберкульозу (Felsenfeld, 1930). Властивості альфа-бацил вивчали Valdes і Lambea (1925), Петренко і Цехновицер (1927), Felsenfeld (1929), Weleminsky (1936). Kleptzer (1913) методом Ferran одержу-

вав культуру грамнегативних мікроорганізмів, які він розглядав як сапрофітні форми мікобактерій туберкульозу. Про аналогічні результати повідомляли й інші дослідники (Stockwell, 1925; Sweany, 1925). Любарський (1928) в мокроті хворих на туберкульоз спостерігав грамнегативні палички ще до того, як в ній виявлялися мікобактерії туберкульозу.

Роботи Ferran нині практично забуті. Альфа-бацили, безперечно, являлися забрудненням. Його теорія про стадії розвитку мікобактерій не зовсім обґрунтована, проте він дав поштовх подальшому вивченню цієї проблеми.

Marmorek (1907), Wherry (1913), Suyenaqa (1925) після чотирьох пересівів мікобактерій спостерігали на поверхні агару, де не вміщувалося інших поживних речовин, ріст культур, в яких превалювали некіслотостійкі палички. За пересівів на оптимальні живильні середовища ці мікроби знову набували кислотостійкості.

Vaudremer (1921, 1924, 1926) вирощував культуру мікобактерій туберкульозу на відварі картоплі без гліцерину і одержував швидкорослі грам-негативні некіслотостійкі мікроорганізми, які за пересівів на гліцеринове середовище знову набували кислотостійкості. За цією ж методикою Oerskov (1926), Тогунова (1926), Caussimon (1933) виділяли швидкорослі некіслотостійкі мікобактерії, які на гліцериновому середовищі реверсували в кислотостійкі.

Досліди з вирощування мікобактерій туберкульозу на середовищі, яке вміщувало шкідливі для мікобактерій речовини, вперше проводив російський дослідник Кумбарі (1910). Він добавляв у середовище 3 % етилового алкоголю і аміаку. Через 3–6 пересівів культура вміщувала тільки поодинокі кислотостійкі мікобактерії, які в бульйоні без гліцерину зберігали свої властивості. Цим способом з 27 штамів мікобактерій туберкульозу Кумбарі одержав грампозитивні жгутикові мікроорганізми. За цією ж методикою Мазур (1929, 1930) виділив некіслотостійкі мікроорганізми, що склалися зі зернистих паличок, які він назвав синіми паличками, і коків. Із фільтратів культури синіх паличок він виготовив антивірус за Безредко для лікування туберкульозних лімфоденітів. Кедровський (1930), Лінчевська і Цвет (1936) застосовували метод Кумбарі, проте їм не вдалося одержати стабільну некіслотостійку культуру мікобактерій туберкульозу.

Dostal (1913, 1916), добавляючи у гліцерино-агарове середовище сапонін (від 1 до 10 %), після декількох пересівів одержав швидкорослу джгутикову культуру, яка складалася з некіслотостійких паличок. Schnurer (1922), Kirchner (1928) перетворювали мікобактерії туберкульозу на гліцериновому агарі і гліцериновому бульйоні зі сапоніном і спостерігали нестійку втрату кислотостійкості. Агіта й співавт. (1924, 1937) на середовищі зі сапоніном у 7 зі 40 культур одержали некіслотостійкі мікроорганізми; із цих культур була приготовлена вакцина АО, яка широко застосовувалася в перший період як жива, а після 1930 року – у формі убитої вакцини в японській армії і серед населення (більше ніж у 1000000 людей). Кричевський і Якобсон (1932) встановили, що вакцина АО вміщує поодинокі кислотостійкі мікобактерії і при введенні морським свинкам викликає туберкульоз. Vasarhelyi (1935), застосо-

вуючи вакцину АО, не одержав добрих результатів й про неї, як і про вакцину, яку приготував Ferran, забуто. У той же час Hasseqava і Kochii культуру не-кислотостійких мікобактерій одержали в 1939 році на середовищі картопляного відвару з додаванням дигітоніну.

Перші спостереження про вплив антибіотичних речовин на мікобактерії туберкульозу були зроблені Gessard й співавт. в 1925 році, які застосовували фільтрат культури *B. pyocyaneus* (*Pseudomonas aeruginosa*). Vandremet (1927) виявив, що у фільтраті культури *Asperqillus fumiqatus* мікобактерії туберкульозу втратили кислотостійкість, вірулентність і життєздатність і після 8 діб впливу в цьому фільтраті із цих мікобактерій виникли не-кислотостійкі грам-позитивні коки, які швидко росли на агарі. Ці культури 4–5-добового віку були не-патогенні, а більш старші культури вбивали морських свинок, але не реверсували в кислотостійкі форми. Vandremet (1932) із не-кислотостійких штамів мікобактерій виготував вакцину для лікування, яка протягом 7 років застосовувалася у Франції у 3700 хворих на туберкульоз кісток. У 1931 році Vandremet і співавтори із крові хворих на проказу із лепром під впливом фільтрату *Asperqillus* також виділили не-кислотостійкі мікроорганізми – диплококи й тонкі палички, які після пересіву на середовище з гліцирином набули кислотостійкості. Проте Kirchner і співавтори в 1930 році не змогли підтвердити даних Vandremet, так як *M. phlei* у фільтраті *Asperqillus* тільки тимчасово втрачали свою кислотостійкість й після пересіву на оптимальні середовища поновлювали вихідну властивість – кислотостійкість.

Kuhn в 1932 році запропонував теорію диморфізму бактерій, за якою мікроорганізми можуть рости у формі паличок (В-форми) й коків (С-форми). Він вирощував мікобактерії туберкульозу після впливу аміаку в концентраціях від 0,1 до 10 %, нагріваючи до 65 °С, і одержав не-кислотостійкі, повільнорослі коки. Schnieder (1931) добавляв 1 % кардіазолу чи 0,4 % кораміну в ячне середовище. На такому середовищі мікобактерії туберкульозу росли у вигляді не-кислотостійких коків і паличок. Suranyі (1931) добавляв у гліцириновий бульйон рідке мило і засівав у це середовище мікобактерії туберкульозу, а також кров хворих на туберкульоз і заражених морських свинок. На цих середовищах він спостерігав виникнення не-кислотостійких паличок, які стійко зберігали свої властивості за пересівів.

Karwacki (1928, 1931, 1934) спостерігав у старих, сухих культурах мікобактерій туберкульозу перехід в актиноміцети після декількох пересівів на ячне середовище. Проте Nedelkovitsch і Rankovitsch (1929) таких результатів не одержали. Feuyin (1931), Feuyin і Epstein (1932), добавляючи в старі культури гліцириновий бульйон, виділили культури стрептокока і грам-позитивні палички. Дещо раніше (1910) Kedrowsky інформував про виникнення не-кислотостійких паличок із культури прокази, пізніше (1930, 1936) – про виникнення актиноміцетів у старих культурах мікобактерій туберкульозу. Triuss і Politowa (1931) встановили, що виділені з мокроти і гною хворих людей актиноміцети, введені морським свинкам, викликали туберкульоз.

Ravettlat і Pla (1924) і Pla у Armenqol (1930, 1931) розтирали культури мі-

кобактерій туберкульозу в ступці зі скляним порошком, після цього висівали їх у бульйон з гліцерином, на якому спостерігався ріст некіслотостійких коків, вірулентних для морських свинок. Такі ж культури автори одержали із крові морських свинок, яких заражали мікобактеріями туберкульозу. Про подібні результати оголосили Maqalhaes (1931) і Fontes (1931). Проте Domingo і Perxas (1938) не підтвердили спостережень Ravettlat і Pla. У 1931, 1932, 1936 роках Mollqard повідомив про отримання культур актиноміцетів із мікобактерій туберкульозу. В більш пізній роботі 1941 року він припускав, що туберкульоз викликається асоціацією кіслотостійких мікобактерій туберкульозу і так названого “білого актиноміцета”. Насправді ж Mollqard працював з культурою мікобактерій туберкульозу, забрудненого актиноміцетом, що стверджує Ю.К. Вейсфеллер, коли отримав від автора “чисту”, на його думку, культуру. У той же час Reenstierna в 1926 році за висіву мікобактерій туберкульозу в бульйон виділяв дріжджові мікроорганізми, які він розглядав як результат мінливості. Проте Ю.К. Вейсфеллер (1975) вважає, що і в цьому випадку дослід супроводжувався забрудненням. Hedvall (1932), Gullberq й співавт. (1938), Much (1931), Stickl (1931) спостерігали, що мікобактерії туберкульозу, введені в рослини (салат, табак, цибуля, часник, томати), втрачають кіслотостійкість і розпадаються на зерна. Зерна Муха (1907) були різносторонньо досліджені.

Крім наведених вище, ще цілий ряд дослідників повідомляли в 1927–1933 рр. про виділення некіслотостійких паличок і коків з патологічного матеріалу; вони розглядали їх як результат мінливості мікобактерій туберкульозу: Sweaney (1928), Olson (1929), Murata (1930), Eberson і Sweaney (1931), Fontes (1930, 1931), Sidenberg і Esker (1934). Miller (1932) культивував мікобактерії туберкульозу на витяжці пігментного некіслотостійкого мікроорганізму й одержав перетворення в некіслотостійку форму. Ряд дослідників, таких як Kirchner (1931), Seiffert (1932), Van Riensdijk (1933), Kallos (1933), розглядали некіслотостійкі форми як дегенеративні форми мікобактерій туберкульозу.

Згодом Malkova (1954), Hubacek і Malek (1958) із культури *M. phlei*, яка зберігалася протягом двох місяців за 2 °С і пересівалася на рідке живильне середовище Дюбаса, одержали некіслотостійкий штам мікобактерій, визначений як PNL. Цей штам різносторонньо вивчався. Культура PNL ензиматично відрізнялася від вихідної культури, і зіставлення її антигенної структури з такою вихідного штама засвідчило, що PNL вміщувала 3 нових антигени, а 4 антигени *M. phlei* втратила. У подальшому Kopicek і Malek (1967), Rytiz і співавт. (1968) вивчали мутаційні зміни культури PNL. Mutis (1957) одержав перетворення мікобактерій в проактиноміцет шляхом опромінення радіоактивним кобальтом.

Спостереження Csillaq (1961, 1963) свідчать про те, що в старих (3–6-місяців) культурах *M. tuberculosis* й інших мікобактерій після аерації з’являються спороносні некіслотостійкі тільця, які стають початком, за пересіву, культури, яка складається з мікрококів. Csillaq розглядає їх як особливу фазу в циклі розвитку, яка також спостерігається й у *Nocardia*. Stewart-Tull (1965),

культивує *M. phlei* на середовищі Сотона, яке вміщує картопляний екстракт, й шляхом пересівів на лужний агар з екстрактом серцевого м'яза коня, одержав культури некіслотостійких мікобактерій, що підтверджує результати Csillaq. Nilson (1965), вивчаючи культури, які ідентифікував Csillaq, встановив, що вони є ідентичними з *B. licheniformis*, через що розглядав їх як результат забруднення.

Звичайно, питання наявності (відсутності) спор у мікобактеріях практично не вивчено й дотепер. Між тим у 2009 році J. Ghosh й співавтори повідомили результати досліджень споруляції в мікобактеріях *marinum*, BCG. Вивчаючи життєвий цикл *M. marinum*, дослідники встановили, що проростання, тобто поява вегетативних клітин від спор, спостерігається вже через 6 годин після внесення до свіжого середовища, тоді як ендоспори (як структури) не рееструються протягом 120 год після припинення синтезу ДНК (24–48 годин). *M. marinum* починають споруляцію тільки після того, як відбувається генерація вегетативних клітин, хоча, як повідомляють автори, точний час початку споруляції залишається невизначеним.

Водночас досліджуючи *M. bovis* штаму BCG, автори встановили, що спори виявляються в старих культурах (рис. 10). Дослідники стверджують, що споруляція є спільною рисою мікобактерій і необмежується *M. marinum*. Підсумовуючи результати роботи, автори наголошують: споруляція пристосована до тривалого вегетування й встановлення необхідного співвідношення з активізацією ряду генів, гомологічних тим, що беруть участь у споруляції інших видів мікобактерій.

Згодом, у 2010 році, О Тім Семпсон, аналізуючи результати повторних досліджень групи відомих американських учених з приводу споруляції мікобактерій бичачого виду, відмічає, що результати J. Ghosh є дещо помилковими, оскільки вони не підтвердилися. Можливо, це зумовлено використанням штаму мікобактерій BCG з іншими генетичними задатками, оскільки відомо, що вакцинний штам у кожній країні світу значно відрізняється один від одного за основними біологічними, в тому числі й імуногенними властивостями.

Дослідження виникнення некіслотостійких форм мікобактерій за впливу антибіотиків наштовхують на думку, що ці явища мінливості близькі до L-форм мікобактерій. Klieneberqer і Nobel (1935), Dienes (1939) довели, що мікроорганізми, перебуваю-

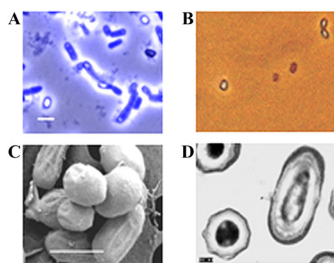


Рис. 10. Наявність спор-частинок в культурі *M. bovis* Кальметта-Герена:

A – фази флуоресценції зображення клітини *M. bovis* з 6-місячної культури (шкала бар. 5 мкм); *B* – диференціально зафарбованих, очищених спор-частинок з Кальметта-Герена культури; *C* – SEM зображення очищеної Кальметта-Герена спори. (шкала бар. 1 мкм); *D* – ПЕМ-зображення тонких зрізів спори *M. bovis* Кальметта-Герена ×60 000

чи в гіпертонічних розчинах, які вміщують антибіотики, можуть втрачати свою клітинну стінку і розмножуватися як протопласти у вигляді шарів. L-форми являють собою глибоко змінені мікроорганізми, які, коли вони стабільні, втратили характерні для вихідного мікроорганізму серологічні, біохімічні властивості й морфологічні ознаки.

Alexander-Jackson (1947) в спинномозковій рідині за туберкульозного менингіту і в культурах спостерігала некіслотостійкі організми, які нагадували мікоплазми.

Sartory і співавт. (1947) в культурах мікобактерій туберкульозу, на які діяли пеніциліном, спостерігали виникнення розгалужених некіслотостійких форм. Космодам'янський (1950), впливаючи на завис мікобактерій туберкульозу високими концентраціями пеніциліну і фільтрату культури *B. ruosuaueus*, виділив культури, які склалися з мікрококів і дифтероїдних паличок. Такі ж самі культури автор виділив після висіву крові хворих на туберкульоз і гною хворих на кістково-суглобовий туберкульоз.

Такі культури були вірулентними для морських свинок, проте розвиток туберкульозних змін у них не викликали. У 1954 році Xalabarder, у 1956 році Brieqer і Glauert за електронної мікроскопії, досліджуючи мікобактерії туберкульозу, спостерігали круглі утворення, подібні до спор, що могли розглядатися як сферопласти. Bassermann у 1955 році в одній із культур мікобактерій туберкульозу досліджував спонтанне виникнення сферичних тілець, з яких виділялися дрібні зернинки; під електронним мікроскопом ці зерна мали структури L-форм.

Mattmann й співавт. в 1960 році, Sato й співавт. в 1965 році після впливу пеніциліну одержали L-форми мікобактерій туберкульозу, які розмножувалися на живильному агарі у вигляді сферопластів. Tarshis в 1958 році вирощував культуру H 37 R_v на живильному середовищі з підвищенням концентрацій стрептоміцину й ізоніазиду і одержав пігментуючі некіслотостійкі мікроорганізми зі зміненою морфологією. За пересіву на звичайні живильні середовища і за пасажів через тварин ці культури не реверсували у вихідну форму кислотостійких мікобактерій.

З.Н. Кочемасова і співавт. (1965, 1968, 1969) за дії пеніциліну і стрептоміцину на культуру H 37 R_v та *M. kansasii* спостерігали ріст кулеподібних, частково кислотостійких L-форм, які за пересівів на такі ж середовища зберігали свої властивості, проте за пересівів на середовища, які не вміщували таких препаратів, реверсували в типові культури кислотостійких мікобактерій. Pore і Thacoge (1966), додаючи в рідке живильне середовище Tween, альбумін, лізоцим і етилендіамін-тетраацетат і висів завису мікобактерій туберкульозу, одержали L-форми, які розмножувалися на спеціальному агаровому середовищі PPLO. Gaiqinschi і співавт. (1970), вводячи в черевну порожнину білих мишей завису культури BCG і стрептоміцин, виділяли і з ексудата L-форми. Duxhno і співавт. (1973) повідомляли, що з L-форм мікобактерій туберкульозу, багаторазово пасажованих через спеціальні середовища, за реверсії після посіву на яєчні середовища з гліцерином ростуть кислотостійкі

бактерії, які суттєво відрізняються за своїми властивостями від вихідних. Дорожкова і Волк (1972, 1973), Волк і Дорожкова (1973), впливаючи на мікобактерії туберкульозу стрептоміцином, циклосерином та іншими хіміотерапевтичними препаратами, одержали L-форми.

У 1997 році J. Gerald, G.J. Dominique і V. Hannah, H.V. Woody для бактерій зі зміненою клітинною стінкою запропонували абревіатуру CWDB (“cell wall-deficient defective bacteria” – бактерії з відсутньою/дефектною клітинною стінкою), тобто мікроорганізми, які мають дефіцит живильних речовин, чи такі, що важко культивуються. На думку авторів, цей термін найбільш широко включає всю різноманітність аберентних бактеріальних форм і найкращим чином відображає морфологію бактерій, у тому числі й мікобактерій. Електронно-мікроскопічні дослідження засвідчили, що ці мікроорганізми частково чи повністю позбавлені клітинної стінки, і вони можуть або ж ні реверсувати у вихідні варіанти *in vitro* (Калина Г.П., 1962; Тимаков В.Д. і Каган Г.Я., 1973; Прозоровський С.В. й співавт., 1981; Dominique G.J. й співавт., 1997).

Зазначимо, що вперше бактерії з відсутньою / дефектною клітинною стінкою були виявлені Н.Ф. Гамалеей ще в 1894 році, практично невдовзі після відкриття Р. Кохом мікобактерій туберкульозу. Через три роки після цього, як було наведено нами на початку огляду, в 1897 році Feigan повідомив про глибокі зміни властивостей мікобактерій туберкульозу. У наступні десятиріччя і по цей час такі бактерії вивчалися численними авторами. Первісно для плевропнеumonісподібних мікроорганізмів (PPLO) – симбіонтів *Streptobacillus moniliformis*, як їх інтерпретувала Klieneberger, на знак вшанування інституту Лістера, де вона працювала, був запропонований термін “L-форми” який зберігається відносно цих мікроорганізмів і дотепер, для історичної перспективи і чіткості в оглядовій літературі (Klieneberger E., 1935). Далі L. Dienes (1939) довів, що описані Klieneberger PPLO можуть реверсувати у вихідну бактеріальну форму *S. moniliformis*. У наступні десятиріччя встановлювали цю біологічну властивість у різноманітних видів бактерій, у тому числі й мікобактерій.

Сьогодні використання терміну “L-форми” суперечливо, більшість мікробіологів погоджується, що L-форми – форма виживання: розмноження мікроорганізмів, які повністю чи частково втратили ригідну клітинну стінку з природних чи штучно індукованих причин і які володіють потенційною здатністю до реверсії у вихідні бактеріальні форми (Тимаков В.Д. і Каган Г.Я., 1973; Прозоровський С.В., 1981). У різні аналізовані періоди висловлювалися різні точки зору на біологічну суть L-трансформації (Калина Г.П., 1962; Прозоровський С.В., 1981). Прибічники однієї з них вважали, що L-трансформація – патологічний процес, який виникає під впливом несприятливо діючого чинника, а L-форми – продукт летальної дегенерації мікробних клітин. Інше твердження зводиться до того, що L-трансформація – це спонтанна мутація, а вплив трансформуючого фактору – селекція мутантів. Думаютть також, що стабільні L-форми утворюються в результаті “випадкової” втрати клітинної стінки, що незворотно попереджає її нормальному біосинтезу. Деякі дослідники дотримуються думки, що L-трансформація – про-

яв пристосовної (адаптивної) мінливості мікробів під впливом несприятливо діючого чинника довкілля, і, відповідно, L-форми – високорезистентні щодо дії відповідного агента форми мікроорганізмів. Гіпотеза, що об'єднує два попередні міркування, зводиться до того, що початково L-форми були, напевно, проявом адаптивної мінливості, а в подальшому процес L-трансформації міг завершитися генотиповими мутаціями, які міцно закріплюють за мутантами набуті властивості. Наразі широко підтримується точка зору про те, що конверсія бактерій в L-форми може бути універсальною властивістю бактерій (Nelson E.L. і Rickett M.J., 1951; Dorward D.W. і Garon C.F., 1990).

Різні результати досліджень в певні історичні періоди, з використанням тих чи інших методик, свідчать про відсутність єдиної думки про патогенний потенціал CWDB для людини й тварин. Утім, значний масив експериментальних, клінічних й епізоотологічних даних підтверджує, що бактерії з відсутньою / дефектною клітинною стінкою (CWDB) можуть викликати захворювання, як повідомляють L.T. Gutman (1952), L.B. Guze (1968), L.H. Mattman (1993), В.Д. Тімаков і Г.Я. Каган (1973), G.J. Dominique і співавтор (1982, 1997), S. Madoff (1986).

Відносно біологічної характеристики мікроорганізмів з відсутньою / дефектною клітинною оболонкою, то необхідно викласти, в більш узагальненому аспекті таке. Серед загальних властивостей CWDB необхідно наголосити: зміна характеру росту і обмінних процесів порівняно з вихідними бактеріальними формами; знижена ферментативна активність L-форм; здатність до злипання (можливість існування полігеномної стадії на ранніх і середніх етапах L-трансформації); наявність антигенів, які у вихідних бактерій локалізуються в цитоплазматичній мембрані і в цитоплазмі; інтенсивно розвинена система внутрішніх мембран; відмінність цитоплазматичної мембрани і внутрішньоцитоплазматичних мембранних структур L-форм від вихідних бактерій за складом ліпідів, білків, фізико-хімічними властивостями, терморегуляції (Прозоровський С.В. й співавтор, 1981).

Розглядаючи некіслотостійкі й L-форми мікобактерій, не можна залишити поза увагою загальнобіологічне значення цього явища. У зв'язку з цим необхідно акцентувати увагу на тому, що практично всі відомі бактеріальні види можуть бути конверсовані в CWDB під впливом найрізноманітніших екзогенних індукуючих чинників. Так, безоболонкові клітинні форми одержані *in vitro* для багатьох самих найрізноманітніших представників мікроорганізмів: *Agrobacterium tumefaciens*, *Bacillus sp.*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacteroides sp.*, *Bordetella pertussis*, *Brucella melitensis*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, *Corynebacterium sp.*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Flavobacterium sp.*, *Haemophilus influenzae*, *H.parainfluenzae*, *H.vaginalis*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas sp.*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi*, *Sarcina lutea*, *Serratia marcescens*, *Shigella sp.*, *Staphylococcus sp.*, *Streptobacillus moniliformis*, *Streptobacillus hae-*

molyticus, *Streptobacillus faecalis*, *Vibrio cholerae*, *Treponema pallida*, *Actinomyces hordeovulneris*, дріжджі й інші гриби, еукаріотичні водорослі, клітини вищих рослин (Hijmans W., 1962; Калина Г.П., 1962; Dienes L., 1967; King J.R. і Gooder H., 1970; Тімаков В.Д. і Каган Г.Я., 1973; Gilpin R.W і співавт., 1973; Green M.T. і співавт., 1974; Zeon O. і Panos C., 1976; Cabezas de Herrera E., O. Garcia jurado, 1977; Прозоровський С.В. й співавт., 1981; Gumpert J. і співавт., 1986; Dominique G.J і Woody H.B., 1997).

Доведено, що індукуючими факторами можуть бути радіоактивне і рентгенівське випромінення, ультрафіолетове опромінення, незвичайний температурний режим культивування, культивування в гіпертонічному 0,3–0,5 м розчині сахарози, вплив хлористого літію і підвищеної концентрації сірчанокислого магнію, карбоксиметоксиламін, фаговий лізат стрептокока групи С, мікроби-антагоністи, пептон, антисироватка, комплемент. До найбільш відомих індукуючих факторів відносяться пригнічуючі синтез клітинної оболонки антибіотики, пептидази і літичні ферменти, які розчиняють муреїн клітинної оболонки – лізоцим, лізостафін, високі концентрації амінокислот (гліцин, фенілаланін, аргінін, dl – метіонін й ін.) (Прозоровський С.В. і співавт., 1981; Rastoqi N і David H.L., 1981; Udou T. і співавт., 1982; Buchanan A.M. і Scott J.L., 1984;).

Між тим V. Preass Mursic і співавт. (1996) підкреслюють, що ступінь результативності процесів L-трансформації відображає фенотипові і генотипові відмінності ізолятів мікроорганізмів, у тому числі й мікобактерій.

У досліджах S. Madoff 1986 року засвідчено, що колонії L-форм за наявності індукуючих факторів можуть необмежено тривало культивуватися на більш-менш оптимальному живильному середовищі. Наголошується також, що усунення індукуючого агента може привести до реверсії в материнську форму бактерій, або ж, якщо завершилася стадія модифікації до цього моменту чи настання стабілізації L-форм, яка виключає реверсію, то такого явища не відбувається (Прозоровський С.В. і співавт., 1981). На це звертає увагу і Ю. Вейсфелер (1975) й інші дослідники.

Дослідженнями В.С. Федосєєва (1983, 1985, 1988) показано, що L-трансформація мікобактерій відбувається в організмі великої рогатої худоби неблагополучних щодо туберкульозу господарств. У таких стадах з біологічного матеріалу великої рогатої худоби виявляються як типові, атипіві, так і трансформовані в L-форм мікроорганізми. Із 26 % ізольованих культур мікобактерій в L-формі реверсували в атипіві 18 %, в *M. bovis* – 8,0 %. У більш частих випадках, повідомили Т.К. Байтерякова (1981), И.Н. Рубцова і Н.Г. Кириленко (1977), типові та атипіві мікобактерії виявляються від тварин з тривалим неблагополуччям господарства щодо туберкульозу і на завершальному етапі оздоровлення від цієї інфекції тварин.

Очевидно, що епізоотологічне значення персистенції L-форм і реверсованих материнських клітин *in vivo* багато в чому буде визначатися тими факторами хазяїна і / чи індукуючими агентами, які регулюють здатність мікроорганізму до трансформації. Можливо, що субоптимальне дозуван-

ня антимікробних чинників чи інших препаратів, які пригнічують синтез клітинної оболонки, створює CWDB варіанти *in vivo* і згодом закріплює їх персистенцію. Оскільки CWDB можуть бути частиною кожної популяції, що росте, індукуючі агенти можуть також брати участь в селекції росту абертантних форм. Спостереження *in vitro* CWDB, які ростуть на середовищі з градієнтом пеніциліну, можуть бути з високою вірогідністю екстрапольовані на аналогічну ситуацію у великої рогатої худоби й інших тварин, які лікуються антибактеріальними препаратами взагалі, здатними індукувати утворення CWDB *in vivo*. Але не тільки лікарські препарати стимулюють формування змінених форм мікобактерій. Як свідчать дослідження В.С. Федосєєва (1985; 1988), L-форми мікобактерій зазвичай персистують в організмі великої рогатої худоби. Це обґрунтовує думку про те, що L-трансформація відбувається *in vivo* за впливу природних захисних чинників макроорганізму.

Не можна залишити поза увагою й дослідження останніх років у цьому напрямі В.О. Бусола і В.М. Мазура (2011). Вони виділили з біологічного матеріалу ондатр внутрішніх водойм України *M. bovis* й встановили, що такі мікроорганізми володіють незвичайними властивостями, чим принципово відрізняються від інших представників цього виду: 1) високовірулентні для морських свинок, кролів і курей, а також здатні викликати інфекційний процес у білих щурів; 2) мають тинкторіальні і морфологічні характеристики, наближені до *M. bovis* і *M. tuberculosis*; 3) проявляють ознаки росту після першого посіву на щільне яєчне середовище за температури 22; 37 і 45 °С на 37; 28 і 29-у доби відповідно, а також прискорюють ріст, змінюють морфологію та деякі культуральні властивості за послідовного пасажування через організм морської свинки та кроля і проявляють стабільність первинних властивостей при пасажуванні через системи організмів: морська свинка–морська свинка та морська свинка–курка; 4) посилюють ознаки патогенності до третього пасажу (період досліду) через організм морських свинок, викликають у тварин утворення виразок зі значними некрозами тканин на місці введення мікобактерій, зумовлюють розвиток шкірної, генералізованої та септичної форм туберкульозного процесу; 5) змінюють вміст вільних жирних кислот після пасажування: через організм морських свинок підвищується вміст арахінової, нонадеканової, тетракозанової, ліноленової та знижується – тридеканової, генейкозанової, міристинової, лінолевої кислот; через систему організмів морська свинка–крізь підвищується вміст арахінової, генейкозанової, бегенової, трикозанової, тетракозанової і знижується – міристинової, тридеканової, лінолевої, маргаринової, пентадеканової кислот; 6) не можуть бути ідентифіковані з належності до виду за показниками біопробы у зв'язку з високою патогенністю для лабораторних тварин (морських свинок, кролів і курей); 7) за показниками полімеразно-ланцюгової реакції (ПЛР) належать до виду *M. bovis*.

Ці повідомлення незаперечно підтверджують думку численних дослі-

джень про те, що внутрішнє середовище (гомеостаз) макроорганізму, його різноманітні захисні властивості можуть визначати біологічні характеристики персистоючого в його тканинах мікроорганізму: його живлення, речовини, що зазвичай визначають традиційно відомий гено- й фенотип залежно від якісного складу живильних речовин біологічні властивості мікобактерій. Такі зміни, як підтверджують дані авторів, нівелюють ряд властивостей мікроорганізму певного виду.

2.1.1. Культуральні властивості L-форм

Живильні потреби індукованих *in vitro* L-форм звичайно подібні з такими материнських бактерій, від яких вони виникли, вважають G.J. Dominique і H.V. Woody (1997); S. Madoff (1986). Для росту мікроорганізмів, які виділені з патологічного (біологічного) матеріалу, зазвичай необхідно збагачене середовище. Частіше всього використовується середовище з додаванням сироватки чи лізату клітин крові (Dominique G.J. і Woody H.V., 1977; 1982). CWDB можуть виживати в середовищі з осмоляльністю, яка нижче, ніж їх внутрішньоклітинний осмотичний тиск. Внутрішньоклітинний тиск для L-форм мікобактерій становить 900 мосмол/кг. Z.A. McGee й співавт. (1971) стверджує, що мікобактерії, які протистоять оточенню зі зниженою осмоляльністю такому, як сироватка крові, чи звичайні бактеріологічні середовища (270–300 мосмол/кг), щоб вижити, повинні внутрішньо стабілізувати свої цитоплазматичні мембрани.

Повідомлення G.J. Dominique (1991); O. Leon і C. Panos (1976); G.J. Dominique і H.V. Woody (1997) свідчать, що дивалентні катіони, поліаміни чи адаптивні зміни щодо більш високого рівня насичених і ненасичених жирних кислот у мембранах можуть задовольняти вимоги щодо збереження цілісності цитоплазматичних мембран.

На рідких середовищах CWDB ростуть скудно, у вигляді плівки на поверхні. На щільних живильних середовищах L-форми формують піняві колонії, які врастають в агар; деякі CWDB біологічного матеріалу ростуть *in vitro* як класична “смажена яєчня”, а ріст L-колоній, як повідомляє С.В. Прозоровський й співавт. (1981), відмічається на 6–8-му добу.

За висіву на чашки фільтратів бактеріальних культур виявляються дрібнесенькі, ніжні склоподібні колонії, які повільно ростуть (від 2–3 діб до декількох тижнів) і дають ріст у вигляді “димки”, “нальоту”, дрібнесеньких, які виявляються лише в лупу, колоній. Субкультури цих колоній відповідають вихідним бактеріальним культурам. За свідченнями Г.П. Калина (1962), на рідких живильних середовищах висіяні фільтрати дають ніжний зернистий осад.

2.1.2. Морфологічні особливості L-форм

Морфологічні ознаки і репродуктивні процеси бактерій з дефектними клітинними оболонками в різні роки висвітлювали J. Lederberq (1957); Г.П. Калина (1962); Л.В. Guze (1968);

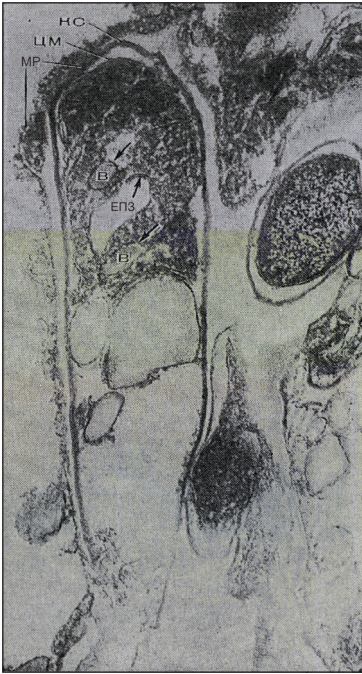


Рис. 11. Ультратонкий зріз L-колонії *M. tuberculosis* за З.Н. Кочемасовою зі співавт. (1980)

Клітинна стінка (КС), яка відділена від цитоплазматичної мембрани (ЦМ). У цитоплазмі видно вакуолі (В), які оточені мембраною, та виявляється як одноконтурна і електронно-оптично прозора зона (ЕПЗ), що оточена трипрошарковою мембраною. У ділянці, яка вільна від цитоплазми, розташовані “вакуолоїди”, що оточені одноконтурною мембраною (показано стрілками). Міжклітинна речовина (МР) оточує витончену клітинну стінку
×96 000

L. Dines і S. Bullivant (1968); В.В. Висоцкий і В.М. Грушкова (1978); С.В. Прозоровський й співавт. (1981); G.J. Dominique (1982); В.А. Пузанов і Г.М. Ніколаєва (1994).

Відмічається, що колонії L-форм являють собою популяції поліморфних елементів зі закономірною заміною одних елементів іншими. Верхню частину колонії займають кулеподібні клітини. Основна її частина заповнена безструктурною масою, в яку занурені інші елементи L-форм. Навкруги колонії є загальний покрив. Морфологія й ультраструктура L-форм, які одержані від грампозитивних і грамнегативних мікобактерій й інших видів мікроорганізмів не мають принципових відмінностей (Прозоровський С.В. й співавт., 1981).

З.Н. Кочемасова й співавт. в 1990 році, досліджуючи ультратонкі зрізи L-колоній *M. tuberculosis*, виявили різноманітність форм, серед яких зустрічалися особини, оточені витонченою клітинною стінкою чи зовсім позбавлені її. Характерним була також присутність великої кількості утворень, які умовно названі через подібність з вакуолями мікобактерій “вакуолоїдами” (рис. 11, 12, 13).

Особини, які оточені зміненою клітинною стінкою, були збільшені в розмірах відносно клітин вихідної культури. Між витонченою до 7–10 нм клітинною стінкою і цитоплазматичною мембраною спостерігався значний електронно-оптично природний проміжок (рис. 11).

За тривалого пасажування L-форм у деяких особин клітинна стінка зазнавала ще більших змін. Як повідомляють далі автори, її вдалося виявити у вигляді окремих ділянок, з’єднаних чи відшарованих від цитоплазматичної мембрани. В інших випадках ці залишки клітинної стінки відсутні (протопластний тип). У таких L-форм на поверхні клітини виявлялося тільки цитоплазматична

мембрана. Цитоплазматична мембрана порівняно з вихідними клітинами виявлялася чітко як трипрошаркова структура, що може бути зумовлено великою розрідженістю цитоплазми змінених клітин.

Цитоплазма була представлена дрібним гранулярним компонентом, в ній зустрічалися вакуолі, оточені однопрошарковою мембраною і частково чи повністю заповнені аморфною масою середньої електронної щільності. Інколи спостерігалися також трипрошаркові мембранні структури, які мали зв'язок з цитоплазматичною мембраною клітини, обмежуючи електронно-оптично прозорі ділянки чи подібні до цитоплазми зернисту масу.

Нуклеоїд мав вигляд електронно-оптичних прозорих зон з дрібними включеннями дезоксирибонуклеопротеїду.

Автори відмічають, що особливий інтерес являють клітини, цитоплазма яких вміщувала вакуолі, займала тільки частину простору клітин, обмежену змінами клітинної стінки (рис. 11). У вільній від цитоплазми зоні розташовувалися клітини, різні за розмірами (від 80 нм до рівних ширині клітини) “вакуолоїди”, оточені однопрошарковою мембраною і за структурою подібні до вакуолей цитоплазми. У разі руйнування клітинної стінки “вакуолоїди” розташовувалися поза клітин L-колонії. Зазначимо, що вакуолізація клітини мікобактерій за L-трансформації відмічена F. Basserman ще в 1958 році. Крайня зона великих вакуолоїдів заповнена аморфною масою середньої електронно-оптичної густини. Часто “вакуолоїди” розміром від 0,1 до 3 мкм розташовувалися поза клітини, дорівнюючи їх скопиченню. У “вакуолоїдів”, близьких за розмірами до діаметра мікобактерій, інколи виявлялися на поверхні цитоплазматичні ділянки, вміст яких був представлений дрібногранулярним нуклеїноподібним матеріалом, розміщеним у зонах малої електронно-оптичної густини. Оточуюча протоплазматичні ділянки трипрошаркова мембрана була чітко зв'язана з однопрошарковою мембраною “вакуолоїда” (рис. 12, 13).

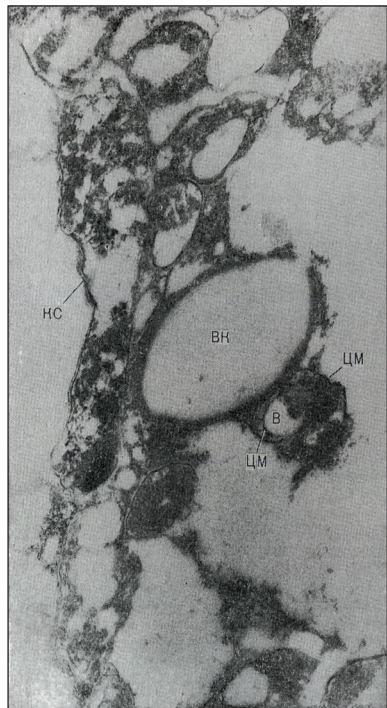


Рис. 12. Ультратонкий зріз L-колонії *M. tuberculosis* за З.Н. Кочемасовою зі співаєт. (1980)

У клітині з різко витонченою клітинною стінкою видно конгломерацію цитоплазми. На поверхні “вакуолоїда” (ВК) знаходиться ділянка протоплазми, яка вміщує вакуоль (В) що оточена трипрошарковою цитоплазматичною мембраною (ЦМ) × 72 000

Деякі ділянки зрізів L-колонії були представлені повними сіткоподібними структурами, які склалися з трипрошаркових мембран. Між тим, поряд з описаними утвореннями на периферії L-колоній зустрічалися клітини, які за структурою дуже близькі до вихідних. Вочевидь протоплазматичні ділянки на поверхні “вакуолоїдів” є початком реверсії, а не наслідком вакуолізації протопластів.

У протоплазматичних ділянках “вакуолоїдів” не було клітинної стінки, проте їх здатність до збільшення в розмірах, гронаподібні розташування і наявність протоплазматичних ділянок у “вакуолоїдах” свідчить про певне їх значення в будові L-колоній мікобактерій туберкульозу. Можливо “вакуолоїди” є станом циклу розвитку збудника туберкульозу, подібного до L-трансформації, на який звертав увагу Н. Much ще в 1907 році.

На підтвердження цьому свідчать дані наявності в досліджуваних L-колоніях особин, які були морфологічно ідентичні вихідним, тобто вони є результатом процесу реверсії.

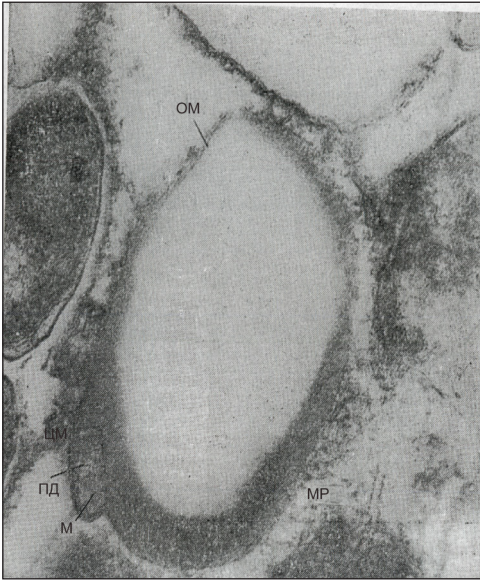


Рис. 13. Ультратонкий зріз L-колонії *M. tuberculosis* за З.Н. Кочемасовою зі співавт. (1980)

Обмежений одноконтурною мембраною (ОМ) “вакуолоїд” з наявною на його поверхні протоплазматичною ділянкою (ПД), яка обмежена трипрошарковою мембраною (М). Міжклітинна речовина (МР) щільно підходить до поверхні “вакуолоїда” × 130 000

Отже, у складі колонії L-форм виявляються: 1) елементарні тільця (субмікроскопічні утворення діаметром 0,2–1,0 мкм, обмежені мембраною з трьох шарів, мають рибосоми і нерідко – нуклеоїд); 2) зернисті елементи кулеподібної чи неправильної форми тіла розміром 1–5 мкм (основний елемент у культурі L-форм, преважне в логарифмічній фазі; формуються на ниткоподібних структурах і в середині великих тіл; вміщує нуклеоїд і мембранні структури); 3) великі тіла, які досягають 50 мкм (зустрічаються на всіх етапах L-трансформації; здатні реверсувати у вихідні бактеріальні клітини; мають сферичну чи полігональну форму); 4) ниткоподібні структури діаметром від 0,1 до 10 мкм (не є обов’язковим елементом всіх культур L-форм); 5) безформенні безструктурні елементи чи аморфні маси, в яких межа окремих клітин не виявляється, не проглядаються (зустрічаються у всіх культурах на ранньому і пізньому етапах L-трансформації).

S. Madoff (1986); G.J. (Dominique 1982) повідомили, що CWDB з біологічного матеріалу можуть включати всі ці форми *in vivo* та *in vitro*.

За присутності індукуючого агента (чинника), наприклад, пеніциліну, колонії L-форм можуть тривало культивуватися на відповідному середовищі. Якщо усунути індукуючий фактор, то нестабільні L-форми реверсують в материнські клітини, а стабільні L-форми втрачають здатність до реверсії. С.В. Прозровський й співавт. (1981) відмічають, що початок реверсії бактеріальних форм проявляється в ніжному дифундуючому в середовище ореолі росту навкруги L-колонії. За мікроскопії виявляються різноманітні перехідні гетероморфні форми: роздуті гантелеподібні, веретеноподібні, видовжені, місцями фрагментуючі, розбухлі кокові форми, які розташовуються у вигляді ланцюжків, дрібні кулеподібні форми типу пеніцилінових сферопластів. За Грамом – не фарбуються, а якщо й фарбуються, то нерівномірно.

Дослідження декількох видів мікобактерій засвідчили (Пузанов В.А. і Николаєва Г.М., 1994), що кількість, морфологія і тинкторіальні властивості L-форм залежать від виду мікроорганізму і тривалості культивування. Фарбування за Романовським-Гімза дає можливість виявити гранулярні кулі і кислотонестійкі округлі форми. Зазвичай L-форми на щільних живильних середовищах не формують колоній та не фарбуються в червоний колір за методом Ціль-Нільсена. Проте, як повідомляють З.Н. Кочемасова й співавтори, в 1980 році їм довелося встановити, що на щільних середовищах деякі ревертанти росли швидше, ніж вихідні культури: вологі, маслянисті, колонії, які легко знімаються, типу “S” виростили зазвичай на 10–12 добу. У ряді випадків ріст був дуже недостатнім. У деяких штамів, що реверсували із L-форм різних пасажів (18–20, 10–20), виявлений слабкий помаранчевий пігмент, який надавав їм подібність з пігментними штамми нетуберкульозних мікобактерій. За мікроскопії препаратів, приготовлених з таких культур (і зафарбованих за методом Ціль-Нільсена), імерсійною системою авторам вдалося побачити окремі структурні елементи L-форм: зокрема, сферичні тіла, зафарбовані в блакитний колір; окремі тіла в період руйнування і виходу вмісту, який складається із синіх і червоних поліморфних гранул і паличок.

2.1.3. Можливі етапи L-трансформації і реверсії CWDB у вихідні бактеріальні форми

Враховуючи морфологічне різноманіття CWDB та посилаючись на дані численних досліджень авторів, які вище наведені в цій роботі, можна визначити певні етапи L-трансформації мікобактерій й бактерій взагалі. Так, за тимчасового впливу індукуючих чинників найперший етап трансформації характеризується появою передвісників L-форм, а саме: форм незбалансованого росту (поліморфних бактерій – ниткоподібних, гігантських, інших атипових варіантів). За впливу факторів, які блокують синтез клітинної оболонки як грампозитивних, так і грамнегативних мікроорганізмів у культурах рідкого середовища і осмотичного захисту можуть формуватися сфероплас-

ти, які частково зберігають клітинну оболонку. Вони кулеподібної форми, сильно зморщені, мають вм'ятини зі всіх сторін і слабо розвинену систему внутрішніх мембран; здатні до атипового поділу на напіввідких живильних середовищах. Протопласти, на відміну від сферопластів, повністю позбавлені клітинної оболонки, мають кулеподібну форму, слабо розвинену систему внутрішніх мембран; здатні збільшуватися в розмірах, зливатися. Ці транзиторні форми, за усунення індукуючих чинників, швидко реверсують.

У подальшому, власне, утворюються L-форми, об'єднані загальним L-фенотипом.

Незавершені L-форми (M-цикл) – різної величини кулеподібні і вакуолізовані утворення сферопласного і протопласного типу, за відсутності елементарних тілець. За пересівів на середовищах з осмотичними стабілізаторами й сироватки кожний раз повторюється цикл репродукції бактеріальної форми.

Нестабільні L-форми володіють типовим поліморфізмом; розмірами 0,2–5,0 мкм; розмноження множинне; мають дві мембрани на поверхні клітини й деякі антигени клітинної оболонки (хімічними методами виявляються основні компоненти пептидоглікану-діамінопімеїнова і мурамова кислоти); фагочутливі, повільно і не зовсім повноцінно реверсують на звичайних середовищах.

Умовно стабільні L-форми масової конверсії вимагають присутності сироватки в середовищі; здатні реверсувати у вихідну культуру за додаткових змін умов культивування.

Стабільні L-форми утворюються в результаті мутації. На відміну від нестабільних L-форм, вони не реверсують у вихідні варіанти за усунення індукуючого чинника й зміни умов культивування; мають одну мембрану на поверхні клітини, повністю позбавлені антигенів клітинної оболонки (ні пептидоглікан, ні його попередники не виявляються жодним з існуючих наразі методом), фагорезистентні.

Чи виживають CWDB у клітинах хазяїна достатньо довго і чи здатні вони викликати патологічний процес? І чи можна дані, які стосуються L-форм в культурі клітин, екстраполювати на ситуацію in vivo й на різні види бактерій?

Щоб зрозуміти ці явища й дати відповідь на запитання, необхідно спробувати, за наявності значного масиву інформації спеціальної літератури, зрозуміти репродуктивний цикл L-форм. Загальноновизначено, що більшість CWDB зазвичай розмножуються шляхом бінарного поділу. Проте як способ реплікації CWDB спостерігалися всі морфологічні варіації, включаючи численні поділи, ділення в різних площинах, брунькування, філаментозний ріст, фрагментація цитоплазми і т.ін., хоча в цілому способи розмноження L-форм мало ефективні. Повідомлення М.А. Пешкова в 1955 році про одержання методом світлооптичного випромінення L-форм бактерій підтверджує можливість їх реверсії шляхом утворення відростків, які відходять від кулеподібних тіл. Не виключено, що виявлені на поверхні “вакуолоїди” протоплазматичні

ділянки є початком реверсії, а не наслідком вакуолізації протопластів. Більшість утворених дочірніх особин відрізняються за розмірами, наявністю нуклеоїду, життєздатністю. Здатність до утворення елементарних тілець, які подібні на “насіння” і таких маленьких, як деякі віруси, дає можливість для CWDB проходити через бактеріальні фільтри.

На біологічну сутність фільтривних форм (елементарних тілець) існували різні точки зору: 1) вони є мінімальними репродуктивними клітинами L-форм, проявом одного з етапів L-трансформації; 2) це часточки, які залишилися після розпаду клітин, що вміщують ядерну речовину; 3) елементарні тіла – це результат пристосовної мінливості мікробів у неблагоприємних умовах довкілля; 4) початкова стадія онтогенетичного циклу розвитку клітинних форм.

На користь першої з наведених точок зору свідчать такі факти: фільтривні форми можуть утворюватися з великих і кулеподібних тіл, ниткоподібних структур різноманітними способами. Мова йде про брунькування на поверхні клітини, у вакуолі материнської клітини, формуванні їх з щільних ділянок цитоплазми всередині клітини, в результаті “розщеплення” цитоплазми, з ділянок цитоплазми, оточених мієлоподібними структурами, відділенням периферійної ділянки від іншої частини цитоплазми в результаті вращення мембрани між ними. Існує дев’ять типів елементарних тіл, які відрізняються за структурою і можливою життєздатністю.

Виходячи з біологічних особливостей CWDB, передбачається, що маленькі, щільні, невеликулярні L-форми є центральним (ядерним) елементом у репродуктивному циклі. Іншими словами, щільні форми можна розглянути як недиференційовані “стовбурові клітини”, які здатні самостійно розвиватися в різних напрямках, залежності від одержаного стимула. Коли вони звільняються з везикул материнських форм в оточуюче живильне середовище за умов, неблагоприємних для росту L-форм, то розвиваються в транзиторні форми, а потім в організми, які мають клітинну оболонку, – стверджують G.J. Dominique і H.V. Woody (1997).

Dominique вважає, що одна велика везикулярна материнська зріла форма може вміщувати безліч елементарних тілець. У подальшому вони стають недиференційованими щільними формами і можуть бути виштовхнуті з материнської форми як організми, що розмножуються (Dominique G.J., 1995). Такі форми можуть зберігати здатність розмножуватися всередині материнської везикули, чи навіть поза неї, після розриву так довго, як можуть залишатися закріпленими до неї. Такі “виштовхнуті” материнською формою тільки вміщують бактеріальний геном і мають мінімальну метаболічну активність (тобто ферменти і кофактори), достатні, щоб ініціювати вироблення енергії і біосинтез. Вони можуть відтворювати як дрімаючі форми без клітинної оболонки, так і реверсувати в бактерії з повноцінною клітинною оболонкою або ж продукувати обидва варіанти одночасно. Саме через вироблення щільних тілець всередині везикулярної материнської форми передбачається ще один тип диференціації бактерій, оскільки наведений біологічний цикл розвитку притаманний більшості видів бактеріальних форм.

Висушування елементарні тільця витримують (Калина Г.П., 1962) значно ефективніше, ніж вегетативні форми (від декількох місяців до 10 років). Їх регенеративні властивості зберігаються, за різними повідомленнями, за нагрівання до 56°, 60°, 80 °С; до 75–90 °С – протягом 1–2 годин, до 100 °С – 5 хв і навіть 1 годину. Елементарні тільця стійкі щодо індукуючих їх утворення чинників (ультразвуку, антибіотиків, бактеріофагу, деяких хімічних речовин у певних концентраціях).

Спостереження тілець зі щільною цитоплазмою всередині материнських клітин у CWDB грампозитивних бактерій і протоплазматичних циліндрів всередині єдиної загальної мембрани примушує передбачати, що повторна поява збудника за певних хронічних бактеріальних інфекціях, включаючи туберкульоз, відноситься до бактеріальної диференціації в стійкі форми (елементарні щільні цитоплазматичні тільця), які персистують в тканинах (Green M.T. й співавт., 1974; Marquis J.Z. й співавт., 1979; Dominique G.J., 1982; Guerrero R. й співавт., 1993). Елементарні тіла, які сформувалися з L-форм, можуть вирости в недиференційовані форми. Більш дрібні щільні тільця всередині везикул, стверджують автори (Green M.T. й співавт., 1974), не відіграють великої ролі в репродукції – вони необхідні за дефіциту чи відсутності ДНК.

Неодмінною умовою розвитку в бактеріальні форми субмікроскопічних фільтривних тілець, які утворюються під впливом пеніциліну, є попередня агрегація елементарних тілець в скопичення. Реверсія активізується за присутності убитих тіл гомологічних бактерій (“кормилок”): густа завис гомологічних бактерій в бульйоні, яка інкубована в термостаті 4–6 годин, а потім нагріта за 100 °С протягом 30–60 хв (принцип “ферментативного середовища”). Між тим стимулюючі властивості “кормилок” не постійні, варіює ця ознака і всередині популяції одного штаму; “кормилочні” властивості не збігаються зі симбіотичними (Калина Г.П., 1962).

Необхідно зазначити, що багаторічне вивчення ролі щільних тілець, як резистентних форм патогенних бактерій, ще й сьогодні не завершилося формуванням єдиної, або ж принаймні, превалюючої думки. Це визначає необхідність подальших досліджень, стверджує G.J. Dominique (1995).

Звичайно, якщо поява життєздатних персистентних тілець є універсальною ознакою біологічного циклу розвитку бактеріальних форм не тільки мікобактерій, то стає очевидним пошук відповідей на питання про їх хімічну і імунологічну природу. Вирішення цих питань суттєво підвищить ефективність заходів профілактики й боротьби з хворобою тварин, бактеріальної етіології взагалі.

Водночас M.R. DeCastro-Costa і O.E. Landman (1977) за вивчення L-трансформації *B. subtilis* встановили, що реверсію протопластів і L-форм *Bacillus subtilis* у вихідний стан контролює інгібіторний білок. Коли клітинна оболонка згаданого мікроорганізму лізується лізоцимом і одержані протопласти пересіваються на гіпертонічне м'яке агарове середовище, кожний протопласт формує L-колонію. L-тільця з таких колоній знову пересіваються як L-колонія утворюючі одиниці (L-KYO). Проте якщо протопласти чи L-тільця

є “обумовлюючими” одноденною інкубацією в 0,4%-вому казеїно-гідролізованому середовищі і потім інкубуються у 25%-вому желатиновому середовищі впродовж однієї години, то від 60 до 100 % раніше позбавлених оболонки клітин реверсують в бацілярні колонії. Проведені експерименти в значному ступені пояснюють механізм, який відповідає за “спадкоємне” продовження існування *B. subtilis* без оболонки. Показано, що протопласти продукують реверсивний інгібіторний чинник (РІЧ), який блокує реверсію, коли клітинна концентрація перевищує 5×10^5 Л-КЮ/см³. Цей інгібітор не діалізується і чутливий до трипсину, нагріву і детергенту. Ефективна реверсія за 2×10^7 Л-КЮ/см³ відбувається, якщо протопласти оброблені трипсином після створення відповідних умов і внесення хлорамфеніколу в желатинове середовище (реверсійне). За присутності 500 мкг трипсину в 1 см³ потреба в трипсині різко зменшується і реверсія швидко перебігає в рідкому середовищі, що вміщує тільки 10 % желатину. Трипсин також стимулює реверсію у Л-колоній, які ростуть на м'якому агарі. Прихований РІЧ активується бета-меркаптоетанолом. Цей реагент блокує реверсію протопластів щільністю 5×10^5 Л-КОУФ/см³. Порівняння аутолітичних закономірностей *B. subtilis* і РІЧ виявило, що обидва пригнічуються високими концентраціями желатину, обидва активізуються бета-меркаптоетанолом і обидва мають високу спорідненість (афінітет) щодо клітинної стінки. Допускаючи, що РІЧ є аутолізином, пропонуються моделі реверсії протопластів, які зводяться до того, що мутанти зі зміненою тришаровою тейхоевою кислотою демонструють змінені реверсивні закономірності.

2.1.4. Метаболічна активність Л-форм

Відомо, що Л-форми зберігають, як правило, антигенні, біохімічні й метаболічні характеристики материнських бактерій. Проте властивості аберантних бактеріальних форм, які ізолювані з біологічного матеріалу, не завжди збігаються з такими вихідних бактерій через різноманітність біотипів, які у конкретного макроорганізму, напевне, мають походження з єдиного геному й виду (Dominique G.J. і Woody H.B., 1997).

Дослідження L.B. Guze (1951); O.E. Landman й співавт. (1968); P.B. Wyrick і H. Gooder (1977) дали відповіді на питання природи спадкових механізмів, які пояснюють стабільність Л-форм. Набір генів у Л-форм, напевне, той же самий, що й у материнських бактерій, від яких Л-форми виникли. Коли бактеріальні клітини конвертують у Л-форми чи коли вони реверсують у вихідні бактерії, очевидно, що набуття чи втрата нуклеїнової кислоти не відбувається. Показано, наприклад, що кожна клітина *Bacillus subtilis* може конверсувати в Л-форми і кожна Л-форма може поновити клітинну стінку. Такий висновок фокусується на двох ключових явищах: втрата здатності формувати клітинну стінку і здатність клітини відтворювати клітинну стінку. У *B. subtilis* перше з них настає, коли залишки клітинної оболонки видалені лізоцимом.

Реверсія у вихідні форми може бути завершеною (з повним поновленням властивостей вихідних мікроорганізмів) і незавершеною (морфологічні ознаки, біологічні і біохімічні властивості повністю не відновлюються) й значно відрізняється у різних бактеріальних видів (Прозоровський С.В. й співавт., 1981). Для *B. subtilis*, як повідомляють G.J. Dominique і Н.В. Woody, (1997), першим етапом в цьому процесі є утворення прошарку оболонки на зовнішній клітинній мембрані; услід за цим – утворення перегородки і мезосом.

Спостерігаючи в електронний мікроскоп утворення сферопластів *Mycobacterium smegmatis* й морфологічні аспекти їх реверсії в бактеріальні форми, Т. Udou і співавт. в 1982 році встановили два очевидних способи реверсії. Перший з них був ініційований брунькуванням сферопластів: бруньки поступово видовжувалися, набували міцеліальних форм, ставали гіллястими з подальшою появою перегородок і фрагментування. Другий спосіб походив з внутрішньоклітинного утворення дуже дрібних клітин, можливо, елементарних тілець, і їх звільнення із сферопластів.

Дані з відтворення експериментальної інфекції *M. tuberculosis* H 37 R_v у морських свинок шляхом інтраназального й інтраперитонеального зараження свідчать, що L-форми можуть легко індукувати і, як засвідчила електронна мікроскопія, тривалий час персистують *in vivo* (Li G.L., 1990). Найбільшу кількість колоній L-форм було одержано з легень через 8 тижнів після зараження. У процесі досліджень кількість бактеріальних форм знижувалася, а L-форм неухильно підвищувалася.

В останні десятиліття важливе місце в пізнанні біології мікобактерій набувають молекулярно-генетичні дослідження, що стосуються їх ДНК (Камінський Г.Д. й співавт., 1989). Для вивчення особливостей ДНК розроблено велику кількість методів (Troesch A. й співавт., 1999). Одним з правомірних серед цих тестів є детекція мікобактерій, у тому числі полімеразна ланцюгова реакція – ПЛР (Muraay P.R. й співавт., 1999). За цього використовують різні таргетні ділянки ДНК (Van Soolingen, 2001; Sachse K. і Frey J; 2003).

У геномі патогенних мікобактерій знайдені високоспецифічні інсерційні елементи (IS), які представлені численними копіями, тому й використовуються як таргетні ділянки. На цьому акцентують увагу K. Sachse і J. Frey (2003). J. Mahillon і С. Leonard (1998) встановили, що IS елементи – невеликі фрагменти ДНК, які містять гени, необхідні для їх транспозиції (переміщення), і які здатні переміщатися з однієї ділянки локалізації в іншу як усередині геному, так і між геномами. А.С. Конечев і Г.А. Севасьянова (2005) повідомляють, що мобільні елементи в процесі реплікативного механізму транспозиції обумовлюють генетичну мінливість бактерій, спричиняючи делеції або інверсії за транслокації (переміщень) локусів ДНК, відіграючи суттєву роль в дивергенції та видоутворенні бактерій.

У 1993 році J.D.A. Van Embden й співавт. запропонували аналіз поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів (ПДРФ) із зондами, отриманими з інсерційного елемента IS 6110, який використовувався для генотипу-

вання штамів мікобактерій. Van Soolinçen D., (2001), Mostrom P. й співавт. (2002), R.M. Warren й співавт. (2002) показали, що цей метод ґрунтується на мобільності IS 6110: різній кількості його копій в ДНК конкретного штаму та варіабельності ділянок його інсерції в хромосомі. IS 6110 присутній практично в усіх (приблизно 97 %) ізолятах мікобактерій туберкульозу (зазвичай від 1–2 до 25 копій). Проте А. Aranz й співавт. (1996); L. Dvorska й співавт. (2001) стверджують, що для ізолятів *M. bovis* характерна присутність тільки декількох копій IS 6110, часто – тільки одна, а іноді цей елемент відсутній взагалі.

Отже, підсумовуючи великий масив інформації за тривалий історичний період, можна відзначити, що практично з часу відкриття Р. Кохом збудника туберкульозу стосовно утворення некіслотостійких та інших форм мікобактерій й дотепер остаточно не з'ясовані, а значить, і не визнані науковою спільнотою, форми мікобактерій: це – результат індукуючих чинників діючих *in vivo* або *in vitro*, чи це властивість цих мікроорганізмів, закладена генетично й яка проявляється закономірно, залежно від стадії (циклу) розвитку. Беззаперечно, що не було б еволюційно передбачених генетичних задатків до мінливості мікобактерій, то вони б не змінювалися за дії індукуючих факторів (різний склад живильного середовища, температура, антибіотики, туберкулостатичні препарати й інше) й залишалися б, швидше за все, в незмінному, традиційно утвердженому в науковому світі стані. Проте цього не спостерігається. Напевно, ці індукуючі фактори здебільшого тільки пришвидшують появу нетрадиційних форм мікобактерій. Без сумніву, відповідь на це запитання міг би дати тривалий, багаторічний дослід: пасажі одного штаму мікобактерій через традиційне штучне щільне яєчне живильне середовище з різним рН.

2.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Розпочинаючи дослідження, ми виходили з необхідності виділення культур мікобактерій, у тому числі й атипичних, з біологічного матеріалу великої рогатої худоби тривало неблагополучних до туберкульозу господарств, оскільки за такої епізоотичної ситуації може існувати висока вірогідність персистенції мікроорганізму зі зміненими біологічними властивостями, про яку повідомляє ряд учених.

Окрім цього, нас цікавили відмінності біологічних властивостей мікобактерій персистуючих у макроорганізмі з туберкульозними патолого-анатомічними змінами та без них. Для цього в першу чергу дослідили біологічний матеріал з туберкульозними змінами, а в подальшому і без них від великої рогатої худоби, реагуючої на ППД-туберкулін для ссавців, та вивчили морфологічні ознаки, культуральні, тинкторіальні й біохімічні властивості ізольованих мікобактерій. Із цією метою використовували традиційні у ветеринарній медицині методи досліджень.

2.2.1. Видова належність мікобактерій, виділених від великої рогатої худоби, реагуючої на ППД-туберкулін для ссавців, неблагополучних щодо туберкульозу господарств

Відібраний на секції біологічний матеріал досліджено в лабораторії, результати якого наведено в *табл. 5*. Як бачимо, туберкульозні ураження частіше виявлялися в лімфовузлах у тварин СТОВ “Злагода” (31,58 % оглянутого на секції поголів’я). Патологічні зміни характеризувалися збільшенням останніх у розмірі, наявністю горбиків, які містили за розрізу казеозні маси. У трьох тварин із 65 оглянутих виявили зміни і в легенях, де спостерігали численні щільні, різної величини вузлики. Для бактеріологічного дослідження відбирали матеріал з туберкульозними змінами. У результаті дослідження восьми проб, одержаних від тварин ВСК “Дружба”, виділили три культури мікобактерій, з шести проб СТОВ “Злагода” – три культури, десяти проб СПП “Чумаки” – чотири культури мікобактерій.

5. Результати лабораторних досліджень біологічного матеріалу

Господарство	Досліджено тварин	Метод дослідження						
		патолого-анатомічний, виявлено туш				бактеріологічний		
		з туберкульозними ураженнями		без туберкульозних уражень		досліджено проб	виділено культур мікобактерій	%
		абс.	%	абс.	%			
ВСК “Дружба”	21	3	14,29	18	85,71	8	3	37,5
СТОВ “Злагода”	19	6	31,58	13	68,42	6	3	50
СПП “Чумаки”	25	2	8,00	23	92,00	10	4	40

У мікобактерій десяти ізольованих культур досліджували культуральні, тинкторіальні, біохімічні властивості та морфологічні ознаки.

Як засвідчили дослідження біологічного матеріалу, відібраного від великої рогатої худоби, виділені штами мікобактерій відрізнялися за швидкістю формування колоній на яєчному живильному середовищі з рН 7,1 (*табл. 6*).

Досліджувані культури мікобактерій за номерами 3–5, 7, 8 на яєчному середовищі для культивування мікобактерій росли на 22–27 добу від часу посіву суспензії, приготовленої з біологічного матеріалу у вигляді колоній R-форм, які були поодинокі (9–16 колоній на середовищі пробірки), шорсткі, сухуваті, матові, кольору слонової кістки. Мікроскопією виявили червоні, прямі зі заокругленими кінцями, зернисті палички розміром 1–3×0,3–0,5 мкм.

6. Культуральні властивості штамів мікобактерій*

Господарство	Штам мікобактерій, №	Властивість			
		поява колоній, доба	форма колоній	колір колоній	інтенсивність росту за 37 °С
ВСК “Дружба”	1	7	R	слонової кістки	++
	2	7	R	слонової кістки	++
	3	22	R	слонової кістки	+
СТОВ “Злагода”	4	27	R	слонової кістки	+
	5	26	R	слонової кістки	+
	6	7	R	слонової кістки	++
СПП “Чумаки”	7	27	R	слонової кістки	+
	8	27	R	слонової кістки	+
	9	8	S та R	сіруватий, слонової кістки	+++
	10	10	S	блід-жовтий	+++

* (+) – поодинокі колонії (1–10);
 (++) – значна кількість колоній (11–50);
 (+++) – безліч колоній (51–100).

Культури мікобактерій за номерами 1, 2, 6 на середовищі для культивування мікобактерій формували колонії на 7 добу з моменту висіву суспензії у вигляді R-форм, які були шорсткі, матові, кольору слонової кістки. Мікроскопією виявили червоні, прямі, зернисті палички розміром 1–3×0,3–0,5 мкм.

Культура мікобактерій за номером 10 на середовищі для культивування інтенсивно формувала колонії на 10 добу після посіву у вигляді S-форм, які були блискучі, гладкі, блід-жовтого кольору.

9-та культура мікобактерій дещо відрізнялася від попередніх. Ріст за температури 37 °С спостерігали на 8 добу після посіву у вигляді двох видів колоній: S-форми, які були гладкі, маслянистої консистенції, сіруватого кольору та R-форми – зморшкуваті, сухуваті, кольору слонової кістки.

Це може стверджувати персистенцію в організмі тварин патогенних та атипових мікобактерій.

За формою та кольором колоній культури практично не відрізнялися. Проте спостереження за інтенсивністю росту колоній за 37 °С показали, що остання суттєво залежить від швидкості формування перших колоній мікобактерій.

Повільнорослі мікобактерії, виділені з біологічного матеріалу, формували поодинокі колонії, у той час як швидкокорослі формували безліч колоній. Ці дані засвідчили необхідність подальших дослідів з визначення видової належності виділених мікобактерій.

7. Ферментативні властивості мікобактерій досліджуваних штамів*

Властивість		Штам, №									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Редукція нітратів		-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Каталазна активність		±	±	±	±	±	±	±	±	+	+
Термостабільна каталаза		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Ріст на середовищі з натрієм саліциловокислим, мг/см ³ :											
0,5		+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
1,0		-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Ріст за t °C	22	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	37	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	45	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
* (+) – позитивний результат; (-) – негативний; (±) – сумнівний.											

Мікобактерії досліджуваних культур за номерами 9 та 10 морфологічно були подібні. У мазках, які фарбували за Ціль-Нільсеном, під імерсією спостерігали основну кількість червоних, прямих паличок довжиною 1–4 мкм, шириною 0,4–0,6 мкм. Водночас зустрічалися коковидні форми до 20 %.



Рис. 14. Виразка в ділянці введення матеріалу (завис мікобактерій)

У мікобактерій спостерігали різну біохімічну активність, здатність росту за різних температур та з натрієм саліциловокислим (табл. 7).

Одночасно звертає на себе увагу той факт, що тільки мікобактерії штамів за номерами 1, 2, 6, на відміну від інших, росли на живильному середовищі, яке містило натрій саліциловокислий в концентрації 0,5 мг/см³.

Визначення біологічної активності в мікобактерій виділених штамів (1 мг/см³) проводили на морських свинках (рис. 14).

У таких заражених мікобактеріями штамів за номерами 1–8 у ділянці введення завису спостерігали набряк та утворення виразки з гнійним вмістом. Маса піддослідних тварин до кінця дослідження зменшилася на 15–20 %. Повільнорослі та швидкокорослі штами мікобактерій стимулювали алергію протягом дослідження й викликали загибель морських свинок (табл. 8).

8. Сенсibiliзувальні та патогенні властивості виділених мікобактерій*

Штам мікобактерій, №	Кількість заражених морських свинок	Алергічне дослідження, доба			Загинуло тварин	Строки загибелі	Евтаназовано по закінченні досліду	Туберкульозні зміни	
		20	30	60				наявні	відсутні
1	2	+	+	+	2	39–47	–	2	–
2	2	+	+	+	2	42–51	–	2	–
3	2	+	+	–	2	55–61	–	2	–
4	2	+	+	–	2	39–43	–	2	–
5	2	–	+	–	2	49–57	–	2	–
6	2	+	+	+	2	39–50	–	2	–
7	2	+	+	+	2	35–48	–	2	–
8	2	+	+	+	2	51–69	–	2	–
9	2	+	–	+	–	–	2	–	2
10	2	+	+	+	–	–	2	–	2

* (+) – позитивний результат;
(–) – негативний.

На розтині загиблих морських свинок виявлені ураження внутрішніх органів, характерні для туберкульозу: гіпертрофія печінки, селезінки, лімфатичних вузлів. Крім того, у селезінці та в легенях виявляли різну кількість напівпрозорих вузликів (табл. 9, рис. 15, 16).

9. Результати патолого-анатомічного дослідження морських свинок, заражених мікобактеріями*

Штам мікобактерій, №	№ тварини	Специфічні ураження				Індекс ураження
		лімфовузли	селезінка	печінка	легені	
1	2	3	4	5	6	7
1	1	++	++	–	+++	18
	2	++	+++	–	++	16
2	3	++	+++	–	++	16
	4	++	+++	–	++	16
3	5	++	+++	–	++	16
	6	++	+++	–	+++	20
4	7	++	+++	–	++	16
	8	++	+++	–	++	16

1	2	3	4	5	6	7
5	9	++	+++	–	++	16
	10	++	+++	–	+++	20
6	11	++	+++	–	++	16
	12	++	++	–	+++	18
7	13	++	+++	–	++	16
	14	++	+++	–	++	16
8	15	++	+++	–	+++	20
	16	+++	++	–	++	15
9	17	–	–	–	–	–
	18	–	–	–	–	–
10	19	–	–	–	–	–
	20	–	–	–	–	–

* (+) – поодинокі вузлики; (++) – декілька вузликів;
(+++) – численні вузлики.

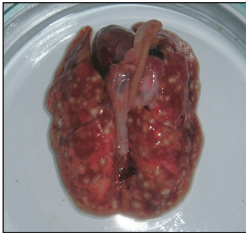


Рис. 15. Легені морської свинки, уражені туберкульозом



Рис. 16. Селезінка морської свинки: 1 – у нормі; 2 – з туберкульозними вогнищами

У морських свинок (№ 9, 10), у яких спостерігався прояв алергічної реакції і евтаназованих наприкінці досліду, на розтині макроскопічних патолого-анатомічних змін не виявлено (рис. 16).

Отже, дослідження показали, що в неблагополучних господарствах циркулюють як *M. bovis*, так і атипів мікобактерії.

У свою чергу, за результатами попередніх досліджень, *M. bovis* були поділені на дві групи: 1) повільнорослі (з традиційними властивостями);

2) швидкорослі. Це свідчить про те, що в тканині з туберкульозними ураженнями персистерують змінені за біологічними властивостями мікроорганізми.

2.2.2. Біологічні властивості *M. bovis* швидкорослих штамів

Морфологічні ознаки й культуральні властивості. Ці дослідження обґрунтовані незвичайними культуральними особливостями трьох із восьми виділених штамів *M. bovis*, які полягали у своє-

рідній здатності до розмноження збудника та швидкому формуванні колоній на штучному живильному середовищі. У третій генерації згадані штами мікобактерій формували чітко виражені колонії на другу добу після посіву. У зв'язку з цим слід було переконатися в належності їх до мікобактерій бичачого виду. Для цього провели подібні вищенаведеним досліди з дещо розширеним аспектом методичних прийомів, зокрема, до схеми дослідження ввели курей та кролів, а також штучні живильні середовища з різним рН (7,1 та 6,5), аби остаточно переконатися в наших попередніх висновках. Для порівняння були використані повільнорослий штам *M. bovis* (№ 5) та швидкорослі атипові мікобактерії, попередньо виділені з молока та лімфатичних вузлів корів СТОВ “Злагода” (№ 9 та 10).

Швидкорослі штами *M. bovis* (№ 1, 2, 6) на яєчному середовищі для культивування мікобактерій з рН 7,1 формували колонії у вигляді R-форм на 2 добу після посіву, які вросли в середовище, були шорсткими, з нерівними краями, кольору слонової кістки, сухої консистенції. На живильному середовищі з рН 6,5 ці штами формували колонії також на 2 добу, але вони були S-форми: випуклі, гладкі, блискучі, кольору слонової кістки, сухувато-маслянистої консистенції, відокремлені одна від одної. На рідкому середовищі Сотона з рН 7,1 на 7 добу після посіву вони утворювали тоненьку, сухувату плівку коричневого кольору на поверхні середовища, яка при струшуванні розбивалася і осідала на стінки колби. А на рідкому середовищі з рН 6,5 спостерігали ріст на 5 добу після посіву у вигляді напівпрозорої плівки.

За пересіву *M. bovis* повільнорослого штаму (№ 5) на яєчне живильне середовище з рН 7,1 спостерігали появу R-форм колоній на 10–14 добу після посіву, які були поодинокі, шорсткі, сухуваті, матові, кольору слонової кістки. На яєчному живильному середовищі з рН 6,5 мікобактерії формували на 7–10 добу колонії S-форм, які були поодинокі, випуклі, гладкі, сухуваті, кольору слонової кістки.

Мікроскопією мазків засвідчили, що швидкорослі та повільнорослий штами *M. bovis* за морфологією клітин були подібні, клітини мали розміри $1-3 \times 0,3-0,5$ мкм, що характерно для мікобактерій бичачого виду.

Атипові мікобактерії, виділені з молока (АТ-1), на яєчному середовищі з рН 7,1 на 7 добу після посіву формували колонії S-форм, які були випуклі, блискучі, з гладкою поверхнею, маслянистої консистенції, кольору слонової кістки, а на яєчному середовищі з рН 6,5 – формували колонії також у вигляді S-форм, але на 5 добу після посіву. Останні були різних розмірів, блискучі, жовтуваті за кольором з гладкою поверхнею. У мазках, пофарбованих за Ціль-Нільсеном, виявили червоні, прямі палички довжиною 1–4 мкм, шириною 0,4–0,6 мкм і коковидної форми.

Атипові мікобактерії (штам № 9), виділені з лімфатичних вузлів (АТ-2), на яєчному середовищі з рН 7,1 давали інтенсивний ріст на 2 добу після посіву у вигляді двох видів колоній: S-форм, які були маслянистої консистенції, сіруватого кольору, та R-форм, зморшкуваті, маслянисті, кольору слонової кістки, а на яєчному середовищі з рН 6,5 – росли також на 2 добу після посіву, тільки

у вигляді S-форм, які були схожі з колоніями на яєчному середовищі з рН 7,1. За морфологією клітини були подібні до атипівих мікобактерій, виділених з молока (АТ-1). Коковидні форми в мазках виявлялися до 20 %.

Між тим за певних умов, як повідомляють деякі літературні джерела, *M. tuberculosis* дуже рідко можуть викликати, хоча і не чітко виражені, але достатньо сформовані, патолого-анатомічні зміни у кролів (Кассіч Ю.Я. та співавт., 1990). Тому, для спростування цього, застосовували реакцію редукції нітратів, яка дає змогу диференціювати мікобактерії людського виду від бичачого та пташиного. Останні на відміну від збудника туберкульозу людини не редукують нітрати. Але цією властивістю володіють (*M. kansasii*, *M. fortuitum*, *M. smegmatis*) і не володіють (*M. marinum*) деякі види атипівих мікобактерій.

Для з'ясування цього питання дослідили штами мікобактерій, відібраних для виконання даної роботи, використавши реакцію редукції нітратів. У результаті проведених досліджень встановлено, що на перших хвиликах після додавання індикатора набув жовтого кольору завис, що містив атипіві мікобактерії (штам № 1). В усіх інших зразках (пробірках) колір завису не змінився протягом досліду.

Таким чином, ці дослідження остаточно підтвердили належність досліджуваного швидкорослого штаму мікобактерій до бичачого виду.

Як засвідчили подальші дослідження, швидкорослий та музейний повільнорослий штами *M. bovis* не володіють каталазною активністю, того часу як у завису, виготовленого із штамів № 1 та 2 атипівих мікобактерій, практично відразу після внесення 3%-вого розчину перекису водню почалося виділення пухирців повітря, які вкрили краплю суцільним нашаруванням.

Досліджуючи ріст колоній за температури термостату 22, 37 і 45 °С, позитивний результат одержано при інкубації в усіх температурних режимах двох штамів атипівих мікобактерій, а за 37 °С тільки – *M. bovis*.

Поряд з цим не тільки швидке розмноження та формування колоній на живильному середовищі є особливістю досліджуваного штаму *M. bovis*. Так, спостерігаючи ріст на середовищі з натрієм саліциловокислим, встановлено, що при його концентрації в середовищі 0,5 мг/см³ досліджуваний мікроорганізм формує колонії на 11 добу інкубації, без нього так само, як і в інших випадках – на 2-у добу.

Музейний штам *M. bovis* без натрію саліциловокислого на середовищі формувал колонії на 14 добу, а в концентрації 0,5 та 1,0 мг/см³ колонії не утворювалися. Між тим атипіві мікобактерії двох епізоотичних штамів проявляли ріст колоній на 2-у добу на середовищі з натрієм саліциловокислим в обох концентраціях і без нього.

Мікроскопічні дослідження швидкорослих *M. bovis*, колонії яких формувалися на середовищі з концентрацією натрію саліциловокислого 0,5 мг/см³ виявили морфологічно змінені червоні палички: на тлі нормальної морфології збудника спостерігалися зігнуті, деформовані, у два-три рази довші, ніж у мазках, які виготовлені з колоній, що зареєстровані на середовищі без натрію саліциловокислого. Це свідчить про наявність у природі швидко-

рослих *M. bovis* специфічних властивостей, які, напевно, можуть визначити ефективність заходів профілактики і боротьби з туберкульозом тварин та профілактики й лікування хвороби в людини.

За біохімічними властивостями повільнорослий та швидкорослі епізоотичні штами *M. bovis* характеризувалися таким: мікобактерії не редукували нітрати, не володіли каталазною активністю, не росли за температури 22 та 45 °С (табл. 10).

10. Ферментативні властивості мікобактерій*

Властивість		Штам						
		повільно- рослий <i>M. bovis</i>	швидкорослі <i>M. bovis</i> , №			атипові мікобактерії		
			1	2	6	АТ-1	АТ-2	
Редукція нітратів		–	–	–	–	+	–	
Каталазна активність		–	–	–	–	+	+	
Термостабільна каталаза		–	–	–	–	+	+	
Ріст на середовищі з натрієм саліциловокислим, мг/см ³ :								
		0,5	–	+	+	+	+	+
		1,0	–	–	–	–	+	+
Ріст за t °С	22	–	–	–	–	+	+	
	37	+	+	+	+	+	+	
	45	–	–	–	–	+	+	

* (+) – позитивний результат; (–) – негативний.

Сенсibiliзувальні властивості та патогенність досліджуваних мікобактерій визначали традиційним методом за результатами біологічної проби на морських свинках, кролях та курях.

Повільнорослий штам стимулював підвищену чутливість сповільненого типу й викликав загибель морських свинок на 32–39 добу зараження (табл. 11).

Тварини, заражені швидкорослими штамами *M. bovis*, реагували на введення туберкулін на 20 та 30 добу і загинули на 34–40 добу дослідження.

У морських свинок, заражених повільнорослим та швидкорослими штамами *M. bovis*, спостерігали схуднення та в ділянці введення матеріалу утворення виразки, збільшення та ущільнення регіональних до місця ін'єкції за-вису мікобактерій лімфатичних вузлів.

У дослідних тварин, заражених штамами атипових мікобактерій, виявлено алергічні реакції, але загибелі їх не зареєстровано – евтаназовано наприкінці досліду.

У всіх загиблих морських свинок на розтині виявили явно виражені зміни, властиві туберкульозу: спостерігалася гіпертрофія печінки, селезінки, лімфатичних вузлів (табл. 12).

II. Сенсифілізувальні та патогенні властивості мікобактерій*

Штам	Кількість заражених морських свинок	Алергічне дослідження, доба		Загинуло тварин	Строки загибелі	Забито по закінченні досліду	Туберкульозні зміни	
		20	30				+	-
Повільнорослий <i>M. bovis</i>	2	-	+	2	32-39	-	2	-
Швидкорослі <i>M. bovis</i>	2	+	+	2	36-38	-	2	-
	2	+	+	2	34-39	-	2	-
	2	+	+	2	39-40	-	2	-
Атипові: з молока (АТ-1) лімфатичних вузлів (АТ-2)	2	+	-	-	-	2	-	2
	2	+	+	-	-	2	-	2

* (+) – позитивний результат; (-) – негативний.

Крім того, в селезінці виявляли різну кількість напівпрозорих вузликів, а у тварин, заражених швидкорослими штамми, у регіональних лімфатичних вузлах – казеозний некроз. Протягом досліду в піддослідній тварини № 22, зараженої повільнорослим штамом *M. bovis*, спостерігалися хрипи і після загибелі в легенях виявлено поодинокі міліарні вузлики.

У тварин, заражених штамми атипових мікобактерій, макроскопічних патолого-анатомічних змін не виявлено.

Індекс ураження був максимальним у морських свинок № 23 та 24, № 27 та 28, заражених швидкорослими штамми *M. bovis*, що обумовлено більш значним та інтенсивнішим розвитком інфекційного процесу туберкульозу у згаданих тварин.

Із патологічного матеріалу (приготовленої суспензії) експериментально заражених морських свинок виявлено на щільному яєчному середовищі ріст швидкорослих штамів *M. bovis* на 7-у добу, а повільнорослого – на 14 добу інкубації. У другій та наступних генераціях на живильному середовищі швидкорослі штамми *M. bovis* формували колонії на 2-у добу, а мікобактерії повільнорослого штаму – на 8-14 добу культивування.

Заражені кролі швидкорослими штамми *M. bovis* загинули на 27-35 добу від початку досліду, а заражені повільнорослим штамом *M. bovis* – на 29 та 31 добу. За патолого-анатомічного розтину загиблих тварин було виявлено туберкульозні зміни, характерні для генералізованої форми перебігу: у легенях відмічалися вогнища різної величини, некротичні ураження нирок, збільшення печінки та селезінки, але без видимих вогнищ.

Патолого-анатомічний розтин курей через 120 діб досліду властивих туберкульозних змін не виявив.

12. Результати патолого-анатомічного дослідження морських свинок*

Штам	№ тварини	Специфічні ураження				Індекс ураження
		лімф. вузли	селе-зінка	печінка	легені	
Повільно-рослий <i>M. bovis</i>	21	++	+++	–	+++	20
	22	++	++	–	++	14
Швидкорослі <i>M. bovis</i>	23	++	+++	–	+++	20
	24	++	++	–	+++	18
	25	++	++	–	++	14
	26	++	++	–	+++	18
	27	++	+++	–	+++	20
	28	++	++	–	+++	18
Атипові мікобактерії: з молока (АТ-1) з лімфатичних вузлів (АТ-2)	29	–	–	–	–	–
	30	–	–	–	–	–
	31	–	–	–	–	–
	32	–	–	–	–	–

* (+) – поодинокі вузлики; (++) – декілька вузликів; (+++) – численні вузлики.

Водночас швидкорослий вихідний штам *M. bovis*, про що автором роботи повідомлено у 2007 році, значно змінюється і під впливом чинників макроорганізму. Так, за проведення десяти прямих пасажів через організм морських свинок встановлено поступове скорочення тривалості інфекційного процесу до п'ятого пасажу, а в наступних – подовження і вже на восьмому, дев'ятому та десятому не виявлено видимих патолого-анатомічних змін, властивих туберкульозу, хоча стан алергії збудник стимулював.

Отже, досліджені далеко не всі властивості швидкорослого штаму *M. bovis* можуть свідчити про спонтанну генетичну трансформацію штаму на якомусь відрізку часу, що звелось до передачі нащадкових ознак у формі підвищеного синтезу ростових факторів, зміни системи синтезу необхідних для росту вітамінів і речовин. Це в свою чергу, можливо, змінило антигенні й деякі інші властивості збудника: розширило ареал виживання, з набуттям властивостей сапрофітизму, підвищило стійкість до факторів довкілля, внутрішнього середовища тварин та людини, лікарських речовин й ін. Напевне, змінений генотип збудника посилює та активізує патогенну й вірулентну здатність, що, власне, в загальному ми і виявляли, досліджуючи морських свинок, заражених швидкорослим штамом *M. bovis*. Дещо коротші строки загибелі тварин, на наш погляд, можуть бути зумовлені й більш значним та інтенсивним накопиченням мікроорганізму. Це в сукупності, очевидно більше всього за рахунок останнього, обумовлює більш високу вірулентність швидкорослого штаму (морські свинки та кролі) порівняно з тією, яка притаманна повільнорослим епізоотичним та референтним штамам *M. bovis*. Водночас нащадково передана ознака

швидкого поділу мікобактерій може стосуватися тільки цієї властивості: однієї молекули ДНК, яка регулює активність конкретного гена мікобактерій.

Це з однієї сторони. А з іншої, ми не виключаємо можливість еволюційної зміни генотипу, з набуттям патогенних властивостей у деяких мікобактерій, які, за класифікацією Раніона, відносяться до IV групи. Ця гіпотеза, можливо, більш ймовірна, ніж попередня, оскільки існує багато повідомлень які утверджують, що швидкорослі атипіві мікобактерії можуть бути причиною важко перебігаючих мікобактеріозів у людини та стимулювати інфекційний процес у свиней та великої рогатої худоби з явними патолого-анатомічними змінами, які притаманні туберкульозу. Між тим обидві гіпотези високоймовірні тому, що посилення або зниження вірулентності у того чи іншого штаму спостерігається практично у всіх мікроорганізмів, які викликають інші інфекції, за пасажів, через макроорганізм, штучні живильні середовища з оптимальним чи неоптимальним вмістом живильних речовин. Останні експериментальні дослідження В.П. Романенка й інших дослідників свідчать про те, що це спостерігається і з патогенними мікобактеріями різних видів.

Певною мірою це зазначають і фундаментальні дослідження ДНК мікобактерій бичачого виду, виділених від великої рогатої худоби та кіз. Так, аналізом 129 ізолятів збудника встановлено, що у 47,4 % штамів від великої рогатої худоби виявлено наявність численних копій елемента влаштування 186 110 (від 2 до 13), 100 % ізолятів мікобактерій від кіз вміщували багато копій 186 110, а за реструкційного і фінгерпринтного аналізів у них виявлено загальні фрагменти в 2,0; 1,7; 1,4 і 1,3 тисячі пар нуклеотидів.

Можливо швидке розмноження дослідженого особливого штаму мікобактерій в середовищі головного хазяїна зумовлює гострий перебіг інфекційного процесу туберкульозу (гостра форма хвороби) й появу, як наслідок, у стадах анергічних з генералізованою формою туберкульозу тварин, який описаний у виданнях спеціальної літератури, а може, саме такі штами збудника передшкіджають оздоровленню господарств шляхом проведення систематичних, причому своєчасних та якісних, алергічних досліджень скомпрометованого відносно туберкульозу поголів'я, що безумовно може обґрунтувати потребу перегляду методів оздоровлення господарств.

Відповіді на ці та інші запитання, які, без сумніву, виникнуть у дослідників, можуть дати подальші більш поглиблені та всебічні дослідження швидкорослого штаму, який ми за цими, наведених вище, результатами визначаємо як *M. bovis*.

Отже, персистенція в організмі тварин, зокрема великої рогатої худоби, особливого швидкорослого штаму *M. bovis*, безперечно, може визначити напруженість епізоотичної ситуації, яка принципово, в цілому, не залежатиме від проведення традиційних спеціальних ветеринарно-санітарних та загальних організаційно-господарських заходів, у тому чи іншому неблагополучному щодо туберкульозу господарстві.

Таким чином, уперше виявлено та ідентифіковано, з вивченням деяких головних властивостей, високовірулентний швидкорослий епізоотичний штам *M. bovis*, який формує колонії на середовищі Левенштейна-Йенсена на другу добу інкубації.

Наявність в природі швидкорослих штамів *M. bovis* дещо змінює уяву й доповнює погляди на проблему туберкульозу взагалі, обґрунтовує необхідність подальших, більш поглиблених, розширених досліджень біології збудника та, можливо, внесення необхідних змін до системи профілактики й боротьби з туберкульозом.

2.2.3. Частота ізоляції колоній та швидкість росту *M. bovis* епізоотичних штамів

Аналіз літературних даних засвідчив (Гутира Ф. і Марек И., 1922), що не тільки в часи Р. Коха велася дискусія стосовно виду мікобактерій. Упродовж наступних десятиліть вченими повідомлялося про мінливість мікобактерій. Такі дослідження не завершилися й дотепер.

Водночас спеціалізація та концентрація великої рогатої худоби на обмежених територіях, без урахування епізоотичної ситуації в господарствах-постачальниках тварин, розпочата в 70-х роках минулого століття, спрямована на формування нових довготривалих у часі (іноді до 10 і більше років) епізоотичних вогнищ туберкульозу, що вплинуло на біологію мікобактерій. Цьому були штучно створені унікальні можливості: взаємодія в замкненому середовищі мікро- та макроорганізмів за численних пасажів різного ступеня вірулентності збудника протягом років через організм тварини з високою чи низькою природною резистентністю, нестерильним, спонтанно набутим імунітетом. Це, безперечно, може призводити до виникнення нових рас мікобактерій з відмінними властивостями (Ткаченко О.А., 2004).

Різноманітність форм збудників інфекційних захворювань, у тому числі й мікобактерій туберкульозу, на які вказують автори (Klieneberger E., 1935; Dines L., 1939; Космодамянський В.Н., 1950; Александров Ю.А., 1980; Федосеев В.С., 1983; Асташова В.А. і Кадочкин А.М., 1989; Власенко В.В. й співавт., 2007) гуманної та ветеринарної медицини попередніх десятиліть, свідчить про поліморфізм збудника хвороби. Проте етіологічне значення тієї чи іншої форми й варіантів швидкорослих мікобактерій, за винятком типової повільнорослої кислотостійкої палички, не вивчено. А саме: кислотостійкі – коки, булавоподібні, елементарні тільця, ультрадрібні форми; некислотостійкі – палички, булавоподібні, зерна, ниткоподібні та L-форми. Водночас, незважаючи на встановлення факта існування відмінних від традиційних діагностичних форм збудника, й дотепер невідомі та остаточно нез'ясовані фактори, які спричиняють їх появу, значення в інфекційному й епізоотичному процесах. Тому подальше вивчення цієї проблеми з використанням новітніх методологічних підходів сприятиме більш широкому розумінню механізмів взаємовідносин мікро- та макроорганізмів, підвищенню ефективності профілактичних та оздоровчих протитуберкульозних заходів. Разом з цим мінливість мікобактерій, як і інших мікроорганізмів, необхідно розглядати не тільки під кутом зміни морфології, бо це тільки одна сторона питання. Зміна зовнішніх контурів мікобактерій – це вже результат поглиблених змін функціонування гене-

тичного коду, який під впливом чинників довкілля та еволюційно передбачених механізмів (швидше за все) змінює активність синтетазних систем, що супроводжуються глибокими змінами біології мікобактерій. Тому, досліджуючи питання мінливості мікобактерій, нами максимально широко й глибоко в динаміці численних пересівів досліджено на цьому тлі й біологічний цикл розвитку мікобактерій з одночасним з'ясуванням культуральних, тинкторіальних й інших властивостей, кількості й якості ліпідів та імуногенної активності.

Саме це і багато іншого визначило обґрунтованість подальших бактеріологічних досліджень патолого-анатомічно незміненого біологічного матеріалу, відібраного від дослідних тварин, та вивчення у виділених мікобактерій морфологічних ознак, культуральних, тинкторіальних й інших біологічних властивостей.

З цією метою досліджено 13 проб біологічного матеріалу, без макроскопічних туберкульозних уражень, від реагуючої на ППД-туберкулін для ссавців великої рогатої худоби та проведено 10 пасажів виділених культур мікобактерій через штучне щільне живильне середовище Левенштейна-Йенсена з різними значеннями рН.

Сенсibiliзувальні властивості, ступінь вірулентності *M. bovis* першої та наступних генерацій кожного пасажованого варіанта визначали, заражаючи традиційним методом двох морських свинок, масою тіла 250–300 г, зависом мікобактерій виділених культур (1 мг/см³ фізіологічного розчину). Сенсibiliзувальну здатність та ступінь вірулентності мікобактерій оцінювали за традиційними у ветеринарній медицині методами.

Поліморфізм та мінливість досліджували у пасажованих *M. bovis* швидко- та повільнорослих музейних та епізоотичних штамів з використанням стандартного щільного яєчного середовища (ДП “Ветеринарна медицина” м. Харків) з рН 7,1–7,2 та такого з підвищеним вмістом кислотних грамеквівалентів – 6,5 та 6,7. Зниження рівня рН здійснювали шляхом внесення в живильне середовище соляної кислоти перед його згортанням.

Завис мікобактерій, приготовлена в розрахунку 1 мг/см³ фізіологічного розчину в динаміці пасажів, висівали на те саме середовище по дві бактеріологічні петлі кожної із шести пробірок трьох варіантів досліду за традиційною у ветеринарній медицині методикою. Ріст колоній мікобактерій оцінювали перші сім діб щодня, а в наступному – один раз на тиждень.

Вивчали форму колоній, морфологічні ознаки, тинкторіальні й інші властивості мікобактерій. Для оцінки останніх використали метод фарбування за Ціль-Нільсеном.

З метою виключення помилок чистоти досліджень, у випадках встановлення у пасажованих мікобактерій змінених форм, попередню генерацію мікобактерій, до встановлення змінених форм, ділили на дві частини і одну вбивали (кіп'ятіння 30 хв) й висівали, витримуючи ту саму техніку і прийоми, в одних умовах, як і іншу, невбиту.

Лабораторне дослідження 13-ти проб біологічного матеріалу реагуючої на ППД-туберкулін для ссавців великої рогатої худоби тривало неблагополучно-

го щодо туберкульозу господарства виявило, за культуральним та біологічним методами (табл. 13), позитивний результат у восьми (61,53 %).

Використання нумерації проб біологічного матеріалу від великої рогатої худоби, реагуючої на ППД-туберкулін для ссавців, без патолого-анатомічних туберкульозних змін, у формі порядкових обумовлено відсутністю, у переважної більшості молодих тварин, індивідуальних номерів.

При цьому на живильному середовищі колонії мікобактерій виявлені у семи (53,85 %) із 13 досліджених проб. В дослідженій пробі № 10/5677, хоча й не відмічено росту культури *M. bovis*, проте біологічні дослідження на морських свинках підтвердили наявність збудника туберкульозу: дослідні тварини загинули від генералізованої форми туберкульозу на 43 добу з часу інокуляції суспензії матеріалу (одна свинка на 38, друга – на 48 добу). Отже, позитивний результат одержано в 61,53 % досліджених проб біологічного матеріалу, відібраного від великої рогатої худоби, реагуючої на ППД-туберкулін для ссавців, тривало неблагополучного щодо туберкульозу господарства.

**13. Частота ізоляції колоній та вірулентність *M. bovis*,
виділених від різновікової великої рогатої худоби
тривало неблагополучного господарства***

№ проби/ інв. № тварини	Вік тварини	Крововиливи, гіперемія	Ізоляція колоній <i>M. bovis</i> з біологічного матеріалу	Початок росту, доба	Реакція на тубер- кулін у морських свинок	Виразка в ділянці введення суспензії	Загибель морських свинок від туберкульозу, доба
1/-	1 міс.	+	+	24	+	-	35 і 55
2/-	6–7 міс.	+	+	12	+	+	38 і 44
3/-	8–9 міс.	+	+	15	-	-	36 і 38
4/-	18–19 міс.	+	+	21	-	+	30 і 50
5/-	20–21 міс.	+	+	30	+	-	33 і 47
6/-	20–21 міс.	-	-	-	-	-	-
7/5889	22–23 міс.	-	-	-	-	-	-
8/0260	22–23 міс.	+	+	20	-	+	39 і 41
9/“Мідна”	4 р., корова	-	-	-	-	-	-
10/5677	5 р., корова	-	-	-	+	-	38 і 49
11/5827	5 р., корова	-	-	-	-	-	-
12/0084	4 р., корова	+	+	24	+	+	35 і 35
13/“Ізаура”	5 р., корова	-	-	-	-	-	-
Разом		7	7	-	5	4	16

* (+) – позитивний; (-) – негативний результат.

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

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

Одержані дані показали, що за швидкістю формування, формою колоній першої генерації та морфологічними ознаками досліджувані мікобактерії не відрізняються від описаних представників *M. bovis* патогенних штамів. За ступенем вірулентності виділені штами *M. bovis* віднесені до високого, оскільки морські свинки, реагуючи на туберкулін, загинули від генералізованої форми туберкульозу після інокуляції суспензії біологічного матеріалу на 35–55 добу.

Водночас звертає на себе увагу той факт, що з восьми проб біологічного матеріалу тварин до 23-місячного віку позитивний результат лабораторних досліджень одержано у шести (85,0 %) випадках, того часу як з біологічного матеріалу п'яти корів тільки – у двох (40,0 %) пробах: в одній пробі за позитивного результату культурального та біологічного дослідження і в одній – тільки за біологічними дослідженнями на морських свинках.

Ці дані підтверджують досить масове та інтенсивне зараження молодняку з перших днів життя збудником туберкульозу.

Підкреслимо, в усіх випадках дослідженого біологічного матеріалу з гіперемією та крапельними крововиливами одержано позитивний результат, що свідчить, можливо, про ранню стадію формування первинного туберкульозного вогнища, яка супроводжується розвитком на першому етапі запальних неспецифічних захисних реакцій макроорганізму. Низька частота таких процесів у лімфатичних вузлах корів (всього в однієї), напевно, визначила й таку частоту позитивних результатів лабораторних досліджень (у двох пробах із п'яти досліджених).

Швидкість формування колоній *M. bovis* на штучному живильному середовищі з рН 7,1–7,2 досить різна: 12–30 доба, при цьому тільки три (42,85 %) культури мікобактерій виростили до 20-ї доби дослідження. Це свідчить про різну потенціальну здатність мікобактерій розмножуватися на штучному живильному середовищі.

Алергічні дослідження ППД-туберкуліном для ссавців на 30-ту добу після інокуляції суспензії біологічного матеріалу виявили у морських свинок позитивну реакцію у п'яти (62,5 %) пробах із восьми. Виразка в ділянці інокуляції матеріала спостерігалася тільки у морських свинок чотирьох (50,0 %) проб.

З метою одержання для подальших досліджень культури збудника туберкульозу з проби біологічного матеріалу корови за № 10/5677 провели висів підготовленої з внутрішніх органів морських свинок, які загинули від тубер-

кульозу, суспензії на живильне середовище. У результаті на 29 добу культивування виявлено ріст у двох із шести пробірок поодиноких сіро-жовтих колоній.

Отже, дослідженнями встановлено високу частоту персистенції мікобактерій бичачого виду в організмі реагуючих на ППД-туберкулін для ссавців тварин (61,53 %), без макроскопічних туберкульозних уражень. До того ж вони, *M. bovis*, володіють, як свідчать дослідження, різною потенціальною здатністю розмножуватися на штучному живильному середовищі та стимулювати розвиток алергії і утворення виразок у дослідних морських свинок у ділянці інокуляції мікобактерій.

2.2.4. Вивчення швидкості формування колоній *M. bovis* епізоотичних штамів 2–10-ї генерацій на щільному яєчному середовищі з рН 6,5 та 7,1–7,2

Для виконання подальших дослідів виділені *M. bovis* з біологічного матеріалу великої рогатої худоби пасажували через щільне яєчне живильне середовище з рН 6,5 та 7,1–7,2 (перше готували в умовах лабораторії за традиційним прописом), досліджували морфологічні ознаки, тинкторіальні властивості мікобактерій та культури, які вони стимулювали. Вибірково досліджували ступінь вірулентності мікобактерій окремих пасажованих штамів.

Необхідність використання середовища з рН 6,5 обґрунтовано нашими дослідженнями попередніх років як таке, що більш ефективне, ніж середовище з рН 7,1–7,2 (Ткаченко О. А., 1998).

Так, із 5-ти проб (з туберкульозними ураженнями) біологічного матеріалу від реагуючих на ППД-туберкулін для ссавців корів неблагополучного щодо туберкульозу пункту позитивний результат на дослідному середовищі (рН 6,5) одержано в 5-ти (100 %), а на контрольному (рН 7,3) у 2-х (40 %) пробах, що в 2,5 раза менше, ніж на дослідному.

Аргументовано це підтверджується і кількістю колоній, які максимально сформувалися через 65 діб. На контрольному виявлено 17, а на вдосконаленому, дослідному, 30 колоній мікобактерій бичачого виду, що в 1,8 раза більше, ніж у першому випадку. І якщо ці загальні показники не досить показові, то за кількістю колоній, за ступенем репродукції мікобактерій у розрахунку на одну пробу на дослідному середовищі сформувалося в 4,2 раза більше, ніж на контрольному.

На 70-ту добу культивування колонії, в основному на дослідному середовищі, досягли максимальної величини (діаметр 1–3 мм і більше). В окремих пробірках вони зливалися і набували вигляду суцільного росту шорсткого блискучого наліту.

Із 25 пробірок досліджуваного зразка живильного середовища ріст колоній виявлено в 12 (48 %), з них суцільний ріст – у 7 (58,33 %).

Із такої ж кількості зразків контрольного живильного середовища ріст колоній, виявлено в 4-х (16 %) пробірках, а суцільний ріст – у 2-х (50 %).

Про подібні результати свідчать і дослідження швидкості формування колоній *M. bovis* епізоотичних штамів другої–десятої генерацій на щільному яечному середовищі з рН 6,5 та 7,1–7,2.

Дослідження засвідчили, що *M. bovis* епізоотичних штамів у другій та наступних генераціях проявляють різну інтенсивність розмноження й відповідно формування колоній (табл. 14).

З досліджених *M. bovis* восьми штамів (восьмий штам *M. bovis* виділено з біологічного матеріалу морських свинок, які загинули після інокуляції суспензії біологічного матеріалу корови за порядковим та інвентарним номером 10/5677: – табл. 13) три (37,5%) зі збільшенням кількості пасажів, стабільно формували колонії на 2–7-у добу після висіву на середовище завису мікобактерій (8504; 196; 231). Мікобактерії іншої частини штамів традиційно залишалися повільнорослими. Водночас з другої генерації мікобактерій протягом наступних дев'яти пасажів колонії формувалися на середовищі з рН 6,5 у 1,2 раза швидше, ніж на середовищі з рН 7,1–7,2. Це свідчить про повільніше розмноження досліджуваних мікобактерій на середовищі, яке вміщує менше кислотних грам-еквівалентів. Відповідна тенденція розмноження мікроорганізмів спостерігалася і по кожній пробі, незалежно від того, чи пришвидшувався ріст колоній в динаміці пасажів, чи ні.

14. Швидкість формування колоній *M. bovis* епізоотичних штамів, доба*

№ п/п	Штам, №	Пасаж (генерація)										У середньому
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
		доба										
1	1073	$\frac{9}{9}$	$\frac{20}{20}$	$\frac{13}{13}$	$\frac{7}{12}$	$\frac{12}{14}$	$\frac{13}{13}$	$\frac{14}{14}$	$\frac{14}{14}$	$\frac{15}{16}$	$\frac{13}{14}$	$\frac{13}{13,9}$
2	1001	$\frac{16}{16}$	$\frac{4}{7}$	$\frac{23}{25}$	$\frac{15}{13}$	$\frac{16}{15}$	$\frac{15}{17}$	$\frac{14}{16}$	$\frac{14}{17}$	$\frac{13}{14}$	$\frac{14}{17}$	$\frac{14,4}{15,7}$
3	9373	$\frac{9}{10}$	$\frac{3}{7}$	$\frac{5}{9}$	$\frac{5}{6}$	$\frac{4}{9}$	$\frac{7}{10}$	$\frac{7}{7}$	$\frac{16}{35}$	$\frac{13}{26}$	$\frac{14}{26}$	$\frac{8,3}{14,5}$
4	8504	$\frac{9}{10}$	$\frac{7}{7}$	$\frac{3}{6}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{3}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{7}$	$\frac{5}{33}$	$\frac{5}{25}$	$\frac{5,2}{10,9}$
5	196	$\frac{19}{19}$	$\frac{10}{10}$	$\frac{8}{9}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{10}$	$\frac{5}{6}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{5}{5}$	$\frac{7,2}{7,9}$
6	1069	$\frac{8}{8}$	$\frac{9}{11}$	$\frac{6}{6}$	$\frac{7}{8}$	$\frac{7}{9}$	$\frac{8}{10}$	$\frac{9}{9}$	$\frac{8}{8}$	$\frac{9}{9}$	$\frac{10}{10}$	$\frac{8,1}{8,8}$
7	1113	$\frac{11}{12}$	$\frac{10}{11}$	$\frac{9}{10}$	$\frac{9}{10}$	$\frac{12}{11}$	$\frac{9}{9}$	$\frac{6}{7}$	$\frac{6}{6}$	$\frac{6}{7}$	$\frac{6}{7}$	$\frac{8,4}{9,0}$
8	231	$\frac{10}{11}$	$\frac{7}{8}$	$\frac{5}{6}$	$\frac{3}{5}$	$\frac{2}{4}$	$\frac{3}{4}$	$\frac{2}{3}$	$\frac{2}{2}$	$\frac{2}{2}$	$\frac{2}{2}$	$\frac{3,8}{4,7}$

* рН середовища: чисельник – 6,5; знаменник – 7,1–7,2.

Одержані дані збігаються з нашими повідомленнями (Ткаченко О.А., 1997; 1998) експериментальних досліджень та інших авторів попередніх років про більш активнішу адаптцію мікобактерії відносно щільного яєчного середовища з рН 6,5.

Отже, за пасажів *M. bovis* епізоотичних штамів на штучному живильному середовищі одні з них підвищують обмін речовин, а отже, і розмноження та накопичення, інші – ні, зберігають попередню інтенсивність обміну речовин. Це узгоджується з результатами наших досліджень, проведених ще у 2004 році, якими засвідчено наявність в біологічному світі *M. bovis* швидко- та повільнорослих штамів. Вочевидь, співвідношення та частота персистенції й циркуляції таких мікобактерій бичачого виду можуть бути різними в тому чи іншому стадії тварин та суттєво впливати на інтенсивність й тривалість перебігу інфекційного та епізоотичного процесів.

Характер росту, форма (S) колоній, в динаміці пересівів, в цілому були незмінними. Проте в субкультурі восьмого пересіву мікобактерій окремих штамів (№ 196), на середовищах з рН 6,5 та 7,1–7,2 відмічено дещо іншу властивість колоній: надто інтенсивний горбкуватоподібний ріст (R-форма) – *рис. 17,а,б*.

Провівши мікроскопію мікобактерій колоній восьмої генерації усіх 16 варіантів штамів, культивованих на середовищах з різним рН, виявлено, що морфологічні ознаки й тинкторіальні властивості *M. bovis* практично не відрізнялися від вихідних, за винятком мікобактерій, що пасажувалися через середовище як з рН 6,5, так і 7,1–7,2 штаму № 196 (субкультура восьмого пересіву), який відмінний формою й інтенсивністю колоній від усіх інших. А саме. У полі зору мікроскопа на тлі традиційних за морфологічними ознаками й тинкторіальними властивостями мікобактерій виявлені товсті (близько 1 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 форми мікобактерій (*рис. 17,б*).

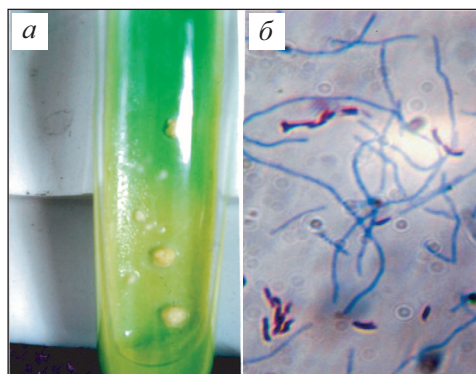


Рис. 17. M. bovis: а - R-форма колоній; б – кислото- та некислотостійкі форми першої генерації (штам № 196) × 1500

Подальші пересіви на середовище мікобактерій штаму № 196, дев'ятий та десятий пасажі, супроводжувалися різким зменшенням кількості колоній, аж до повного їх зникнення, і макроскопічний ріст колоній проявлявся у вигляді “нальоту”, “димки”, з переважанням виявлених у полі зору мікроскопа некислотостійких паличко- та ниткоподібних форм збудника.

Того ж часу, мікроскопією мікобактерій усіх попередніх пересівів встановлено, що поодинокі, ледь помітні некислотостійкі па-

личко- та ниткоподібні, з нечіткою зернистістю форми рееструвалися ще з першої генерації, тобто після висіву суспензії, приготовленої з лімфатичних вузлів реагуючої на ППД-туберкулін для ссавців великої рогатої худоби.

Одержавши результати пасажів штамів мікобактерій, оцінивши їх морфологічні форми, виділені від різновікового поголів'я великої рогатої худоби, і зокрема штаму № 196, обґрунтованими виявилися дослідження ступеня вірулентності некіслотостійких варіантів. Проте дослідження вірулентності мікобактерій на цьому етапі тільки некіслотостійких форм стало неможливим, так як ріст культури проявлявся у вигляді “нальоту”, “димки” й не було можливості накопичити для зараження морських свинок достатню кількість біологічної маси збудника.

Однак враховуючи поступовість зниження за пересівів вірулентності у будь-якого мікроорганізму, в тому числі й у мікобактерій, нами проведено дослідження цієї властивості у таких (кіслотостійких) мікобактерій за один пасаж до появи різних форм збудника в культурі, сьомого пересіву. Разом з цим не виключаємо наявність в такій культурі й некіслотостійких мікобактерій.

Результати, які одержані на морських свинках (зараження зависом мікобактерій – 1 мг/см³ фізіологічного розчину), засвідчили, що мікобактерії, які знімали як із середовища з рН 6,5, так і 7,1–7,2, стимулювали генералізований туберкульоз у дослідних тварин та їх загибель в проміжку між 35 і 50-ю добою. Ці дані, підтверджуючи вихідну вірулентність у пасажованих сім разів мікобактерій, можуть свідчити про збереження ними цієї властивості до появи некіслотостійких форм збудника. Хоча стверджувати в цілому про мікобактерії й стимульовану ними культуру, яка пересівалася сім разів, що вони знизили або підвищили вірулентність, напевно, не досить обґрунтовано, оскільки в будь-якій культурі мікроорганізму, в тому числі й мікобактерій, є особини (клітини), які залежно від факторів довкілля змінюють або не змінюють свої властивості.

Некіслотостійкі мікобактерії спостерігали й інші дослідники (Космодаміанський В.Н., 1950; Вейсфелер Ю.К., 1975; Кочемасова З.Н. та співавт., 1980). Вони, досліджуючи патологічний матеріал людей, хворих на туберкульоз, в організмі яких збудник тривало розмножувався на тлі значного впливу туберкулостатичних препаратів та факторів захисту імунологічної системи макроорганізму (що може призвести до появи нових форм збудника з ймовірно втраченою кіслотостійкістю), виділяли поліморфні некіслотостійкі збудники туберкульозу.

У наших дослідях, в яких проведено 10 пересівів, включаючи висів суспензії, приготовленої з біологічного матеріалу, таких негативних факторів, які б настільки зумовили зміну форми мікобактерій й кіслотостійкості, не могло бути. Тому це може свідчити про маловідому до цього часу, можливо, адаптивну здатність збудника, яка набувалася окремими представниками цього виду мікобактерій протягом численних пасажів через організм тварин або за персистенції в макроорганізмі. Напевно, це так, оскільки еталонні та референтні штами, які, численно пасажуючись через різні макроорганізми та

живильні середовища протягом десятиліть, не змінюються, зокрема за здатністю утримувати фарбу після дії кислоти. Це, вірогідно, зумовлено більш стабільними генетичними задатками мікобактерій першої половини минулого століття, коли згадані мікроорганізми були виділені та вивчені.

Можливо, поява нових форм мікобактерій із втраченою кислотостійкістю зумовлена біологічною суттю тільки окремих варіантів виду мікобактерій, їх здатністю виживати в макроорганізмі та зовнішньому середовищі. Незважаючи на досить ранні повідомлення про не кислотостійкі мікобактерії до цього часу не з'ясовані такі, дуже важливі в епізоотологічному плані, їх властивості, як сенсibiliзувальна та реверсійна здатність, персистенція та імунологічна реакція на неї макроорганізму й деякі інші.

До того часу поки відомості про ці й інші властивості не кислотостійких мікобактерій не будуть з'ясованими, ефективність протитуберкульозних заходів залишатиметься на відомому теперішньому рівні.

Якщо буде доведено, що втрата кислотостійкості – це форма існування мікобактерій, яка їх позбавляє агресивності до середовища макроорганізму, то можна буде вважати кислотостійкість – здатність оболонки мікобактерій утримувати фарбу після дії кислоти – захисним фактором збудника, який він набуває за певних невіданих умов. Можливо, активно синтезуючи, накопичуючи й підтримуючи відповідний рівень біохімічних речовин оболонки, мікобактерії подразнюють клітини тканин макроорганізму, провокуючи інфекційний процес того чи іншого ступеня.

Враховуючи чітку закономірність зміни швидкості розмноження (формування колоній) мікобактерій окремих штамів виникла необхідність дослідження їх біологічних властивостей за численних пасажів через штучне щільне живильне середовище

2.2.5. Особливості адаптивної здатності та мінливість *M. bovis* швидкорослого штаму на штучному щільному середовищі за численних пасажів

Життєздатність мікобактерій на штучних живильних середовищах багато в чому визначається їх біохімічним складом і потенціальними можливостями, оскільки еволюційно сформовані та передані нащадкам генетичні властивості мікобактерій можуть під впливом різних факторів, в тому числі і гомеостазу тварини, дещо змінюватися (Космодамианский В.Н., 1950; Вейсфелер Ю.К., 1975; Федосеев В.С., 1983; Ткаченко О.А., 2004). Багаторазові пересіви мікобактерій через штучні середовища й численні пасажі через макроорганізм можуть, особливо за недостатньо чіткої збалансованості складових живильного середовища й високої активності захисних систем макроорганізму, призводити до зміни суттєвих ознак в популяції мікроба в разі появи нових властивостей, які відрізняються від вихідних. Відтворення цих явищ в експерименті наблизить розуміння епізоотичного процесу туберкульозу, пов'язаного з його тривалістю та повторними спалахами в окремих господарствах.

У зв'язку з цим звичайно виникає запитання: чому некислотостійкі мікобактерії з'явилися серед одного з восьми пасажованих штамів, хоча підвищена швидкість розмноження, яка, можливо, провокувала це явище, відмічена ще у мікроорганізмів двох штамів. Коли це пов'язано зі стадійністю розмноження мікобактерій, про яку свідчать деякі повідомлення, то, напевне, відповідний розвиток мікобактерій штаму № 196 за кількістю генерацій, який призводить до зміни стадій біологічного циклу розвитку, припав на пасажі наших досліджень.

Для підтвердження або спростування цієї думки проведені дослідження мікобактерій штамів № 1113 та 231. Перший в наших попередніх дослідженнях знаходився на межі швидкорослого (колонії формувалися в останніх 4-х генераціях на 6–7-у добу з часу висіву завису мікобактерій), другий – типовий представник швидкорослих (колонії формувалися впродовж останніх шести пересівів на 2–4-у добу).

Схема досліджень лишилася попередньою за винятком введення елемента пасажу штаму № 231 через середовище з рН 6,7 та тривалості й кількості пересівів.

Як засвідчили дослідження (табл. 15, рис. 18), мікобактерії штаму № 1113 протягом 60 пересівів змінили швидкість розмноження в бік сповільнення і

15. Швидкість формування колоній *M. bovis* на щільному середовищі за чисельних пересівів одно-тридобової культури, доба *

Пересів мікобактерій	№ штаму				
	1113		231		
	рН середовища				
	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	-«-	-«-	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	-«-	-«-	12,0	6,7	7,7
133–144	-«-	-«-	-«-	9,6	11,2
145–156	-«-	-«-	-«-	12,5	13,1
157–168	-«-	-«-	-«-	8,2	10,1
169–180	-«-	-«-	-«-	5,7	11,7

* -«- – не досліджували.

залишилися повільнорослими, того часу як у варіантів мікобактерій штаму № 231 протягом дослідів встановлені динамічні суттєві відмінності: на середовищі з рН 7,1–7,2 – зниження строків формування колоній з 19-го пасажу, що визначило їх у подальшому як повільнорослі; на середовищі з рН 6,7 та 6,5 – це явище виявлено тільки на 109–120 пересіві.

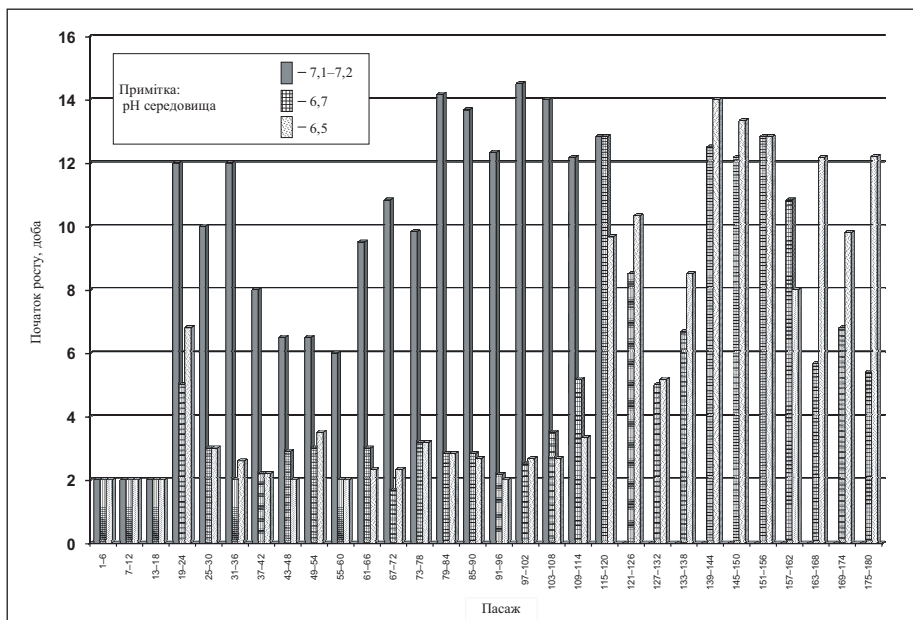


Рис. 18. Ріст колоній *M. bovis* за численних пасажів

Саме тому на останніх середовищах одержано 180 субкультур швидкорослого штаму, а на середовищі з рН 7,1–7,2 – тільки 122. Водночас, якщо морфологічні ознаки та культуральні властивості у *M. bovis* штаму № 1113 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, які залежали від умісту в середовищі кислотних грам-еквівалентів.

Насамперед, це стосується форми колоній й 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 “димчастого” (“наліт”), суцільного росту в останніх 20-ти генераціях по лінії посіву завису 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 пасажу, на середо-

вищі з рН 7,1–7,2 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 (табл. 16).

16. Вплив рН середовища на інтенсивність росту колоній мікобактерій за численних пересівів одно-тридобової культури*

Пасаж	Кількість колоній в пробірці на добу			
	7	14	21	28
1	2	3	4	5
1–6	$\frac{3,7}{5,5(5,75)}$	$\frac{5,25}{\text{с.р.}}$	$\frac{\text{с.р.}}{\text{с.р.}}$	$\frac{\text{с.р.}}{\text{с.р.}}$
7–12	$\frac{4,75}{5,75(6,0)}$	$\frac{6,75}{\text{с.р.}}$	$\frac{\text{с.р.}}{\text{с.р.}}$	$\frac{\text{с.р.}}{\text{с.р.}}$
13–18	$\frac{4,25}{5,5(5,0)}$	$\frac{8,5}{18,25(\text{с.р.})}$	$\frac{\text{с.р.}}{\text{с.р.}}$	$\frac{\text{с.р.}}{\text{с.р.}}$
19–24	$\frac{0,25}{5,25(3,75)}$	$\frac{5,25}{52,25(\text{с.р.})}$	$\frac{53,0}{\text{с.р.}}$	$\frac{83,0}{\text{с.р.}}$
25–30	$\frac{-}{10,25(7,5)}$	$\frac{0,5}{\text{с.р.}}$	$\frac{4,7}{\text{с.р.}}$	$\frac{\text{с.р.}}{\text{с.р.}}$
31–36	$\frac{-}{12,75(13,0)}$	$\frac{5,25}{\text{с.р.}}$	$\frac{63,25}{\text{с.р.}}$	$\frac{\text{с.р.}}{\text{с.р.}}$
37–42	$\frac{1,25}{19,25(10,25)}$	$\frac{14,0}{\text{с.р.}}$	$\frac{\text{с.р.}}{\text{с.р.}}$	$\frac{\text{с.р.}}{\text{с.р.}}$
43–48	$\frac{1,75}{9,0(15,0)}$	$\frac{43,0}{\text{с.р.}}$	$\frac{\text{с.р.}}{\text{с.р.}}$	$\frac{\text{с.р.}}{\text{с.р.}}$
49–54	$\frac{5,75}{16,5(14,5)}$	$\frac{26,25}{\text{с.р.}}$	$\frac{\text{с.р.}}{\text{с.р.}}$	$\frac{\text{с.р.}}{\text{с.р.}}$
55–60	$\frac{8,0}{12,5(13,25)}$	$\frac{46,5}{\text{с.р.}}$	$\frac{\text{с.р.}}{\text{с.р.}}$	$\frac{\text{с.р.}}{\text{с.р.}}$
61–66	$\frac{-}{10,5(13,75)}$	$\frac{6,25}{\text{с.р.}}$	$\frac{8,75}{\text{с.р.}}$	$\frac{20,5}{\text{с.р.}}$
67–72	$\frac{-}{31,0(30,0)}$	$\frac{6,25}{\text{с.р.}}$	$\frac{8,0}{\text{с.р.}}$	$\frac{10,5}{\text{с.р.}}$
73–78	$\frac{-}{10,5(12,0)}$	$\frac{2,25}{\text{с.р.}}$	$\frac{6,5}{\text{с.р.}}$	$\frac{13,7}{\text{с.р.}}$
79–84	$\frac{-}{12,5(9,6)}$	$\frac{4,5}{\text{с.р.}}$	$\frac{13,5}{\text{с.р.}}$	$\frac{\text{с.р.}}{\text{с.р.}}$
85–90	$\frac{-}{25,0(21,25)}$	$\frac{4,25}{\text{с.р.}}$	$\frac{7,0}{\text{с.р.}}$	$\frac{12,75}{\text{с.р.}}$

1	2	3	4	5
91–96	$\frac{-}{45,0(50,5)}$	$\frac{4,75}{\text{с.р.}}$	$\frac{12,25}{\text{с.р.}}$	$\frac{\text{с.р.}}{\text{с.р.}}$
97–102	$\frac{-}{61,0(57,0)}$	$\frac{7,25}{\text{с.р.}}$	$\frac{14,75}{\text{с.р.}}$	$\frac{\text{с.р.}}{\text{с.р.}}$
103–108	$\frac{-}{19,75(20,25)}$	$\frac{-}{\text{с.р.}}$	$\frac{4,5}{\text{с.р.}}$	$\frac{6,25}{\text{с.р.}}$
109–114	$\frac{-}{25,5(24,75)}$	$\frac{-}{\text{с.р.}}$	$\frac{6,25}{\text{с.р.}}$	$\frac{9,75}{\text{с.р.}}$
115–120	$\frac{-}{-}$	$\frac{1,0}{9,75(5,75)}$	$\frac{1,25}{\text{с.р.}(4,25)}$	$\frac{\text{с.р.}}{\text{с.р.}}$
121–126	$\frac{-}{-}$	$\frac{4}{8,0(9,0)}$	$\frac{6}{13,5(\text{с.р.})}$	$\frac{11}{\text{с.р.}}$
127–132	$\frac{-}{3,75(4,0)}$	$\frac{-}{12,5(14,5)}$	$\frac{-}{24(24)}$	$\frac{-}{\text{с.р.}}$
133–138	$\frac{-}{-(2,25)}$	$\frac{-}{6,5(9,5)}$	$\frac{-}{16,5(19,5)}$	$\frac{-}{\text{с.р.}}$
139–144	$\frac{-}{-}$	$\frac{-}{5,5(4,5)}$	$\frac{-}{\text{с.р.}(11,5)}$	$\frac{-}{\text{с.р.}}$
145–150	$\frac{-}{-}$	$\frac{-}{2,75(3,75)}$	$\frac{-}{\text{с.р.}}$	$\frac{-}{\text{с.р.}}$
151–156	$\frac{-}{-}$	$\frac{-}{2,0(3,5)}$	$\frac{-}{\text{с.р.}}$	$\frac{-}{\text{с.р.}}$
157–162	$\frac{-}{-}$	$\frac{-}{14,75(8,75)}$	$\frac{-}{\text{с.р.}}$	$\frac{-}{\text{с.р.}}$
163–168	$\frac{-}{-(7,0)}$	$\frac{-}{\text{с.р.}}$	$\frac{-}{\text{с.р.}}$	$\frac{-}{\text{с.р.}}$
169–174	$\frac{-}{\text{с.р.}}$	$\frac{-}{\text{с.р.}}$	$\frac{-}{\text{с.р.}}$	$\frac{-}{\text{с.р.}}$
175–180	$\frac{-}{\text{с.р.}}$	$\frac{-}{\text{с.р.}}$	$\frac{-}{\text{с.р.}}$	$\frac{-}{\text{с.р.}}$

* Чисельник – кількість колоній на Харківському середовищі;
знаменник – на середовищі “Нове” з рН 6,5 (рН 6,7);
с.р. – суцільний ріст культури.

Морфологічні ознаки та тинкторіальні властивості мікобактерій, залежно від середовища, змінювалися зі збільшенням кількості пересівів (табл. 17).

17. Конверсія *M. bovis* в некіслотостійкі форми *

рН середовища	Пасаж												
	...60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180
6,5	$\frac{-}{-}$	$\frac{-}{-}$	$\frac{-}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{\pm}{+}$	$\frac{\pm}{+}$
6,7	$\frac{-}{-}$	$\frac{-}{-}$	$\frac{-}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{\pm}{+}$	$\frac{\pm}{+}$
7,1–7,2	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{\pm}{+}$	$\frac{\pm}{+}$	Не досліджували				

* Чисельник – ледь помітні; знаменник – чітко сформовані мікобактерії.

Розпочинаючи з 90-ої генерації, у полі зору мікроскопа відмічалися товсті й тонкі, зернисті, короткі й довгі сегментовані палички червоного кольору та ледь помітні поодинокі ниткоподібні некіслотостійкі з нечіткою зернистістю форми (мазок приготовлено з колоній, які сформувалися

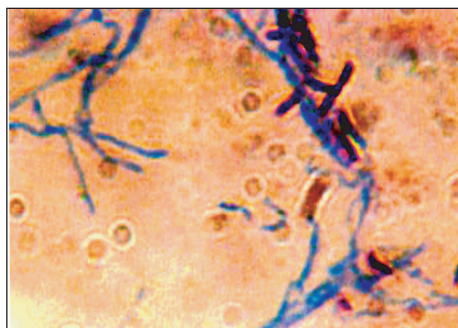


Рис. 19. M. bovis: кислототалі некіслотостійкі форми перших генерацій (штам № 231) × 1500

на середовищі з рН 6,5 та 6,7). Зі 145 пасажу з'явилися на тлі традиційних кислотостійких коротких й довгих (у 6–10 разів довші за традиційні), але з менш інтенсивніше зафарбованою оболонкою, ніж в умовах перших пересівів, форми мікобактерій.

В останніх генераціях, розпочинаючи зі 160, на середовищі з рН 6,7 почали з'являтися й поодинокі ниткоподібні кислотостійкі сегментовані, з великою кількістю зерен форми мікобактерій, але з менш інтенсивніше зафарбованою оболонкою, ніж в умовах перших пересівів.

Це може свідчити про зміну біохімічного складу клітинної оболонки.

Кількість некіслотостійких та інтенсивність їх забарвлення залишалися на попередньому рівні до 90-ої генерації.

M. bovis 168 генерації на середовищі з рН 6,7 стимулювали бурхливий, інтенсивний ріст R-колоній, подібних до штаму № 196, описаного на першому етапі досліджень.

Мікроскопія засвідчила кислотостійкі, різних розмірів, у тому числі й некіслотостійкі, з недосить чіткими контурами та нечітко вираженою зернистістю, форми збудника (*рис. 19*).

2.2.6. Строки появи некислотостійких мікобактерій та деякі особливості характеру формування колоній

На 169 генерації мікобактерій встановлено бурхливий, інтенсивний, горбуватоподібний ріст колоній. Приготувавши з колоній мазки та зафарбувавши їх за Ціль-Нільсеном, мікроскопічно виявлено як кислотостійкі, так і чітко сформовані некислотостійкі, різної форми й величини палички (сині й червоні мікроорганізми).

Необхідністю було встановлення співвідношення кількості некислото-стійких та кислотостійких мікобактерій. З цією метою приготували й дослідили мазок з колонії згаданої вище 169 генерації мікроорганізму. При цьому, підрахувавши 50 полів зору мікроскопа та провівши прості математичні розрахунки, виявлено 1023 некислотостійких і 105 кислотостійких клітини мікобактерій, тобто некислотостійкі мікобактерії ниткоподібної форми пре-валювали над кислотостійкими у співвідношенні 10:1.

Досліджуючи культури 170-ої і подальших генерацій, у полі зору мі-кроскопа також виявляли як кислотостійкі палички, так і некислотостійкі па-личко- та ниткоподібні форми мікобактерій.

Поява некислотостійких форм у популяції мікобактерій супроводжува-лася зміною зовнішнього вигляду, форми колоній та строків їх формування (табл. 18). Якщо до виникнення поліморфних форм кислотостійкі мікобак-терії формували на середовищі окремі колонії з подальшим суцільним ро-стом по лінії посіву, то мішані (кислото- та некислотостійкі) стимулювали “димчастий” ріст культури по лінії посіву й після затримки росту (з 109–120 по 157–168 пересів), проявляючи зі 169–180 пасажу майже попередню швид-кість розмноження (5–7 діб).

18. Ріст культури *M. bovis* за пасажів *

рН се-редо-вища	Пасаж												
	...60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180
6,5	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{\pm}{+}$	$\frac{-}{+}$
6,7	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{\pm}{+}$	$\frac{\pm}{+}$
7,1–7,2	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{+}{-}$	$\frac{\pm}{+}$	$\frac{+}{-}$	Не досліджували				
* Чисельник – колонії; знаменник – “димка”, “налім”.													

Практично ідентичні зміни зафіксовані й у *M. bovis* швидкорослого шта-му, який пасажувався через штучне живильне середовище з рН 6,5. Але чітка поява некислотостійких поліморфних мікобактерій відмічена на 176 пересіві, тобто на дев’ять пасажів пізніше, ніж на середовищі з рН 6,7.

На середовищі з рН 7,1–7,2 варіант швидкорослого штаму *M. bovis*, так само, як і два попередні з появою некислотостійких форм збудника, стимулю-

вав “димчасту” культуру (“наліт”) по лінії висіву завису. Проте чітка трансформація мікобактерій в некіслотостійкі форми відмічена на 122 пересіві, тобто набагато раніше, ніж у двох попередніх випадках з тенденцією деякого пришвидшення росту культури “наліту”.

Того ж часу на цьому середовищі поодинокі, нечітко сформовані некіслотостійкі форми мікобактерій, як і на інших двох, відмічалися в полі зору мікроскопа значно раніше до появи чітко сформованих конверсованих (трансформованих) форм (60-й пересів).

Між тим, згодом (через три–вісім тижнів після посіву завису субкультури кислото- та некіслотостійких мікобактерій) на середовищі всіх трьох варіантів натомість культури “нальоту”, “димки” з’являлися поодинокі сформовані колонії жовто-сірого кольору.

Паралельно зі зміною форми колоній, морфологічних ознак й тинкторіальних властивостей пасажованих мікобактерій на середовищі з різним рН змінювалася й вірулентність збудника. Більш виражені зміни відбувалися у мікобактерій, культивованих на середовищі з рН 6,5 та 6,7, оскільки вони не викликали загибелі морських свинок так, як інші, що були заражені *M. bovis*, й пасажувалися через середовище з рН 7,1–7,2, загинули від туберкульозу впродовж 50 та 70-ти діб (для досліду відібрали мікобактерії трьох варіантів 100-ї генерації).

2.2.7. Дослідження “чистоти” досліду та виділення чистого клона кислото- та некіслотостійких мікобактерій

Одержавши культуру мікобактерій, яка вміщувала як кислото-, так і некіслотостійкі форми, необхідно було спростувати або підтвердити можливість проникнення сторонніх мікробів у живильні середовища, подібні тим, які виділялися як некіслотостійкі форми. Для цього нами паралельно проведено дослід з культурою (рН середовища 6,7), яку було вбито нагріванням за температури 120 °С, провівши при цьому всі маніпуляції, які проводили з живою культурою. Дослідження з убитою культурою засвідчили, що посіви залишилися стерильними (табл. 19).

19. Результати перевірки „чистоти” досліду (на штучному щільному середовищі з рН 6,7)*

<i>M. bovis</i>	Культуральні дослідження, строки появи колоній, доба								
	2	4	6	8	10	12	14	16	...90
Живі	–	–	–	–	+	+	+	+	...+
Вбиті	–	–	–	–	–	–	–	–	...–

* (+) – ріст колоній; (–) – ріст відсутній.

Разом з цим для одержання чистої лінії, клона мікобактерій пересіви мікобактерій мішаної культури проводили послідовно з ізольованих початково сформованих колоній відповідно часу їх формування; всього проведено чотири пересіви (на тому самому середовищі з рН 6,7).

На останньому, четвертому, пересіві окремих колоній одержано клон: (1) кислотостійких, (2) некислотостійких і (3) кислото- та некислотостійких мікобактерій (рис. 20).

Отже, багаторазові пересіви мікобактерій супроводжуються появою в популяції мікроорганізмів, які відрізняються від вихідного виду, зокрема, за

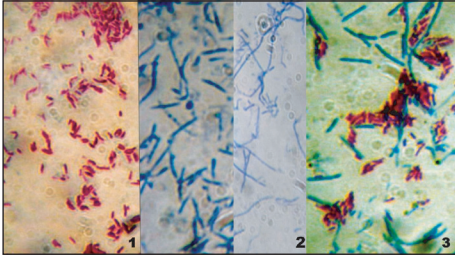


Рис. 20. Клон *M. bovis*: 1 – кислото-
стійкі; 2 – некислотостійкі; 3 – кислото-
та некислотостійкі форми
× 1500

зовнішнім виглядом колоній, морфологічними ознаками, тинкторіальними та вірулентними властивостями.

У той самий час зміни торкнулися не всієї популяції збудника штаму і його варіантів, культивованих на середовищі з трьома значеннями рН, а деяких особин, які дають початок змінам клонів в субкультурі з них, володіють тією чи іншою дисоціативною формою й властивістю: 1) мікобактерії, які продовжують клонувати кислото-

стійкі форми; 2) мікобактерії, які генерують як кислото-, так і некислотостійкі форми; 3) мікобактерії, які клонують тільки некислотостійкі форми.

2.2.8. Некислотостійкі ниткоподібні *M. bovis* та морфологічний аспект їх реверсії в бактеріальну кислотостійку форму

Багато десятиліть потому, коли бактерії були визначені як причина того чи іншого захворювання тварин чи людини, вони характеризувалися як морфологічно стабільні форми в класичному розумінні. Хоча за повідомленнями окремих авторів, зокрема В.Н. Космодамианського в 1950 році, вже на той період пізнання етіологічного фактора, за наявності тодішнього обладнання з'являлася інформація про існування відмінних від традиційних, інших форм мікроорганізмів. Водночас нові технології мікробіологічної діагностики відкрили й продовжують відкривати мікроорганізми, які постійно змінюються. До таких відноситься й збудник туберкульозу. Проте й дотепер остаточно не з'ясовано: це – результат впливу індукуючих факторів чи спонтанний процес, передбачений генетичним набором мікроорганізму відповідного штаму.

Нашими попередніми дослідженнями встановлено, що тинкторіально та морфологічно змінені мікобактерії (нитко- та паличкоподібні) в субкультурі з'являються на штучному живильному середовищі залежно від умісту в ньому кислотних грам-еквівалентів і кількості пасажів.

Утім нам не вдалося в доступній літературі знайти послідовних даних щодо подальшого біологічного циклу морфологічних структур некислотостійких ниткоподібних мікобактерій. Для таких досліджень ідеальною моделлю виявилася наявність в лабораторії багаторазово пасажованих *M. bovis*

через різні середовища. Саме з використанням їх були проведені певні дослідження морфологічних аспектів реверсії некіслотостійких ниткоподібних *M. bovis* у бактеріальну кіслотостійку форму.

Для виконання цього об'єму роботи використано три клони *M. bovis* одного варіанта швидкорослого штаму, які одержано в результаті селекції культури під час тривалих пасажів через штучне яєчне середовище з рН 6,7: 1 – димчаста культура кіслотостійких паличок, традиційної морфології; 2 – димчаста культура некіслотостійких нитко- та паличкоподібних та кіслотостійких різної форми й величини паличок; 3 – димчаста культура некіслотостійких нитко- та паличкоподібних форм мікобактерій.

З метою вивчення реверсії некіслотостійких мікобактерій у кіслотостійкі чи наступної трансформації (конверсії) кіслотостійких, провели 10 пересівів мікобактерій всіх трьох клонів одного варіанта збудника через щільне середовище рН 6,7. Прямий пересів здійснювали бактеріологічною петлею на середовище двох пробірок у першу–другу добу появи димчастої культури по лінії висіву.

У динаміці пересівів, строків культивування мікобактерій проводили мікроскопію мазків, фарбованих за Ціль-Нільсеном та досліджували в часі морфологічні аспекти реверсії некіслотостійких ниткоподібних форм у кіслотостійкі, традиційні бактеріальні клітини. Для цього культуру (“наліт”, “димка”) некіслотостійких мікобактерій усіх 10-ти пасажів витримували в термостаті п'ять місяців, переглядаючи раз на тиждень та проводячи мікроскопію культивованих культур. У дослідженнях так само, як і в попередніх для закупорювання пробірок використовували гумові пробки (Румачик І.М., 1989).

У результаті проведеної роботи встановлено, що в десятій субкультурі кіслотостійких мікобактерій (№ 2) відбулося генерування як некіслотостійких, так і кіслотостійких форм збудника (табл. 20). Останні виявилися морфологічно ідентичні першому вихідному клону мікобактерій.

20. Строки конверсії мікобактерій за пересівів одно-тридобової культури*

№ клона <i>M. bovis</i>	Кіслотостійкість мікобактерій	Пасаж									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	Кіслотота некіслотостійкі	-«-	-«-	-«-	-«-	некіслотостійкі	-«-	-«-	-«-	-«-	-«-
2	Кіслотостійкі	-	-	-	-	-	-	-	-	-	кіслотота некіслотостійкі
3	Некіслотостійкі	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* -«- – те саме; (-) – змін не виявлено.

Пасажі клону кислото- та невислостійких мікобактерій (№ 1) супроводжувалися на п'ятому пересіві повним зникненням вислостійких форм, а клон невислостійких (№ 3) – генерував ниткоподібні форми у всіх 10-ти субкультурах.

Досліджувані клони мікобактерій формували культуру на 3–10-ту добу у вигляді наліту, “димки”, яка, практично, зникала через два–чотири тижні культивування (за винятком деяких субкультур, коли “димчаста” культура „наліт” залишалася протягом п'яти місяців досліду).

Одержані результати свідчать про певні закономірності біологічної властивості досліджуваних *M. bovis*. Вона зводиться до циклу стадій розвитку збудника, оскільки в усіх дослідах, у тому числі й викладених у попередніх підрозділах, спостерігається конверсія вислостійких в невислостійкі форми.

Водночас культивування в термостаті (37 °С) невислостійких мікобактерій третього клону всіх 10-ти субкультур (табл. 21) протягом п'яти місяців засвідчило, що реверсія збудника в вислостійкі форми та строки формування колоній, хоча й тільки поодинокі, тісно пов'язані між собою (табл. 22).

21. Строки реверсії невислостійких мікобактерій в вислостійкі та формування колоній *

№ штаму, пересіву	Утворення вислостійких мікобактерій та формування колоній тиж-день																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	=	=	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	=	=	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	=	=	=	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
4	=	=	+	+	+	+	+	+	=	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5	=	=	=	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	=	=	=	=	=	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	=	=	=	=	=	=	=	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	=	=	=	=	=	=	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	=	=	=	=	=	=	=	=	=	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10	=	=	=	=	=	=	=	=	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* Чисельник – мікобактерії; знаменник – колонії.

Так, перші генерації некіслотостійких мікобактерій значно раніше, і до того ж тільки частково, реверсують у кіслотостійкі форми (з третього–четвертого тижня), ніж інші (восьма–десята) – тільки з вісімнадцятого тижня. Паралельно цій тенденції, тільки в значно віддалені строки, утворюються поодинокі колонії.

Зазначимо, що мікобактерії субкультури № 10 протягом п'яти місяців так і не сформували макроскопічно видимих колоній (табл. 21).

Мікроскопія мікобактерій, які сформували колонії дев'яти субкультур, засвідчила наявність як некіслотостійких поліморфних, так і кіслотостійких форм. Поміж останніх зустрічалися надзвичайно довгі палички з великою кількістю зерен (тілець), до дев'яти–дванадцяти.

На рис. 21 та 22 видно чітку динаміку реверсії некіслотостійких мікобактерій в кіслотостійкі. Вона зводиться до трьох способів:

1) частина ниткоподібної форми з тільцями (зернами), набуваючи кіслотостійкості, фрагментується (одне тільце) на окремі клітини;

2) окремі некіслотостійкі тільця, набуваючи кіслотостійкості в різних частинах ниткоподібної форми, звільняються з материнської клітини та утворюють кіслотостійкі палички різної морфології;

3) некіслотостійкі тільця в материнській клітині, перетворюючись в кіслотостійкі, без фази звільнення, генерують традиційні форми збудника.

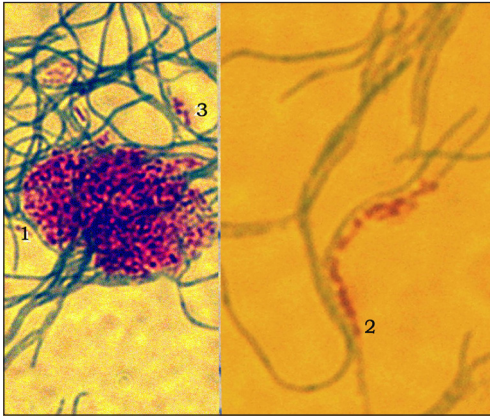


Рис. 21. Реверсія некіслотостійких ниткоподібних *M. bovis* в кіслотостійкі бактеріальні форми:

1 – переутворення некіслотостійких зерен (тілець) у материнській клітині в кіслотостійкі; 2 – вихід переутворених тілець з материнської клітини та генерація кіслотостійких бактерій; 3 – початок формування унаслідок генерації та накопичення кіслотостійких паличок, колонії × 1500

Такі окремі форми (тільця), як центральний елемент в репродуктивному циклі, здатні самостійно розвиватися в різних напрямках, залежно від отриманого стимулу. Вони можуть зберігати здатність дозрівати в середині материнської клітини, оскільки вміщують бактеріальний геном і мають мінімальну метаболічну активність (тобто ферменти та кофактор), достатні щоб ініціювати вироблення енергії та біосинтез.

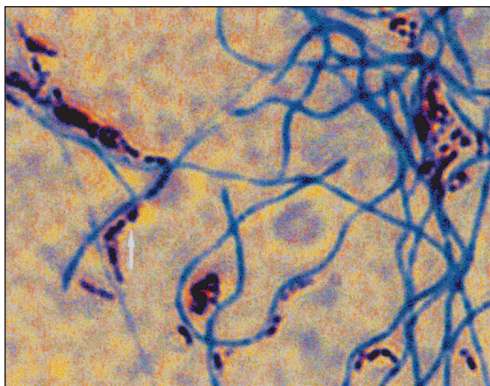
При цьому зазначимо, що далеко не всі некіслотостійкі ниткоподібні форми мікобактерій (зокрема тільця, які розташовуються всередині) реверсують в типові кіслотостійкі форми, оскільки, досліджуючи мікроскопічно мікобактерії п'ятимісячних субкультур, перші, в полі зору мікроскопа, значно

домінують над другими, хоча й виглядають, порівняно з такими перших пасажів, досить блідими, без чітких контурів.

Отже, підсумовуючи результати цих досліджень, можна зробити певний висновок. Формування кислотостійких мікобактерій з некислотостійких ниткоподібних відбувається із тілець (зерен), які наповнюють (вміщуються одне за одним) ниткоподібні форми збудника, що стверджує один з варіантів розмноження. Водночас реверсують в кислотостійкі тільки окремі з них. Переважна більшість тілець, так само, як і самі материнські некислотостійкі ниткоподібні форми згодом (чотири–п'ять місяців), напевно, втрачають репродуктивну здатність та життєздатність. Окрім цього, із збільшенням кількості пересівів мікобактерій конверсованих форм знижується реверсійна можливість некислотостійких у кислотостійкі. Хоча для остаточного висновку з цього питання необхідні, на наш погляд, більш різноманітні та триваліші дослідження.

У цілому результати цього етапу роботи свідчать про те, що поява некислотостійких форм мікобактерій, епізоотологічне та етіологічне значення яких повністю нез'ясоване, є закономірним процесом біологічного циклу розвитку виду досліджуваних мікроорганізмів, хоча вони й виникають під впливом деяких факторів. Далеко не всі раси мікроорганізмів одного штаму генеровані на тлі впливу різних факторів у часі, втрачають кислотостійкість.

Вочевидь, що поліморфізм та мінливість мікобактерій відіграють велику роль в епізоотології туберкульозу, зокрема в тому, що стосується втрати мікобактеріями кислотостійкості. Саме некислотостійкі форми мікобактерій, як і інші, визначають розвиток та перебіг епізоотичного процесу туберкульозу. Того самого часу без урахування їх різноманітних, далеко ще до вивчених властивостей розроблена система профілактики й боротьби з хворобою не завжди забезпечує необхідний епізоотологічний та й економічний ефект. На наше глибоке переконання, саме ці, невивчені, форми збудника, які, залишаючись недіагностованими з практично невідомими біологічними властивостями визначають особливості перебігу інфекційного й, відповідно, епізоотичного процесів.



*Рис. 22. Реверсія некислотостійких ниткоподібних *M. bovis* в кислотостійкі бактеріальні форми*

“→” – набуття кислотостійкості кінцевої частини ниткоподібної некислотостійкої форми × 1500

Результати викладених досліджень стали обґрунтуванням для внесення змін до “Інструкції з профілактики та боротьби з туберкульозом тварин” (2009 р.) відносно обмеження строків тривалості неблагополуччя господарств 18–20 місяців. Такі заходи в значній мірі суттєво попередять персистенцію в організмі великої рогатої худоби мікобактерій конверсованих форм та рецидив туберкульозу. Тобто, чим триваліше розвивається епізоотичний процес туберкульозу тварин й персистують в їх організмі мікобактерії, які, без сумніву, піддаються впливу захисних систем гомеостазу, тим вища вірогідність появи змінених форм збудника туберкульозу, які з різних причин, у тому числі генетично передбачених, знаходячись на певному етапі біологічного циклу розвитку, реверсують в агресивну кислотостійку, а можливо, і не тільки в таку форму, сприяють повторному розвитку туберкульозу (рецидиву).

ДИСОЦІАЦІЯ МІКОБАКТЕРІЙ

Особливе місце займають роботи, які стосуються дисоціації мікобактерій туберкульозу, оскільки вони наближують ці мікроорганізми відносно мінливості з іншими мікробами й визначають методи одержання різних варіантів, важливих для вивчення біології збудника туберкульозу і використання корисних із них для практичних цілей.

Дисоціація (від лат. *dissociatio* – розділення, роз'єднання, розщеплення) – виникнення в популяції мікроорганізмів особин (чи варіантів у субкультурах з них), які відрізняються від вихідного типу зовнішнім виглядом і структурою колоній, а також спадково закріпленими змінами деяких морфологічних ознак, біохімічних й фізіологічних властивостей. Проте основні таксономічні ознаки конкретного виду зазвичай зберігаються.

Термін “дисоціація” в мікробіології вперше застосував в 1921 році французький вчений Поль де Крюї, який спостерігав розщеплення культури збудника септицемії кролів на вірулентні і авірулентні варіанти.

Поява такого процесу, як правило, виявляється за систематичного і тривалого спостереження форм колоній мікроба на щільному чи (за атипового росту) рідкому середовищах за знаходження мікроба в незвичайних для нього умовах (“старіння” культури в разі тривалого зберігання в необновленому середовищі, підвищена концентрація солей, підвищена лужна реакція, неоптимальна температура й ін.).

3.1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Явища дисоціації туберкульозної палички вперше були описані Петровим в 1927 році відносно мікобактерій бичачого, пташиного видів і BCG. У 1930 році у цих видів мікробів автор розрізняв дві основні форми дисоціації: S-гладку, яка відрізнялася круглими з рівним краєм і блискучою поверхнею колоніями, які легко емульгуються, і R-форму з плоскими неправильними обрисами і матовою шорсткою поверхнею колоніями, які погано емульгуються. У визначенні S- і R-форм дисоціації Петров виходить з вірулентності і стійкості культур, вважаючи R- форму менш вірулентною і більш стійкою, а S-форму чутливою і високовірулентною.

Явища дисоціації в туберкульозних культурах вивчалися рядом дослідників. Hadley в 1927 році для пояснення феномена дисоціації запропонував теорію циклогенії, відповідно до якої мінливість мікроорганізмів відбувається в чітко послідовній черговості фаз чи циклостадій з поверненням у вихідну форму. Дисоціація нині залишається в стороні від вивчення бактеріальної мінливості, хоча це одне з важливих явищ в еволюції і генетиці мікроорганізмів.

Дисоціацію туберкульозної палички людського виду, *BCG* і кислостійких сапрофітів на пластинках з ячним середовищем і на гліцериновій картоплі досліджувала Тогунова. Вона спостерігала відмінні від материнської культури зморшкуваті колонії і блискучі сірувато-білі. За тривалого зберігання поза термостату в культурах з'являвся пігмент жовтого чи помаранчевого кольору. Зморшкуваті субкультури (R-форма) не емульгувалися у фізіологічному розчині, на рідкому середовищі давали жовтувату велику складчасту плівку з більш вологими помаранчевими ділянками. Морфологічно вони були представлені короткими, кислостійкими і зернистими паличками. Культура вологого типу емульгувалася легко, давала швидкий ріст на дні і тонку складчасту плівку на поверхні; вона складалася з довгих, дрібно-зернистих, слабкокислостійких, іноді гіллястих паличок. Елементи цієї культури слабковірулентні. За пересівів субкультури зберігали набуті нові властивості.

У результаті своїх досліджень Тогунова робить висновок, що за дисоціації відбувається утворення 2-х варіантів: шорсткого (R) – вирулентного; м'якого (S) – слабковірулентного чи авірулентного.

Такі варіанти відрізняються формою колоній, морфологією і забарвленням клітин, характером росту на щільних і рідких середовищах, здатністю утворювати гомогенну завис у фізіологічному розчині, стійкістю щодо зовнішнього впливу і вирулентністю. Шорсткий варіант культури виявився життєздатним у проміжку від 4 до 6 місяців, а м'який – до 2–2½ року. У процесі дисоціації можуть виникати проміжні її варіанти, які мають ознаки тієї й іншої основної форми; при цьому і вторинні колонії зафарбовані пігментом рожевого і жовто-помаранчевого кольорів.

Кислостійкі сапрофіти дисоціюють за тією ж схемою.

Тогунова пояснює появу різних форм дисоціації відщепленням різновидів кислостійких паличок, які більш стійкі на штучному середовищі поза живого організму і наближуються до сапрофітних форм; вона вважає можливим відщеплення від вирулентної туберкульозної культури пігментоутворюючих авірулентних різновидностей, які представляють сапрофітні форми збудника. Автор передбачає, що різні клітинні форми збудника туберкульозу, які спостерігалися дослідниками – від дифтероїдів до гіллястих форм – пояснюються явищами дисоціації і відщепленням від материнської культури варіантів з різними морфологічними ознаками і культуральними властивостями, зміною вирулентності й інших біологічних характеристик.

Тогунова вивчила також дисоціацію штама *BCG* й описала три головних типи колоній, одержаних у результаті її розщеплення: плоскі зморшкуваті, високі складчасті і круглі вологі; всі ці варіанти залишалися слабко-вірулентними. Вейсфейлер за дисоціації *BCG* одержав S_4 – варіант, який відрізнявся від материнського більш високою стійкістю в емульсії, кращим проникненням через стінку кишківника й специфічною сенсibiliзуювальною здатністю. На його думку, здатність *BCG* дисоціювати на S- і R-варіанти і незворотність повернення у вихідний вирулентний штаб дозволяє вважати *BCG* новою расою зі спадково закріпленою властивістю авірулентності.

Форма колоній мікобактерій туберкульозу в значній мірі залежить від складу, вологості і рН живильного середовища, і тому значні складнощі виникли у питанні про те, що розглядати як S- і що як R-варіант. Нерідко колонії з гладкою поверхнею за пересіву на гліцеринову картоплю дають ріст колоній типу R. У таких випадках потрібно було б зробити висновок про те, що S-варіант перетворювався в R-варіант. Таку точку зору відстоювали у своїх роботах Tzschnowitzer в 1930 році, Christison в 1932 році, Мазур і Баєв в 1934 році, Barglowsky в 1936 році. Цим пояснюється і те, що відповідно до даних Smithburn (1939) за рН 6 ростуть гладкі S-варіанти, за рН 6,4–6,8 – R-варіанти. Smithburn в більш пізній роботі вже змінив свою думку і дав інші величини рН, за яких утворюються S- і R-варіанти.

Поняття і властивості S- і R-варіантів не відмежовуються формою колоній. Oatway і Steenken (1937) вказують, що є вірулентні і авірулентні R-варіанти, які ростуть з утворенням “кіс” і “джгутів”, погано гомогенізуються і утворюють на поверхні середовища Сотона товсту складчасту плівку. Мікобактерії S-варіантів не утворюють цих серпантиноподібних “кіс”, ростуть в рідкому живильному середовищі дифузно і утворюють на його поверхні тонку плівку. Seibert, Zong і Morley в 1933 році встановили, що S-варіант *M. avium* вміщує більше ліпідів і йоду, ніж R-варіант. Masheboenf і Dieruck показали в 1935 році, що S-варіант має специфічний антиген, який розщеплюється в етиловому спирті та викликає преципітацію з імунною сироваткою. Структуру двох варіантів колоній вивчали Епштейн й співавт. (1935), Pagel (1934), Kahn і Nonider (1933) гістологічним методом. R-колонії мали порожнини, а S-колонії були компактними.

Birkhaug в 1935 році досліджував різні властивості S- і R-варіантів і знайшов, що 1 мг сухого S-варіанта вміщує в 3–5 разів більше бактерій, ніж R-варіант тієї ж ваги.

S-варіант росте за 24–30 °С, тоді як R-варіант тільки за 37 °С. S-варіант є більш резистентним щодо різних неблагоприємних впливів, і бактеріостатичних речовин у тому числі, ніж R-варіант.

Rosenberger в 1937 році наводить результати спостереження про штам, який протягом 25 років значився як R-варіант, наступні 8 років – як S-варіант, а після цього знову реверсував у R-варіант.

Nasta в 1937 році повідомив про неодноразове спонтанне виникнення S-варіанта типових культур *M. tuberculosis* і *M. bovis*. Дисоціація *M. avium* вивчалася Saenz і Costil (1934), які одержали R-, S- і хромогенні варіанти. S-варіант мав багато загальних властивостей з S-варіантом мікобактерій туберкульозу. На цій підставі автори зробили висновок про те, що *M. avium* є філогенетичним предком туберкульозу ссавців.

Звичайно в дослідях по дисоціації необхідно працювати з культурами, які виростили з однієї клітини, інакше, коли здійснюється тільки розділення бактерій з різними властивостями, які знаходяться в неоднорідній культурі, в суміші, може бути зроблено помилковий висновок про зміну властивостей. Саме тому варті уваги роботи Kah і Schwarzkopf (1933), які вирощували культуру

з однієї клітини і спостерігали відщеплення R- і S-варіантів залежно від живильного середовища і внаслідок пасажу через тварин.

Надзвичайним явищем дисоціації є виникнення R-варіантів у культурах *M. tuberculosis* і *M. bovis*, які ростуть дисгонічно (дрібненькі, круглі, вологі, майже прозорі колонії кольору слонової кістки). *M. bovis* відрізняється тим, що дає дисгонічний ріст дрібних, гладких колоній і краще росте на середовищі, яке не вміщує гліцерин. Grimodf-Moller (1939) спостерігав виникнення гліцеринофільних еугонічних (пишний, суцільний ріст культури) варіантів у цілому ряду дисгонічних штамів і цим відмежував поняття про дисоціацію. До цього Laporte та Saenz в 1935 році провели подібні дослідження з аналогічними висновками.

Мікобактерії туберкульозу можуть піддаватися дисоціації також в організмі тварин і людини. Ninni в 1930 році запропонував зараження морських свинок шляхом введення бактерій в шийні лімфатичні вузли, так як у цих умовах розмножуються навіть слабковірулентні мікобактерії. Birkhaug (1935) одержав дисоціацію *in vivo* при застосуванні методу Ninni; після зараження (введення в лімфовузли) з крові морських свинок шляхом висіву ізолювалася велика кількість колоній (258 колоній виду R- і S- і пігментних із 2–5 см³ крові). Negre і Valtis (1933), Negre Bretey у (1936) намагалися підвищити вірулентність мікобактерій туберкульозу, які знаходилися в невеликій кількості в патологічному матеріалі і введених морським свинкам, шляхом щоденного введення цим тваринам ацетонової витяжки, яка приготовлена з вірулентної культури *M. tuberculosis*. У деяких випадках були одержані S-колонії, які за пересівів і перевірки на тваринах виявилися вірулентними для кролів. Останні розглядалися авторами як результат дисоціації мікобактерій, введених в організм тварин. Проте з'ясувалося, що в інституті Пастера, де проводили ці дослідження із здорових незаражених морських свинок, також виділялися культури, ідентичні тим, що виділили Birkhaug й інші (Boguet, 1934; Battaglini, 1935; Saenz і Sadeltin, 1935; Valtis і van Deirse, 1935; Schaeffer, 1937).

Отже, серед дослідних тварин спостерігалось спонтанне зараження кислотостійкими мікобактеріями, що стало причиною помилкових висновків. Штам, який виділено з біологічного матеріалу здорових морських свинок, розглядався Saenz й співавт. в 1936 році як новий вид туберкульозних мікобактерій – *M. tuberculosis avium*, але Schaeffer показав результатами досліджень, що цей штам є різновидністю *M. avium*. Особливий інтерес являє дисоціація *M. avium*, які мають два види S-колоній: Т (transparent) і прозорі D (dome shaped). Т-колонії є вірулентними і відщеплюють постійно авірулентні D-колонії (Pattyn, 1970; Meissner і Anz, 1973). Kibika і Jones (1970) описали дисоціацію *M. fortuitum*, S-варіанти якого розрізняються по ряду ензимів. Tsukamuza (1971), вивчаючи дисоціацію сапрофітних *M. nonchromogenicum*, *M. terrae* і *M. novum*, довів, що за виникнення R-варіантів наступають зміни цілого ряду властивостей, і в деяких випадках варіанти були розглянуті як інший вид мікобактерій: *M. triviale*, очевидно, є варіантом *M. novum*.

Дисоціацією деякі дослідники пояснюють й утворення в кислотостійких мікроорганізмів пігментних штамів. Пігментоутворення у цих мікробів є явищем у край мінливим. Нерідко пігмент з'являється через старіння культур. Мікобактерії людського виду часто дають жовтуватий чи жовтувато-помаранчевий відтінок культур; у мікобактерій пташиного виду на гліцериновому в яєчному середовищі може бути рожеве фарбування, інколи воно виявляється й у *M. bovis* швидкорослих штамів. На середовищі Сотона можна спостерігати зеленкуватий відтінок культури мікобактерій.

Повідомляється, що пігментування залежить від складу середовища і аерації. На гліцериновому агарі з 0,2 % цитрату заліза всі види мікобактерій і кислотостійкі сапрофіти утворюють пігмент. Пігментоутворення посилюються, якщо культуру утримувати за кімнатної температури після перебування її в термостаті у відсутності світла. Тогунова, Петров й інші спостерігали пігментоутворення у варіантів мікобактерій туберкульозу.

Интерес являють пігментні штами, що виділені з крові хворих на гематогенні і шкіряні форми туберкульозу. Як виняток, такі штами виділялися за легеневого туберкульозу. Більшість цих культур володіли низькою вірулентністю для тварин. Беневаленський показав, що жовті пігментні варіанти таких культур мікобактерій можуть походити від білих за знаходження їх в організмі тварини і водночас самі можуть відщеплювати типовий білий варіант. За внутрішньолегеневого зараження кролів із 27 досліджених штамів 20 дали типові туберкульозні зміни.

У зв'язку з такими спостереженнями, повідомляє Вейсфейлер в 1975 році, Беневаленський робить висновок: пігментні кислотостійкі бактерії, які виділяються з біологічного матеріалу хворих на туберкульоз і за нетуберкульозних захворювань, належать до групи істинного туберкульозу і не є випадковими кислотостійкими сапрофітами.

На його думку, “знаходження в крові жовтого штаму за гематологічних форм означає прояв функції імунобіологічної налаштованості організму, яка визначає зниження вірулентності збудника і виникнення жовтого варіанта”. До такого самого висновку дійшла Вірканова, яка розглядає виділені нею за туберкульозного менінгіту пігментні культури як результат мінливості збудника туберкульозу під впливом захисних сил макроорганізму.

Вейсфейлер у 1973 році одержав хромогенний варіант із лабораторного штама в експерименті і вивчив його властивості в процесі дисоціації.

Жовтий варіант, як повідомляє автор, виник раптово з безпігментної культури збудника туберкульозу і не є сапрофітом. За пасажу через організм тварин пігментний варіант не змінював забарвлення, і автор вважає його расою, яка спадково закріпила цю набуту якість.

Кедровський ще в 1911 році вказував, що здатність виробляти пігмент досить мінлива і залежить від середовища (її складу і реакції), в якій живуть мікроби. Сюди необхідно віднести групу паратуберкульозних бактерій, які втрачають або в значній мірі змінюють свій пігмент залежно від зовнішніх умов. Це саме спостерігається і у мікобактерій, наголошує автор.

Не можна вважати, що утворення пігменту в кислотостійких мікобактерій є випадковим. Пігмент з'являється закономірно в результаті зниження аерації в живильному середовищі чи внесення елементів, необхідних для каталітичних процесів клітини (залізо, магній). Очевидно, за такого складу середовища обмін речовин мікроорганізму змінюється і в популяції виникають особини з іншим типом метаболізму (обміну). За зміни метаболізму можуть змінюватися й інші властивості збудника, але не обов'язково це пов'язано з пігментуванням, що помітно, наприклад, у штама *BCG*.

Проте в 2000 році М.В. Харитонов й співавтори повідомили про одержання атипичного штаму мікобактерій 55/96 з вірулентних *M. bovis*, шляхом культивування на щільному середовищі за високої температури, для якого характерним є стійке жовто-помаранчове забарвлення, що не залежить від світла, ріст колоній мікобактерій за пересівів спостерігається через 3–4 доби. Добре росте за 22 і 37 °С, дещо повільніше за 52 °С, утворюючи на яєчних середовищах сухі жорсткі колонії, які в подальшому утворюють суцільний наліт. Мікобактерії – короткі, товсті палички, грампозитивні та кислотостійкі, непатогенні для морських свинок і кролів.

Пігмент утворюється не тільки в процесі дисоціації мікобактерій; його утворення властиве і актиноміцетам, з якими мікобактерії пов'язані філогенетично, що свідчить про існування в цих мікроорганізмів загальної спадкової основи.

Водночас необхідно припускати, що, як і багатьох інших мікроорганізмів, збудник туберкульозу за своїм онтогенетичним розвитком, окрім класичної форми кислотостійкої палички, має й інші, які утворюються в нових умовах існування мікроорганізму, в процесі мінливості його під впливом факторів довкілля, живого організму. До цього часу ще немає чіткого опису історії розвитку збудника туберкульозу, який включав би уяву про його філогенетичне походження. Саме тому в науці про патогенез туберкульозу до сих пір, незважаючи на величезний масив інформації з цього питання, особливо в попередні десятиліття, виключне значення надається єдиній формі збудника – кислотостійкій паличці, що описана Кохом; зміни мікроорганізму допускаються лише в межах цієї форми.

Проте в бактеріології туберкульозу існує вже досить спостережень і фактів, які дозволяють поєднати існуючі уявлення про мікобактерії, які описав Кох, і про кислотостійкі тільця, некислотостійкі форми (зерна Муха, палички, ниткоподібні, фільтривні форми) в чітке вчення про єдиний збудник туберкульозу. Можна передбачити, що збудник туберкульозу змінює форму в своєму онтогенетичному розвитку в різних умовах перебування (існування), проходить ряд стадій і відповідно змінює морфологічні ознаки й інші біологічні властивості, біохімічну структуру і патогенність.

Пристосовуючись до нового середовища, мікроб може змінювати метаболізм і затримуватися на цій стадії розвитку; у цей час його можна виділяти в чистій культурі. У кожній стадії спостерігаються форми вегетативного росту мікроорганізму, які бувають морфологічно не подібні між собою, але схожі на форми

розвитку інших мікробів; під впливом довкілля в цих стадіях можливі процеси дисоціації й мінливості. За штучного зберігання такого типу обміну речовин мікобактерії можуть залишатися в цій стадії. Звичайно, з високою вірогідністю можна припустити, що такий же процес стадійності біологічного циклу розвитку відбувається і в період перебування мікроорганізму в живому організмі.

Проникаючи в різні органи й тканини організму, в яких відбуваються глибокі зміни під час інфекційного процесу (хвороби) та формування імунітету, мікобактерії можуть переходити з однієї стадії в іншу і змінюватися залежно від умов існування. Перебуваючи в певній стадії розвитку, мікобактерії викликають відповідну патологічну реакцію макроорганізму та прояв епізоотичного процесу.

3.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Туберкульоз, як хвороба тварин та людини, залишається найбільш актуальною проблемою з давнини до наших днів. Понад 130 років вченими світу ведеться цілеспрямоване дослідження біологічних властивостей видів мікобактерій, проте це не дало фундаментальних знань для покращення епізоотичної та, особливо, епідемічної ситуацій, хоча розробка методів діагностики та профілактичних і оздоровчих заходів в першій половині ХХ ст. за чіткої й раціональної реалізації забезпечує їх певну ефективність на окремих територіях чи країнах у цілому. Разом з цим накопичено достатній масив інформації щодо біологічних властивостей мікобактерій, який значно поглиблює знання про збудника та обґрунтовує необхідність реалізації цих знань в практику. Це стосується, в першу чергу, існування в природі окрім класичних, за морфологічними ознаками та тинкторіальними й іншими властивостями, мікобактерій, на базі яких й розроблена існуюча система протитуберкульозних заходів, фільтрівних, некислотостійких нитко- та паличкоподібних, елементарних тілець, L-форм.

Вочевидь, поглиблені дослідження форм збудника туберкульозу змінили б характер та методологічний підхід профілактики та викорінення хвороби тварин. Тому на першому етапі цієї складної роботи подані результати досліджень культуральних особливостей *M. bovis*, багаторазово пасажованих через щільне живильне середовище з різним рН, культивованих за різних температур.

Обґрунтуванням такого спрямування досліджень стали результати пасажування *M. bovis* швидкорослого штаму через щільне живильне середовище з різним рН, які опубліковані 2004–2015 рр. Нами (О.А. Ткаченко, Л.О. Ковальова, А.В. Ковальов, П.О. Давиденко) було встановлено, що багаторазові пересіви культури *M. bovis* сприяли поступовому зниженню вірулентності аж до повної її втрати у варіантів збудника, які культивувалися на середовищі з рН 6,5 та 6,7 (з 100 пересіву), зі збереженням її у мікобактерій, які культивувалися на середовищі з рН 7,1, та інтенсивності росту колоній до практично повної її відсутності. Натомість типових й конверсованих в інші форми, міко-

бактерії формували на середовищі культуру у вигляді нальоту, “димки”, згодом на якій з’являлися, в окремих пересівах, поодинокі колонії. Такі явища вірогідно могли супроводжуватися фундаментальними змінами фено- та генотипу *M. bovis* багаторазово пасажованого штаму, які, безумовно, спричиняють появу нової раси мікроорганізмів з дотепер невідомими властивостями.

З цією метою вивчали вплив тривалості культивування на інтенсивність росту культури за температури 3 °С, її залежність від кількості пасажів та інтенсивності росту мікобактерій в термостаті за температури 37 °С. Для цього відібрали *M. bovis* восьми пасажів (у проміжку від 168 до 188 субкультури), які культивувалися в термостаті за температури 37 °С протягом трьох місяців на середовищі з рН 6,5 (по три пробірки середовища кожної генерації); семи – (168–180) з рН 6,7; семи – (116–123) – з рН 7,1 та подальшим культивуванням за температури 3 °С протягом 9–20 місяців. По закінченні цих строків так само, як і після культивування за температури 37 °С, проводили облік й дослідження характеру росту колоній мікобактерій (культур).

У подальшому досліджували та характеризували культуральні властивості *M. bovis* першої (культура одержана за температури 3 °С після культивування в термостаті за температури 37 °С) та другої (культура, яка сформована за температури 3 °С, мікобактеріями колоній першої генерації після культивування в термостаті за 37 °С) генерацій в умовах культивування на середовищі з рН 6,5; 6,7 та 7,1 за температури 3 °С.

3.2.1. Залежність морфологічних форм збудника від температури культивування

Вивчаючи вплив тривалості культивування *M. bovis* на середовищі з різним рН на інтенсивність росту культури за 3 °С, її залежність від кількості пасажів та інтенсивності росту мікобактерій за 37 °С, встановлено, що зі збільшенням кількості пересівів (37 °С) підвищується вірогідність формування окремо видимих колоній (3 °С): якщо на середовищі з рН 6,5 до культивування за 3 °С макроскопічно сформованих колоній не відмічено, то після різотривалого перебування за цієї температури вони переважно формувалися мікобактеріями, які багаторазово пересівалися (табл. 22).

Подібна закономірність росту колоній виявлена й на середовищі з рН 6,7. Мікобактерії останніх генерацій за 3 °С стимулювали утворення колоній більш ніж у два рази, а мікобактерії 175 генерації, за відсутності росту за 37 °С, стимулювали утворення значної кількості колоній за 3 °С.

На середовищі з рН 7,1, до перенесення дослідних середовищ, на які для культивування за 37 °С висіяли мікобактерії, в умови 3 °С, формувалися поодинокі колонії в 118 та 119 генераціях, тобто з семи у двох, тоді як культивування за 3 °С супроводжувалося формуванням колоній на середовищі шести пробірок (генерація 116; 117; 118; 119; 120; 122), у тому числі збільшилася кількість колоній 118 та 119 пасажів (з п’яти до одинадцяти).

В останній генерації (123-й пасаж) ріст колоній був відсутній.

22. Вплив тривалості культивування на інтенсивність росту культури за 3 °С, її залежність від кількості пасажів та інтенсивності росту мікобактерій в термостаті (37 °С)

рН середовища	Пасаж	Характер культури, кількість колоній, 37 °С	Культи- вування за 3 °С, місяць	Характер культури, кількість колоній, 3 °С
6,5	168	Ріст відсутній	19	Наліт, 2 колонії
	170	Ріст відсутній	18	Наліт-плями
	173	Наліт	13	Наліт
	177	Наліт	11	Інтенсивний наліт
	178	Наліт	11	Інтенсивний наліт, 3 колонії
	179	Ріст відсутній	11	Інтенсивний наліт, 2 колонії
	183	Наліт	10	Наліт, 1 велика колонія
	188	Наліт	9	Наліт, 2 дрібні колонії
6,7	168	4 дрібні колонії	20	Наліт, більше 20 колоній
	170	4 дрібні колонії	20	3 великі колонії, 10 дрібних колоній
	173	4 колонії	13	Більше 20 колоній
	175	Ріст відсутній	13	14 колоній
	176	8 колоній	13	
	178	4 колонії	13	
	180	Наліт	10	Більше 20 колоній
7,1	116	Наліт	20	5 колоній
	117	Наліт	20	Багато дрібних гладеньких колоній, 1 велика шорстка та 1 велика гладенька
	118	5 дрібних колоній	20	Наліт, 1 велика шорстка колонія, 10 дрібних колоній
	119	5 дрібних колоній	18	Наліт, 1 велика шорстка колонія, 10 дрібних колоній
	120	Наліт	18	Наліт, 1 колонія
	122	Ледь помітний наліт	13	Наліт, 1 велика шорстка колонія
	123	Наліт	13	Наліт

Аналізуючи залежність інтенсивності росту колоній на середовищі в умовах 3 °С від тривалості цих умов (3 °С), виявлено зворотну залежність частоти формування колоній. Зі зменшенням тривалості перебування досліджуваних мікобактерій в умовах низької плюсової температури збільшується частота появи колоній. Це зумовлено більш глибокими, хоча й нез'ясованими, на-

певно, адаптивними змінами біологічних властивостей мікобактерій з найбільшою кількістю генерацій, за яких конверсовані в некіслотостійкі форми мікобактерії не здатні (за окремим винятком, причому у віддалені строки) формувати колонії.

Інтенсивність росту колоній (культури) за 3 °С практично не залежить від інтенсивності їх формування за 37 °С. Так, на середовищі з рН 6,5 на тлі їх відсутності за 37 °С відмічено ріст за 3 °С, з рН 6,7 та 7,1 така сама закономірність.

Отже, ці дослідження засвідчили, що інтенсивність розмноження *M. bovis* в умовах 3 °С більшою мірою залежить від генерації збудника, тобто кількості пасажів через живильне середовище, ніж від тривалості культивування за традиційної чи низької плюсової температури. Таке явище характерне для мікобактерій, культивованих на середовищі з рН 6,5 та 6,7. На середовищі тільки з рН 7,1 подібна закономірність нечітко простежується, що може бути зумовлено іншими змінами біологічних властивостей мікобактерій під впливом такого вмісту в середовищі кислотно-лужних грам-еквівалентів. Передусім це може стосуватися морфологічних ознак й тинкторіальних властивостей багаторазово пасажованих мікобактерій.

Досліджуючи та характеризуючи культуральні властивості *M. bovis* першої та другої генерацій в умовах культивування на середовищі з різним рН за 3 °С, встановлено, що інтенсивність росту культури двох генерацій практично не відрізняється за винятком 170 (рН 6,5) пасажу другої генерації, де вона виявилася пишною. На середовищі з рН 6,7 інтенсивність росту колоній першої генерації була вищою, ніж другої, а з рН 7,1 мала суттєві відмінності. Так, *M. bovis* першої генерації помірно росли, а другої – слабо, за винятком 117 пасажу, де відмічено пишну інтенсивність росту. Мікобактерії цього варіанта (в одній пробірці) першої генерації утворювали наліт та окремі колонії, тоді як другої – лише окремі колонії та їх скупчення. Оскільки колонії мікобактерій першої генерації 117 пасажу мали відмінні культуральні характеристики: а) помаранчеві колонії з гладкою; б) шорсткою поверхнями та в) білі гладкі колонії, то їх дослідження проведено окремо (рис. 23).

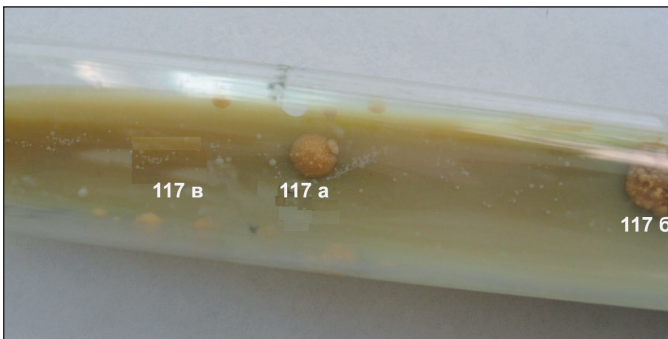


Рис. 23. Колонії *M. bovis* першої генерації, культивованих за температури 3 °С

Вочевидь тривале зберігання посівів мікобактерій за низьких плюсових температур (2–3 °С) після багаторазових пасажів через штучне живильне середовище Левенштейна-Йенсена з рН 7,1–7,2 привело до розщеплення високовірулентного штаму. До перенесення посівів в холодильник (3-місячні спостереження в умовах термостату) росту колоній не було виявлено, що свідчить про втрату можливості в мікобактерій, які багаторазово пасажувалися через щільне середовище, розмножуватися за такого температурного режиму (37 °С). Проте така здатність не була втрачена повністю, оскільки, як нами встановлено, вона проявилася у таких мікроорганізмів за температури 2–3 °С культивування, що може підтверджувати певне перелаштування генетичного коду досліджуваних мікобактерій. Чи стабільні такі зміни, чи ні, з'ясують подальші тривалі в часі різнобічні, з різним методологічним підходом дослідження.

За характером росту на середовищі з рН 6,5 культури відрізнялися суттєво. Якщо в першій генерації ріст характеризувався нальотом та окремими колоніями, то в другій – практично окремими колоніями. Це ж відмічено на середовищі з рН 7,1 у першій генерації (рис. 24). Проте в другій ріст відзначався тільки окремими колоніями та їх скупченнями (117а, б, в пасаж).

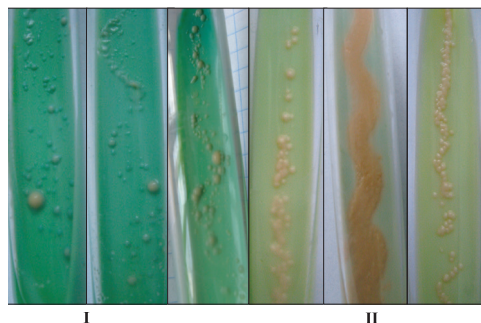


Рис. 24. Культура M. bovis дисоціативних форм 117 пасажу, яка сформована за температури 3 °С: I – двотижнева; II – чотири тижнева, друга генерація

На середовищі з рН 6,7: колонії першої генерації розташовувалися скупченнями майже в половині пасажів (у трьох із семи), тоді як в другій – тільки окремо.

Це свідчить про вплив терміну культивування на характер росту культури: перша генерація в декілька разів культивувалася триваліше, ніж друга. Підкреслимо, що відрізнялася кількість та величина колоній мікобактерій генерацій на досліджуваному середовищі з різним рН. На середовищі з рН 6,5 кількість колоній домінувала в другій генерації мікобактерій, проте їх величина виявилася подібною до таких першої; з рН 6,7: кількість та величина колоній мали перевагу в першій генерації мікобактерій; з рН 7,1: кількість колоній виявилася практично однаковою за винятком 117 пасажу першої генерації, де їх кількість була численною. Величина колоній мікобактерій першої генерації була дрібна та велика в усіх пересівах (окрім 120, де відмічена наявність тільки дрібних колоній, та тільки великих – у 122-му). У другій генерації спостерігалися в основному дрібні колонії і тільки в 117а, б, в та 118 пасажах середні й великі, які далі формували суцільний ріст (рис. 25).



Рис. 25.
Культура *M. bovis*
другої генерації
118 пасажу

Форма колоній на середовищі з різним рН у першій та другій генераціях була правильною за винятком 183 пасажу другої генерації з рН 6,5; 175 пасажу першої генерації з рН 6,7 – неправильна; 117 пасажу першої генерації з рН 7,1 – змішана (правильна та неправильна).

Поверхня колоній виявилася гладкою (S-форма) у переважної більшості першої та другої генерацій за винятком колоній 116–119 пасажів першої генерації на середовищі з рН 7,1 (гладка та шорстка) та 122 пасажу – шорсткою. За консистенцією здебільшого колонії були крихкими та сухими, а на середовищі з рН 6,5 першої генерації – крихкими та щільними й крихкими – в другій.

Однак чітку здатність утворювати пігмент в умовах традиційного культивування за 37 °С виявлено в окремих колоніях першої (178, рН 6,5; 173, рН 6,7; 117, рН 7,1) та другої (170; 177, рН 6,5; 117, рН 7,1) генерацій. Водночас за прозорістю та емульгованістю колонії всіх пересівів та генерацій практично не

відрізнялися – матова та помірна відповідно.

Дослідження культуральних особливостей *M. bovis* багаторазово пасажованого штаму через штучне середовище з різним рН та його дисоціативних форм засвідчили, що еволюційно закладена здатність забезпечує біологічний цикл, який передбачає конверсію (трансформацію) з відновленням можливостей розмножуватися та формувати колонії на середовищі з різним рН за низьких плюсових температур. Такі раси збудника з'являються в популяції як кислотостійких вірулентних мікроорганізмів, так і в такій, яка втратила ці властивості. Вони здатні утворювати колонії різні за формою, а окремі з них – продукувати пігмент.

Отже, збільшення кількості пасажів *M. bovis* за 37 °С через щільне живильне середовище супроводжується підвищенням вірогідності формування окремо видимих колоній за температури 3 °С.

Проте інтенсивність росту колоній (культури) за температури 3 °С не залежить від інтенсивності їх формування в умовах температури 37 °С.

У процесі біологічного циклу *M. bovis* з'являються дисоціативні форми незалежно від вмісту в середовищі кислотних грам-еквівалентів та вірулентності материнської популяції, проте значно раніше на такому з рН 7,1, ніж з рН 6,5 та 6,7. Особливістю культуральних властивостей нових рас конверсованих (трансформованих) форм *M. bovis* є здатність продукувати пігмент і в субкультурах, що формуються за низьких плюсових температур.

Питання біологічних властивостей мікобактерій, зокрема бичачого виду, існуючих наразі, потребують вивчення, оскільки з'являються все нові й нові повідомлення авторів про особливості деяких з них. Тому подальшим етапом цього

напряму роботи було визначення морфологічних ознак та тинкторіальних властивостей *M. bovis* дисоціативних форм, культивованих за температури 3 та 37 °С.

У роботі використано культури *M. bovis* першої генерації (одержана за температури 3 °С після культивування в термостаті за традиційної (37 °С) температури) та другої генерації (одержана за температури 3 та 37 °С з культури першої генерації). Попередньо досліджували вплив кількості пасажів на інтенсивність розмноження (формування колоній) *M. bovis* на живильному середовищі з різним рН. Для цього заздалегідь приготовлену завис *M. bovis* першої генерації (1 мг культури на 1 см³ фізіологічного розчину) різних пасажів висівали на живильне середовище з відповідним рН (6,5; 6,7; 7,1–7,2) та культивували (друга генерація).

Потому вивчали морфологічні ознаки та тинкторіальні властивості *M. bovis* першої та другої генерацій на середовищі з рН 6,5 (168–188 пасажі); 6,7 (168–180 пасажі) та 7,1–7,2 (116–123 пасажі).

Мазки готували шляхом нанесення на скельце завису мікобактерій бактеріологічною петлею. Висушені та фіксовані мазки фарбували за Ціль-Нільсеном з подальшою мікроскопією під імерсією.

Встановлено (табл. 23), що на живильному середовищі з рН 6,5 за низької плюсової температури початок росту колоній реестрували здебільшого на 10 добу, тоді як за 37 °С – тільки з 45 доби (170 пасаж) з формуванням поодиноких колоній (2–5). За умов низької плюсової температури в деяких пасажах (170) спостерігали значну інтенсивність розмноження мікобактерій з утворенням великої кількості колоній (хоча й у віддалені терміни: на 66 добу).

Очевидним стало те, що інтенсивність розмноження мікобактерій, а відповідно і швидкість та кількість сформованих колоній, визначаються кількістю генерацій (пасажів) *M. bovis* та їх конверсійних форм, оскільки кількість колоній в динаміці пасажів за різних температур зменшується.

Провівши подібні дослідження з мікобактеріями, які культивовані на середовищі з рН 6,7 за двох температурних режимів, ми одержали протилежні результати: паралельно генераціям мікобактерій збільшувалася й кількість колоній. Ріст останніх за 3 °С відмічався на 11 добу, а за традиційної температури культивування на – 46–60 добу (табл. 24). Досліджуючи властивості мікобактерій, які культивувалися на середовищі з рН 7,1–7,2, виявлено (табл. 25), що початок росту, тобто формування колоній, за низької плюсової температури відбувається на 11 добу, за винятком 117 пасажу, де ріст відмічено на четверту добу. За традиційної температури культивування (37 °С) колонії з'являлися на 25 добу, крім 117 пересіву – на 11 добу. Упродовж спостережень інтенсивність росту мікобактерій була слабкою і характеризувалася поодинокими колоніями.

У подальшому інтенсивність розмноження мікобактерій за температури 3 °С характеризувалася пишним ростом тільки в 117а, б, в пасажі, що вже на 18–25 добу культивування сприяло значному збільшенню кількості колоній (понад 25). В інших субкультурах виявлявся помірний ріст, який характеризувався поступовим утворенням колоній, зазвичай до десяти.

23. Вплив кількості пасажів на інтенсивність розмноження *M. bovis* на живильному середовищі з рН 6,5 за температур 3 та 37 °С *

Пасаж	t, °С	Строк культивування, доба										
		10	17	24	31	38	45	52	59	66	73	80
		кількість колоній										
168	3	2	3	4	4	4	4	4	5	5	5	5
	37	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1
170	3	5	6	6	6	6	6	6	6	20	20	20
	37	-	-	-	-	-	2	2	3	4	5	5
173	3	-	2	2	3	3	3	3	3	3	3	4
	37	-	-	-	-	-	-	2	2	2	2	2
177	3	-	-	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	37	-	-	-	-	-	-	1	1	2	3	3
178	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	37	-	-	-	-	-	-	-	1-	1	1	1
179	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	37	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1
183	3	2	2	2	2	2	2	3	3	3	3	3
	37	-	-	-	-	-	-	2	2	3	3	3
188	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	37	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1

* – кількість колоній на початку росту культури.

24. Вплив кількості пасажів на інтенсивність розмноження *M. bovis* на живильному середовищі з рН 6,7 за температур 3 та 37 °С*

Пасаж	t, °С	Строк культивування, доба										
		11	18	25	32	39	46	53	60	67	74	81
		кількість колоній										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
168	3	2	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	37	-	-	-	-	-	2	2	2	3	3	4
170	3	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	37	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1
173	3	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	37	-	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1
175	3	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	37	-	-	-	-	-	1	1	1	2	2	2

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
176	3	3	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5
	37	-	-	-	-	-	-	-	2	2	3	3
178	3	-	-	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	37	-	-	-	-	-	-	-	1	1	2	2
180	3	5	5	5	5	5	5	5	5	5	8	11
	37	-	-	-	-	-	2	2	2	3	3	4

25. Вплив кількості пасажів на інтенсивність розмноження *M. bovis* на живильному середовищі з рН 7,1–7,2 за температур 3 та 37 °С*

Пасаж	t, °С	Строк культивування, доба									
		4	11	18	25	32	39	46	53	60	67
		кількість колоній									
116	3	-	1	1	2	3	4	4	4	5	5
	37	-	-	-	1	1	2	2	2	2	2
117a	3	3	7	9	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
	37	-	1	1	2	2	2	2	3	4	4
117б	3	3	10	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
	37	-	1	1	1	2	4	5	5	8	10
117в	3	1	6	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25	> 25
	37	-	5	5	8	8	10	11	12	14	14
118	3	-	2	3	3	5	5	5	5	5	6
	37	-	-	-	1	1	2	2	2	2	2
119	3	-	3	5	8	8	9	9	9	10	10
	37	-	-	-	2	2	2	2	3	3	3
120	3	-	1	1	2	2	3	4	4	6	7
	37	-	-	-	1	2	2	3	3	3	4
122	3	-	1	2	2	2	4	4	5	5	7
	37	-	-	-	1	1	2	2	2	3	3
123	3	-	1	2	2	2	3	3	5	5	8
	37	-	-	-	1	1	2	2	2	3	4

Між іншим, за температури 37 °С інтенсивність розмноження мікроорганізмів 117 пасажу характеризувалася помірним ростом та поступовим збільшенням кількості колоній на 67 добу. Мікобактерії інших пересівів мали слабкий ріст, за якого формувалося до 4 колоній.

Отже, дослідження засвідчили загальну тенденцію інтенсивності формування колоній (їх кількості): за температури 37 °С вони формувалися значно

пізніше і в меншій кількості, ніж за температури 3 °С. У той же час на тлі збільшення генерацій мікобактерій на середовищах з рН 6,5 та 7,1–7,2 зменшувалася кількість колоній, а з рН 6,7 – збільшувалася.

Вивчаючи морфологічні ознаки та тинкторіальні властивості *M. bovis* першої та другої генерацій, культивованих на середовищі з рН 6,5 за температури 3 °С, встановили, що мікобактерії досліджуваних пересівів першої генерації утримували фарбу фуксину (кислотостійкі), хоча в окремих випадках серед них зустрічалися й неацетобазиліформні форми (170 і 183). Тільки в одному пересіві з цієї генерації (178) колонії формували неацетобазиліформні варіанти (форми) мікроорганізму. Того ж часу в другій генерації колонії формували: тільки неацетобазиліформні форми (3 із 8); неацетобазиліформні та ацетобазиліформні (2 із 8); ацетобазиліформні (3 із 8). Таке явище можна пояснити тривалістю культивування мікобактерій, оскільки друга генерація культивувалася за часом в декілька разів менше. Це могло вплинути на тинкторіальні властивості досліджуваних мікроорганізмів.

Підкреслимо, що одна культура (пересів 168, друга генерація) формувалася ацетобазиліформними елементарними тільцями. Їх кількість в полі зору мікроскопа виявилася не досить значною (скупчень не виявлено). У 188 пересіві першої генерації такі морфологічні форми (ацетобазиліформні тільця) розташовувалися поряд з неацетобазиліформними паличкоподібними варіантами мікобактерій.

Усі мікроорганізми досліджуваних субкультур, як першої, так і другої генерацій, мали форму прямих паличок із заокругленими кінцями, за винятком 170 пересіву, де вміщувалися й нитчасті форми. Крім цього, 170 субкультура другої генерації поряд з ацетобазиліформними паличками містила й неацетобазиліформні овали з різною оптичною густиною поверхні.

За довжиною мікроорганізмів суттєвої різниці не виявлено: домінували короткі мікобактерії. Це стосується й товщини: в переважній більшості виявлялися тонкі, іноді як тонкі, так і товсті форми мікроорганізмів здебільшого першої генерації (у 3 із 8 субкультур).

Щодо зернистості, то в двох культурах першої генерації (173 та 179 пересів) мікобактерії були зернисті, у той час як другої – тільки в одній (173 пересів).

Аналіз результатів дослідження морфологічних ознак та тинкторіальних властивостей *M. bovis* (перша та друга генерації), культивованих на середовищі з рН 6,7 за температури 3 °С показав, що мікроорганізми всіх культур володіють вираженою ацетобазиліформністю і мають паличкоподібну форму. Мікобактерії першої генерації виявилися довшими від традиційних на загальному тлі коротких кокоподібних форм. Збудники другої генерації в більшості мали короткі форми, і тільки 175 та 176 субкультура формувалася як довгими, так і короткими мікобактеріями. Утім мікобактерії усіх субкультур були тонкими, за формою досліджувані збудники виявилися прямими і вигнутими, із заокругленими кінцями. Усі форми мали виражену зернистість, тобто вміщували ту чи іншу кількість зерен (іноді до 12). Одночасно характерним є скупчене

розміщення мікобактерій у першій генерації. Для другої генерації показовим є більш поодинокі розміщення мікроорганізмів у полі зору мікроскопа, хоча й зустрічаються скупчення мікобактерій. Крім цього, тільки в одній субкультурі із семи пасажів другої генерації (173) зареєстровані тільки кислотостійкі елементарні тільця (рис. 26), хоча ці утворення виявлялися в різних кількостях в культурах (колоніях) інших пересівів другої генерації. У першій генерації мікобактерій таких утворень не виявлено.

За тинкторіальними властивостями *M. bovis* першої генерації, які культивовані на середовищі з рН 7,1–7,2 за температури 3 °С, утримують фарбу фуксину (кислотостійкі), за винятком 117 пересіву – кислотостійкі та некислотостійкі мікобактерії (рис. 27).

У другій генерації тільки в чотирьох пересівах із семи колонії формувалися кислотостійкими формами, в інших 117а, 118 і 119 кислотостійкими і некислотостійкими, а 117б і в – тільки некислотостійкими (рис. 28).

Майже всі колонії, які утворені мікроорганізмами у формі паличок, вміщували кислотостійкі елементарні тільця (пасажі 120 і 122 першої генерації та 117а, б, в і 119 відповідно другої). Винятком виявилася субкультура 118 пасажу другої генерації, яка формувалася некислотостійкими овалами (L-форми) з різною оптичною густиною поверхні та, як правило, поодинокими кислотостійкими утвореннями на кінцях (117б).

Протилежне явище відмічено в субкультурі 119 пасажу, де в першій генерації були довгі й короткі палички, а в другій – кокоподібні, зернисті (рис. 29).

Стосовно товщини мікроорганізмів, то в першій генерації це товсті й тонкі, а в другій – переважно тонкі.

Культури першої генерації 116–118 пасажів формувалися мікобактеріями прямої та вигнутої форм, а всі

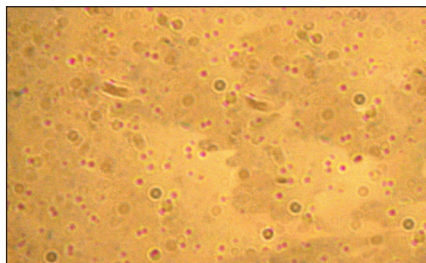


Рис. 26. Елементарні тільця 173 субкультури, друга генерація × 1500

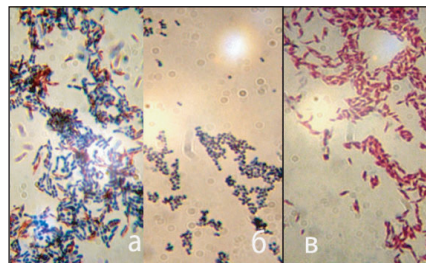


Рис. 27. Дисоціативні форми *M. bovis* 117 субкультури, перша генерація × 1500

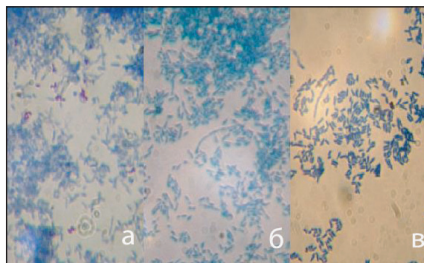


Рис. 28. Дисоціативні форми *M. bovis* 117 субкультури, друга генерація × 1500

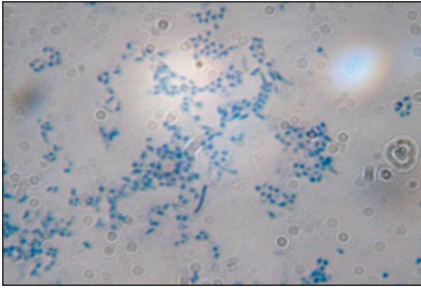


Рис. 29. Дисоціативні форми *M. bovis* 119 субкультури, друга генерація
× 1500

корослого штаму на традиційному елективному середовищі з різним рН сприяли дисоціації з появою різних варіантів мікобактерій, які принципово відрізняються за формою культури, морфологічними ознаками й тинкторіальними властивостями. Явищу дисоціації передували, напевно, й зміни хімічного складу клітинної стінки, оскільки досить легко змінюються тинкторіальні властивості (кислотостійкість). Усі ці фактори не могли не вплинути на метаболізм мікобактерій та досліджувані властивості відповідно.

Разом з цим необхідно відзначити, що за допомогою різних сенсорних і регуляторних механізмів мікобактерії, в умовах багаторазових пасажів, перебудовуючи роботу свого генетичного апарату, змінюючи морфологічні ознаки, тинкторіальні та інші властивості (зокрема відсутній або поодинокий ріст колоній за традиційних температурних режимів культивування у віддалені строки пасажування), зберігають свою життєздатність та набувають властивостей розмножуватися за низьких плюсових температур. Це не вивчена й не описана раніше властивість *M. bovis*. Культивування *M. bovis* за низьких плюсових температур (3 °C) суттєво підвищує ефективність селекції мікроорганізмів, особливо їх дисоціативних форм та таких, які не культивуються (не формують або слабко формують колонії за традиційно визначених температур), що важливо для одержання вакцинних штамів.

Отже, інтенсивність розмноження *M. bovis* та їх конверсійних форм за низької плюсової температури та за традиційної, залежить від рН середовища: з рН 6,5 та 7,1–7,2 на тлі збільшення генерацій мікобактерій зменшується кількість колоній, а з рН 6,7 – збільшується. Досліджувані мікобактерії, адаптуючи метаболізм в умовах багаторазових пасажів, змінюють морфологічні ознаки та тинкторіальні властивості, зберігають життєздатність та набувають здатності розмножуватися (формувати колонії) за низьких плюсових температур. За 37 °C колонії формуються значно пізніше (з 25 доби), ніж за температури 3 °C (з 4 доби).

Без сумніву, як засвідчили попередні результати досліджень *M. bovis* швидкорослого штаму, тільки численні пересіви культури можуть виявити динамічні послідовні закономірності біологічного циклу розвитку мікобак-

інші пересіви – мікроорганізмами прямої форми. Проте всі вони мали заокруглені кінці.

Щодо зернистості, то в *M. bovis* першої генерації вона була присутня, крім 117 субкультури, тоді як мікобактерії другої генерації її зберегли тільки в 116 та 123 субкультурах. Характерна спільна властивість для мікобактерій обох генерацій – скупчене розташування.

Вочевидь багаторазові пасажі *M. bovis* одно–тридодової субкультури швид-

терій. За цього хоча й встановлені деякі відмінності залежно від рН середовища культивування, проте в цілому цикл розвитку мікобактерій загальний: може реєструватися тільки відмінність в строках прояву тих чи інших змін біологічних властивостей, морфологічних ознак конкретного варіанта мікобактерій.

Тому, встановивши ріст колоній мікобактерій бичачого виду дисоціативних форм за низької плюсової температури та утворення пігменту, ми в подальших дослідах обрали попередню методику пізнання біологічних властивостей мікроорганізмів 117а, б, в варіантів та 118 субкультур: пасажі через щільне середовище (рН 7,1) з культивуванням за температур 3 та 37 °С.

3.2.2. Особливості культуральних, тинкторіальних, сенсibiliзувальних, вірулентних властивостей та морфологічних ознак *M. bovis* дисоціативних L- та інших форм у динаміці пасажів через щільне середовище за температур 3 і 37 °С

Ці дослідження передбачають послідовні прямі пересіви 3–5-добової культури на те саме живильне середовище та культивування за температур 3 і 37 °С, проведення мікроскопії, посівів на прості елективні середовища, та вивчення біохімічних, вірулентних, сенсibiliзувальних властивостей.

Використовуючи в цьому та іншому матеріалі допис L- “та інші” форми, ми вважали, що це є більш обґрунтованим й більш широко розкриває питання мінливості мікобактерій. Враховуються не тільки L-форми у вигляді овалів з різною оптичною густиною поверхні (“Сферопласти”, “Протопласти”), але й перехідні некіслотостійкі палички, ниткоподібні, зерна, елементарні тільця, які виявляються в полі зору мікроскопа в процесі зміни біологічних властивостей мікроорганізму.

Вивчення характеристики субкультури 3-ї генерації. Результати дослідження субкультур третьої генерації засвідчили (табл. 26), що вони проявляють різну швидкість росту на щільному живильному середовищі за температур 3 і 37 °С культивування. Так, практично в два рази швидше формуються колонії за 3 °С культивування, ніж за 37 °С, а 117 субкультура а, б, в варіантів у цілому формується значно раніше, ніж 118 пересіву. Це може свідчити, по-перше, про різні біологічні властивості досліджуваних мікроорганізмів, по-друге, про можливий вплив температури культивування. Останнє більш імовірно, оскільки в загальному, як показано вище, усі субкультури ростуть швидше за низької плюсової температури.

Водночас поверхня досліджуваних субкультур виявилася гладкою та вологою. Проте всі вони утворювали пігмент: мікобактерії 117а, б, в варіантів за 3 °С – кремовий, за 37 °С – помаранчовий; 118 пересіву за двох температур тільки кремовий. Подібні результати досліджень встановлені З.Н. Кочемосовою й співавт. (1980), які, досліджуючи L-трансформацію мікобактерій людського виду, виявили, що деякі з дослідних штамів утворювали помаранчевий пігмент та були вологими (S-форма).

**26. Культуральні властивості субкультури *M. bovis*
дисоціативних форм третьої генерації ***

Варіант культури <i>M. bovis</i>	t, °C	Швидкість росту, доба	Поверхня		Пігментоутворення, колір
			гладка, S-форма	шорстка, R-форма	
117a	3	4	+	–	+, кремовий
	37	7	+	–	+, помаранчевий
117б	3	3	+	–	+, кремовий
	37	10	+	–	+, помаранчевий
117в	3	4	+	–	+, кремовий
	37	5	+	–	+, помаранчевий
118	3	11	+	–	–, кремовий
	37	25	+	–	–, кремовий
Вірулентний штам – контроль	3	–	–	–	–
	37	23	+	–	–, слонової кістки

* Тут і далі: контроль *M. bovis* 124 субкультури – вірулентний штам.

Це свідчить про те, що для досліджуваних видів (підвидів) мікобактерій (*M. bovis* та *M. tuberculosis*) характерна загальна біологічна властивість, закладена в геномі мікроба, яка проявляється в різних штамів у певний період за нез'ясованих, можливо, факторів впливу. Вочевидь, поза сумнівом залишається їх здатність формувати пігмент, а отже, й відновлювати цю, вірогідно втрачену здатність в певних умовах.

Досліджуючи морфологічні ознаки та тинкторіальні властивості, встановлено (табл. 27), що вихідні варіанти дисоціативних форм *M. bovis*, культивованих за різних температур на тому самому щільному живильному середовищі з рН 7,1–7,2, були короткими, тонкими, прямими, із заокругленими кінцями та вмщували зерна й кислотостійкі елементарні тільця. Щодо кислотостійкості паличок *M. bovis* 117a, в варіанта, то вони були кислотостійкими й некислотостійкими, а 117б – тільки некислотостійкими. Мікроорганізми 118 варіанта під імерсією виявилися як некислотостійкі овали, з різною оптичною густиною поверхні, так і елементарні тільця.

Вивчення патогенних й сенсibiliзуювальних властивостей *M. bovis* дисоціативних форм засвідчило (табл. 28), що культивовані й накопичені на яєчному живильному середовищі *M. bovis* дисоціативних вихідних форм за різних температур не викликають патолого-анатомічних змін у лабораторних дослідних тварин.

Разом з цим зазначимо, що проведений клінічний огляд тварин протягом дослідів не показав відхилень від фізіологічної норми. Маса тіла тварин підвищувалася, що може свідчити про нормальний фізіологічний стан. У ділянці введення завису мікобактерій морським свинкам не спостерігалось виразок.

27. Морфологічні ознаки та тинкторіальні властивості *M. bovis* дисоціативних форм

Варіант культури	t, °C	Кислото-стійкість	Морфологічні ознаки *						
			довжина	товщина	форма палички	кінці	зернистість	елементарні тільця	овали, L-форми
117a	3	некислото-, кислото-стійкі	короткі	тонкі	прямі	заокруглені	+	кислостійкі	–
	37	те саме	–/–	–/–	–/–	–/–	+	–/–	–
117б	3	некислото-стійкі	короткі	тонкі	прямі	заокруглені	+	кислостійкі	–
	37	те саме	–/–	–/–	–/–	–/–	+	–/–	–/–
117в	3	некислото-, кислото-стійкі	короткі	тонкі	прямі	заокруглені	+	кислостійкі	–
	37	те саме	–/–	–/–	–/–	–/–	+	–/–	–
118	3	некислото-стійкі	–	–	–	–	+	кислостійкі	некислостійкі
	37	те саме	–	–	–	–	–	–/–	–/–

* Тут і далі: довгі > 8, короткі < 7, товсті > 0,7, тонкі < 0,6 мкм.

Алергічні дослідження експериментальних тварин через 30 та 90 діб не виявили підвищену чутливість сповільненого типу. Проте свинки контролю, які були заражені вихідним патогенним штамом мікобактерій, реагували на діагностикум. Результати досліджень підтвердили, що *M. bovis* дисоціативних вихідних форм перших генерацій не володіють патогенністю (вірулентністю) та сенсibiliзувальною властивістю. Але остання може бути низького рівня, що потребує додаткових досліджень.

Біологічні властивості M. bovis дисоціативних форм 10-ї субкультури. Провівши сім прямих пасажів через щільне ячне живильне середовище мікроорганізмів дисоціативних форм, описаних в попередньому матеріалі, дослідили за наведеною раніше схемою: морфологічні ознаки мікобактерій, культуральні та тинкторіальні властивості, а також патогенну й сенсibiliзувальну здатність на видах лабораторних тварин (морські свинки, кролі та кури).

У результаті досліджень мікроорганізмів десятої генерації виявлено (табл. 29), що швидкість формування усіх субкультур (колоній) порівняно з вихідними варіантами мікобактерій (табл. 26) значно змінилася: мікобактерії 117a варіанта стимулювали культуру практично в такі самі строки, як і третьої генерації; 117б за 3 °C сповільнили строки росту культури, за 37 °C –

**28. Патогенні й сенсibiliзувальні властивості *M. bovis*
дисоціативних форм**

Варіант культури	t, °C	Вид тварин						
		морські свинки			кролі		кури	
		патолого-анатомічні зміни	алергія, доба		патолого-анатомічні зміни	алергія	патолого-анатомічні зміни	алергія
30	90							
117a	3	–	–	–	–	–	–	–
	37	–	–	–	–	–	–	–
117б	3	–	–	–	–	–	–	–
	37	–	–	–	–	–	–	–
117в	3	–	–	–	–	–	–	–
	37	–	–	–	–	–	–	–
118	3	–	–	–	–	–	–	–
	37	–	–	–	–	–	–	–
Контроль		+	+	+	+	–	–	–

скоротили; 117в – розмножувалися практично з однаковою швидкістю за обох температурних режимів; 118 – за 3 °C в 2 рази швидше формували колонії, ніж вихідні мікроорганізми.

Щодо поверхні колоній досліджуваних культур (варіантів), то необхідно зазначити, що вони віднесені до S-форм, оскільки мали рівні краї, гладку поверхню, блиск та були вологими. Окрім цього, всі досліджувані субкультури утворювали пігмент як за 3 °C, так і за 37 °C культивування. В основному, як стверджують результати дослідів, колір пігменту не залежить від температури культивування. Проте 118 субкультура за температури 3 °C утворювала помаранчевий, а за температури 37 °C – кремовий пігмент.

**29. Культуральні властивості десятої субкультури *M. bovis*
дисоціативних форм**

Варіант культури	t, °C	Швидкість росту, доба	Поверхня		Пігментоутворення, колір
			гладка, S- форма	шорстка, R- форма	
117a	3	4	+	–	кремовий
	37	5	+	–	кремовий
117б	3	7	+	–	кремовий
	37	4	+	–	кремовий
117в	3	5	+	–	помаранчевий
	37	7	+	–	помаранчевий
118	3	5	+	–	помаранчевий
	37	4	+	–	кремовий

Досліджуючи морфологічні ознаки та тинкторіальні властивості *M. bovis* дисоціативних форм, з'ясовано (табл. 30, рис. 30, 31), що їх довжина, не залежала від температури культивування: довгі й короткі. Дещо відмінними виявилися мікобактерії субкультури 117а варіанта за температури 37 °С культивування, де встановлені короткі нитки з темними зернами по всій довжині (видовженої) клітини. Товщина мікобактерій в цілому була однаковою: товсті й тонкі.

30. Морфологічні ознаки та тинкторіальні властивості *M. bovis* дисоціативних форм

Варіант культури	t, °С	Кислотно-стійкість	Морфологічні ознаки						
			довжина	товщина	форма палички	кінці	зернистість	елементарні тільця	овали, L-форми
117а	3	кислото- та некислотно-стійкі	довгі, короткі	товсті, тонкі,	вигнуті, прямі	заокруглені	+	+	-
	37	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+	+	-
117б	3	кислото- та некислотно-стійкі	довгі, короткі	товсті, тонкі	вигнуті, прямі	заокруглені	+	-	-
	37	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+	+	+
117в	3	кислото- та некислотно-стійкі	довгі, короткі	товсті, тонкі	вигнуті, прямі	заокруглені	+	-	+
	37	некислотно-стійкі	-/-	тонкі з овалами всередині товсті	довгі, короткі	-/-	+	+	+
118	3	некислотно-стійкі	довгі, короткі	товсті, тонкі	вигнуті, прямі	заокруглені	+	-	+
	37	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+	+	+

Проте *M. bovis* 117а (37 °С) і в (3 і 37 °С) варіанта відрізнялися тим, що культура формувалася товстими, дещо овальними паличками (18–20×100–150 мкм), в яких вміщувалися темно-сині овальні утворення; вони, в окремих випадках, виштовхувалися з таких клітин, з яких у подальшому формувалися типові L-форми (овали з різною оптичною густиною поверхні; 100×100 мкм).

Варіант мікобактерій культури 117в за кислотостійкістю відрізнявся від усіх інших тим, що за 3 °С тут генерувалися кислотно- та некислотно-стійкі, а за 37 °С тільки некислотно-стійкі форми. Мікобактерії різних форм 118 варіанта характеризувалися некислотно-стійкістю як за 3 та і за 37 °С культивування.

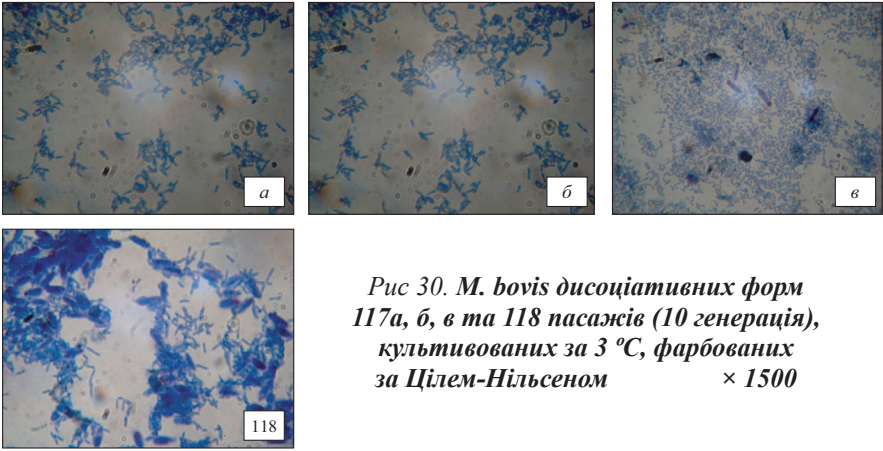


Рис 30. *M. bovis* дисоціативних форм 117а, б, в та 118 пасажів (10 генерація), культивованих за 3 °С, фарбованих за Цілем-Нільсеном × 1500

За формою досліджувані мікобактерії – вигнуті й прямі (практично в рівному співвідношенні), їх кінці заокруглені. Зернистість форм мікобактерій виявлена в усіх культурах, які аналізувалися. Водночас усі культури вміщували елементарні тільця, хоча й поодинокі. До того ж це стосується культур, які культивувалися в основному за 37 °С. L-форми мікобактерій (овали) виявлені в 2-х із 3-х культур (117б, в варіантів), які культивувались за 37 °С і в одній субкультури 117в варіанта за 3 °С.

Культура 118 пересіву (вихідний варіант L-форм мікобактерій) формувалася цими ж формами незалежно від температури культивування.

Отже, ці дослідження засвідчили, що температура культивування в динаміці пересівів (пасажів) через щільне живильне середовище певною мірою визначає морфологічні ознаки дисоціативних форм мікобактерій. У загальному кислотостійкість мікроорганізмів не проявляється як за 3 °С, так і за 37 °С, проте елементарні тільця її зберігають, фарбуючись в малиновий, червоний колір. У субкультурах 117а, б, в варіантів, які культивувалися за температури 3 °С, та 117б варіанта за температури 37 °С виявлялися в полі зору мікроскопа поодинокі незвичайні кислотостійкі короткі товсті палички. Водночас необ-

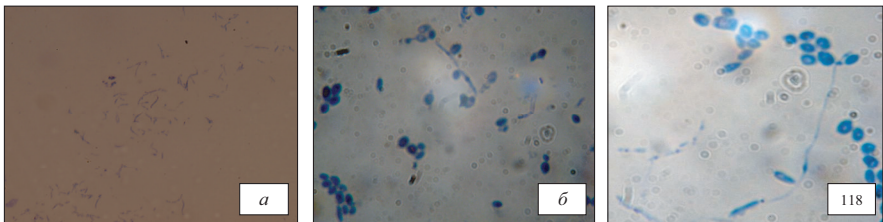


Рис 31. *M. bovis* дисоціативних форм 117а, б та 118 пасажів (10 генерація), культивованих за 37 °С, фарбованих за Цілем-Нільсеном × 1500

хідно відзначити, що збільшення кількості пересівів супроводжується підвищенням вірогідності утворення L-форм: серед субкультур третьої генерації такі форми виявлялися тільки в 118 варіанті в разі культивування за температур 3 і 37 °С.

Вивчаючи вірулентні й сенсibiliзувальні властивості *M. bovis* дисоціативних форм 10-ї субкультури, встановлено, що в експериментальних тварин (морські свинки, кролі, кури) вони не викликають туберкульозних змін й сенсibiliзації щодо ППД-туберкуліну для ссавців (табл. 31).

31. Вірулентні й сенсibiliзувальні властивості *M. bovis* дисоціативних форм (10 генерація)

Варіант культури	t, °С	Вид тварин					
		морські свинки		кролі		кури	
		патолого-анатомічні зміни	алергія	патолого-анатомічні зміни	алергія	патолого-анатомічні зміни	алергія
117а	3	–	–	–	–	–	–
	37	–	–	–	–	–	–
117б	3	–	–	–	–	–	–
	37	–	–	–	–	–	–
117в	3	–	–	–	–	–	–
	37	–	–	–	–	–	–
118	3	–	–	–	–	–	–
	37	–	–	–	–	–	–
Контроль		+	–	+	–	–	–

Подальші дослідження біологічних, зокрема культуральних, властивостей форм мікобактерій 20-ї генерації виявили (табл. 32) принципову відмінність від класичних, типових вірулентних збудників: мають інші морфологічні ознаки, тинкторіальні властивості, ростуть за 3 і 37 °С, утворюють пігмент, не володіють сенсibiliзувальними й патогенними властивостями.

Порівняно з 10-ю генерацією дещо змінилася швидкість росту колоній, особливо за 37 °С. За цієї температури всі чотири варіанти досліджуваних субкультур утворюють мізерні, але макроскопічно видимі колонії у вигляді суцільного росту по лінії посіву на другу добу культивування, того часу, як ріст культури десятої генерації відмічено на 4–7 добу. Такі ж субкультури утворюються й за температури 3 °С, але тільки на четверту добу культивування. Через тиждень за обох температурних режимів формується субкультура у вигляді товстого суцільного росту. Проте і за цієї температури культивування скоротився термін формування 20-ї субкультури в цілому.

Поверхня субкультур гладка, хоча, через 2–4 тижні окремі колонії підіймаються над суцільним ростом, створюючи вигляд шорсткої.

**32. Культуральні властивості *M. bovis*
дисоціативних форм 20 генерації**

Варіант культури <i>M. bovis</i>	t, °C	Швидкість росту, доба	Поверхня		Пігментоутворення, колір	
			гладка, S-форма	шорстка, R-форма		
117a	3	4	+	–	кремовий	помаранчевий
	37	2	+	–	кремовий	кремовий
117б	3	4	+	–	кремовий	помаранчевий
	37	2	+	–	кремовий	кремовий
117в	3	4	+	–	кремовий	помаранчевий
	37	2	+	–	кремовий	кремовий
118	3	4	+	–	кремовий	кремовий
	37	2	+	–	кремовий	кремовий
Контроль <i>M. bovis</i>		22	+	–	–	–

Що стосується пігментоутворення субкультур, то відзначимо, що на 2–4 добу культивування за обох температур утворюється кремовий пігмент, на 21 добу за температури 37 °C він залишається кремовим, а за 3 °C набуває помаранчевого кольору.

Досліджуючи морфологічні ознаки, тинкторіальні властивості *M. bovis* 20-ї субкультури, встановлено (табл. 33), що в цілому простежується певна закономірність морфологічних аспектів мікроорганізмів, яка залежить від температури культивування: 1) за низької плюсової температури в динаміці пересівів, як правило, генеруються (за винятком 117a і б варіантів) некислостійкі *M. bovis* дисоціативних форм; 2) елементарні тільця утворюються за 37 °C культивування (за винятком 117в варіанта мікобактерій, де тільця

**33. Морфологічні ознаки та тинкторіальні властивості *M. bovis*
дисоціативних форм 20 генерації**

Варіант культури	t, °C	Кислото-стійкість	Морфологічні ознаки						
			довжина	товщина	форма палички	кінці	зернистість	елементарні тільця	овали, L-форми
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
117a	3	кислото-стійкі	довгі, короткі	тонкі	вигнуті, прямі	заокруглені	+	–	–
	37	кислото- та некислото-стійкі	–	–	–	–	–	+	+

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
117б	3	кислото- стійкі	довгі, короткі	—/—	вигнуті, прямі	—/—	+	—	—
	37	—/—	довгі (поодинокі)	товсті	вигнуті	—/—	—	+	+
117в	3	кислото- та некислото- стійкі	короткі	тонкі	вигнуті, прямі	—/—	+	+	—
	37	—/—	короткі, довгі (поодинокі)	—/—	—/—	—/—	+	+	+
118	3	некислото- стійкі	довгі, короткі	—/—	—/—	—/—	+	—	+
	37	кислото- та некислото- стійкі	довгі (переважно короткі)	—/—	—/—	—/—	+	+	+
Контроль <i>M. bovis</i>		кислото- стійкі	короткі	товсті	прямі	заокруг- лені	+	—	—

генеруються і за 3 °С); 3) L-форми більш стабільно генеруються за 37 °С з одночасним утворенням елементарних кислотостійких тілець, за 3 °С на тлі певної зміни морфологічних ознак L-форм генеруються некислотостійкі, короткі й довгі палички (елементарні тільця відсутні).

Отже, можна з впевненістю стверджувати, що мікобактерії, які культивуються за різних температур, набувають нових, особливих властивостей, що можуть впливати на специфічну біологічну активність у тому чи іншому середовищі, й макроорганізмі зокрема. Безумовно, такі властивості мікобактерій можуть визначати ефективність діагностики та заходів боротьби.

3.2.3. Біохімічна активність *M. bovis* дисоціативних форм

Такі дослідження (табл. 34) виявилися необхідними, оскільки зміна біологічних властивостей *M. bovis* (культуральні, тинкторіальні, морфологія) може супроводжуватися й іншими змінами, зокрема метаболізму, з яким тісно пов'язані синтетазні системи (ферменти зокрема).

З метою визначення каталазної активності до культур додавали 2%-вий розчин перекису водню та 0,5%-вий розчин пірогалолу А і проводили облік реакції через 15 та 30 хв. Оцінку реакції проводили візуально за бурхливістю перебігу реакції та виділення кількості бульбашок кисню в першу хвилину: (+++) – значне виділення бульбашок; (++) – помірне; (+) – поодинокі бульбашки; (–) – відсутнє виділення бульбашок.

**34. Ферментативна активність *M. bovis*
дисоціативних форм 15 генерації**

Варіант культури	t, °C	Активність							
		каталазна		пероксидазна		дегідрогеназна			редукція нітратів
		15 хв	30 хв	9 хв	120 хв	15–30 хв	6 год	24 год.	
117a	3	+++	+++	+++	+++	+	–	–	–
	37	+++	+++	+++	+++	+	–	–	–
117б	3	++	+++	+++	+++	+	–	–	–
	37	+++	+++	+++	+++	+	–	–	–
117в	3	++	+++	+++	+++	+	–	–	–
	37	++	+++	+++	+++	+	–	–	–
118	3	++	+++	+++	+++	+	–	–	–
	37	++	+++	+++	+++	+	–	–	–
Контроль, 37 °C		–	–	–	–	–	–	–	–
		–	–	–	–	–	+	+	–

Пероксидазну активність мікобактерій досліджуваних форм визначали оцінюванням викладеної реакції, проводячи її облік через 1,5–2 год, за утворенням коричневого пігменту в колоніях мікобактерій та переутворення пірагалолу під дією ферменту пероксидази в пурпурогалін в присутності перекису водню. Облік реакції проводили в хрестах: (+++) – темно-коричневий колір колоній; (++) – коричневий; (+) – блідо-коричневий колір; (–) – колір не змінюється.

Дегідрогеназну активність, яка основана на виявленні окисно-відновного ферменту дегідрогенази і продуктів метаболізма, визначали (H. Bloch, 1950) в аглютинувальних пробірках діаметром 5–6 мм. Для цього 4 см³ завису мікробних клітин з концентрацією 10 мг/см³ у фосфатному буфері рН 7,4–7,6 перемішували з 1 см³ 1%-вого розчину глюкози і 0,1 см³ 0,02%-вого розчину метиленового синього. На отриманий вміст у пробірці нашаровували стерильне вазелінове масло. Пробірки ставили в термостат за температури 38 °C з подальшим контролем часу знебарвлення барвника.

Облік реакції оцінювали через 15–30 хв та 24 год. Контролем слугували пробірки зі зависом збудника і метиленовим синім без глюкози. Вірулентні мікобактерії туберкульозу володіють слабкою дегідрогеназною активністю і знебарвлюють метиленову синьку протягом 3–12 год. Непатогенні мікобактерії володіють активністю і навіть знебарвлюють метиленову синьку за 30 хв.

Редукцію нітратів, яка позитивна у людського виду мікобактерій та деяких атипичних (*M. Kansasi*, *M. Fortuitum*, *M. Smegmatis*) і негативна у *M. bovis*, *M. avium*, *M. marinum*, проводили за методами М. Tsurumura (1961) в модифікації Т.Б. Льїної й співавт. (1982). Для цього із 3–4 тижневої культури мікобактерій, яка культивована на середовищі Левенштейна-Йенсена (рН 6,5), брали 10 мг вологої біологічної маси, вносячи в бактеріологічну пробірку, що вмішувала 1 см³ 0,067 М-фосфатного буфера (рН 7,1) з 0,1%-вим розчином

нітрату натрію. Після суспендування культури інкубували за температури 37 °С протягом 20–22 год.

Утворення нітрату перевіряли додаванням у пробірку двох крапель 2%-вого розчину Р-диметил-амінобензалдегіда на 1%-вому розчині соляної кислоти. За позитивної реакції виникає жовте забарвлення, за негативної – колір розчину не змінюється.

Тому для вивчення біохімічної активності використовували такі тести: каталазу, пероксидазу, дегідрогіназу активність, наявність редукції нітратів та мікобактерії дисоціативних форм *M. bovis* 15-ї генерації. Отримані результати досліджень свідчать про те, що дисоціативні форми володіють вищою ферментативною активністю, ніж мікроорганізми материнського штаму *M. bovis*, та стверджують про набуття ними ферментативних властивостей, які непритаманні патогенним мікобактеріям, а характерні атипичним. Утім такі змінені мікобактерії не редукують нітрати, що доводить стабільність та незмінність цієї властивості в досліджених дисоціативних формах збудника туберкульозу.

3.2.4. Особливості росту *M. bovis* дисоціативних L- та інших форм на МПА, МПБ та на елективному живильному середовищі Левенштейна-Йенсена із вмістом натрію саліциловокислого за різних температур культивування

Вочевидь, на такому тлі одержаних результатів досліджень було необхідним вивчення можливості в дисоціативних формах розмножуватися на простих живильних середовищах та на середовищі Левенштейна-Йенсена із вмістом 0,5- та 1%-вого натрію саліциловокислого. Такі дослідження можуть обґрунтовано свідчити про набуття (перетворення, конверсію) *M. bovis* властивостей атипичних мікобактерій, оскільки відомо, що тільки останні можуть розмножуватися й накопичуватися на простих живильних середовищах та за наявності натрію саліциловокислого. Тому подальші дослідження були спрямовані на з'ясування саме цих особливостей. Для досліджень використали м'ясопептонний бульон (МПБ), м'ясопептонний агар (МПА) й середовище Левенштейна-Йенсена з натрієм саліциловокислим в 0,5- та 1%-вій концентрації, варіанти культур мікобактерій, що використовувалися в попередніх дослідженнях та 15 разів пересівалися й культивувалися на середовищі за температур 3 і 37 °С.

Як свідчать результати *табл. 35*, усі досліджувані культури утворюють колонії на середовищі Левенштейна-Йенсена за температур 3 і 37 °С з незначною різницею в часі їх появи. *M. bovis* вірулентного штаму формують колонії на 22 добу тільки за температури 37 °С культивування.

Того ж часу на простих живильних середовищах, як на агарі, так і в бульйоні, ріст відмічено на другу добу культивування за температур 3 і 37 °С. На агарі ріст характеризувався суцільним ростом по лінії посіву світло-сірої культури, яка мала тенденцію до збільшення в часі. У бульйоні, на початку

**35. Ріст *M. bovis* дисоціативних форм 15 генерації
на живильних середовищах, доба**

Варіант культури	t, °С	Середовище				
		Левенштейна-Йенсена	МПА	МПБ	Левенштейна-Йенсена з Na саліцилово-кислим, %	
					0,5	1,0
117a	3	4	2	2	+	+
	37	2	2	2	+	+
117б	3	4	2	2	+	+
	37	2	2	2	+	+
117в	3	4	2	2	+	+
	37	2	2	2	+	+
118	3	4	2	2	+	+
	37	2	2	2	+	+
Контроль <i>M. bovis</i>		-	-	-	-	-
		+ (22 доба)	-	-	-	-

росту культури, відмічено світло-сіру плівку на поверхні, слабе помутніння з подальшим утворенням осаду. Через три тижні, за наявності плівки, помутніння, рівень осаду збільшувався в 4–6 разів. На щільному середовищі Левенштейна-Йенсена з натрієм саліциловокислим ріст характеризувався утворенням суцільного наліту в перші 2–4 доби культивування.

Провівши мікроскопію мазків, приготовлених з тижневих культур, одержаних на агарі, в бульйоні (плівка) та на середовищі Левенштейна-Йенсена з 0,5- та 1%-вим умістом натрію саліциловокислого, встановлено відмінності морфологічних ознак та тинкторіальних властивостей форм мікобактерій, культивованих як за різних температур, так і на середовищах. Відмінності виявлені і по варіантах мікобактерій, культивованих на тому самому середовищі, але за різних температур (*табл. 36*).

Так, виявлено короткі й довгі, товсті й тонкі, прямі й вигнуті зі закругленими кінцями зернисті палички. Проте в культурі 117a варіанта на МПА за 37 °С помічено тільки кислотостійкі елементарні тільця та L-форми (овали з різною оптичною густиною поверхні), у культурі МПБ, за цієї ж температури, – тільки кислото- й некислотостійкі зерна та L-форми, у той час як за температури культивування 3 °С в культурі на МПА зареєстровані некислотостійкі палички та кислотостійкі зерна в культурі на МПА, а МПБ – некислотостійкі палички та некислотостійкі зерна. У 117б субкультурі на МПА та МПБ за температури 3 °С виявлені некислотостійкі палички й кислотостійкі зерна, за

36. Морфологічні ознаки та тинкторіальні властивості *M. bovis* дисоціативних форм 15 генерацій, культивованих на МПА та МПБ (тижнева культура)

Варіант культури	t, °C	Кислотостійкість	Довжина	Товщина	Форма палички	Кінці	Зернистість	Елементарні тільця	Зерна	Овали, L-форми
М'ясопептонний бульон										
117a	3	-	короткі, довгі	товсті, тонкі	прямі, вигнуті	заокруглені	виражена	-	кислостійкі	-
	37	-	-	-	-	-	-	+	-	+
117б	3	-	короткі, довгі	товсті, тонкі	прямі, вигнуті	заокруглені	виражена	-	кислостійкі	-
	37	-	довгі	товсті, тонкі	прямі, вигнуті	заокруглені	виражена	+	некислостійкі	+
117в	3	-	короткі, довгі	товсті	прямі, вигнуті	заокруглені	виражена	-	некислостійкі	-
	37	-	-	-	-	-	-	-	-	+
118	3	-	короткі, довгі	товсті	прямі, вигнуті	заокруглені	виражена	-	некислостійкі	+
	37	-	-	-	-	-	-	+	-	+
М'ясопептонний агар										
117a	3	-	довгі	товсті	прямі, вигнуті	заокруглені	виражена	-	некислостійкі	-
	37	-	-	-	-	-	-	-	кислото- та некислостійкі	+
117б	3	-	довгі	товсті	прямі, вигнуті	заокруглені	виражена	-	кислостійкі	-
	37	-	-	-	-	-	-	-	некислостійкі	-
117в	3	-	короткі, довгі	товсті	прямі, вигнуті	заокруглені	виражена	-	кислото- та некислостійкі	-
	37	-	-	-	-	-	-	-	кислото- та некислостійкі	+
118	3	-	короткі, довгі	товсті	прямі, вигнуті	заокруглені	виражена	-	некислостійкі	-
	37	-	-	-	-	-	-	-	кислото- та некислостійкі	+

37 °С на МПА – некислотостійкі палички, кислотостійкі елементарні тільця, некислотостійкі зерна та L-форми, на МПБ – тільки некислотостійкі зерна.

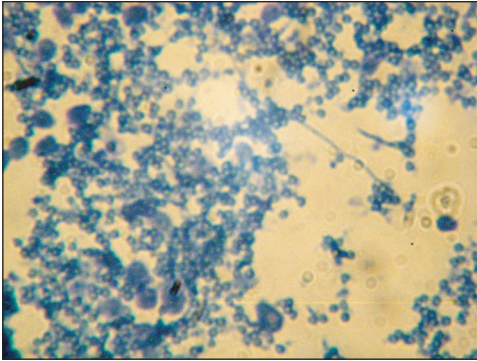


Рис. 32. *M. bovis* 117v варіанта дисоціативних форм, культивованих за 37 °С на МПА (5 генерація тижневої культури;) фарбовані за Цілем-Нільсеном × 1500

Досліджуючи 117v субкультуру, одержану на МПА за температури 3 °С, виявлено некислотостійкі палички різної форми й величини та некислотостійкі зерна, а за 37 °С – тільки L-форми (рис. 32) двох варіантів: а) великі овальні утворення з різною оптичною густиною поверхні; б) у два-три рази дрібніші, подібні за морфологією до попередніх утворень. Останні, як видно з рисунка, виштовхуються з ниткоподібних форм, які виходять з великих овалів. У мазках, приготовлених з цієї самої культури, яка одержана на МПБ за температури 3 °С, виявлені зернисті

палички й кислото- та некислотостійкі зерна, а за 37 °С – тільки кислото- та некислотостійкі зерна.

Аналогічні явища спостерігалися й в традиційній 118-й субкультурі L-форм. За температури 3 °С на агарі культуру формували, поряд з L-формами, некислотостійкі зерна та зернисті форми паличок, а за 37 °С – тільки елементарні тільця та L-форми.

В бульйоні плівку формувли за 3 °С різні форми зернистих паличок та окремі некислотостійкі зерна, а за 37 °С – тільки L-форми й кислото- та некислотостійкі зерна.

Отже, підсумовуючи отримані результати досліджень, можна попередньо висловити думку про те, що дисоціативні форми *M. bovis* у культурі на простих живильних середовищах за 37 °С мають вигляд переважно L-форм, тоді як за 3 °С – паличок різних форм та зерен (хоча зустрічаються й L-форми).

Цікавими в цьому плані виявилися дослідження описаних вище, але тільки тритижневих культур: МПБ – плівка, осад. Обґрунтуванням цього напряму вивчення було те, що в бульйоні, поряд з плівкою, інтенсивно утворювався осад. Тому необхідно було з'ясувати, за рахунок яких форм мікроорганізмів формується плівка, а за яких осад. Для цього на початку готували мазки з плівки, а потім, попередньо видаляючи бульйон з плівкою, з осаду.

У результаті досліджень (табл. 37) встановлені певні особливості морфологічних ознак та тинкторіальних властивостей мікроорганізмів, які формували в бульйоні плівку і осад за температури 3 і 37 °С (рис. 33–36).

37. Морфологічні ознаки та тинкторіальні властивості *M. bovis* дисоціативних форм 10 генерацій, культивованих на МПБ (тритижнева культура)

Варіант культури	t, °C	Кислотостійкість	Довжина	Товщина	Форма палички	Кінці	Зернистість	Елементарні тільця	Зерна	Овали, L-форми
Плівка										
117a	3	+ –	довгі, короткі	товсті, тонкі	прямі, вигнуті	заокруглені	виражена	+	кислостійкі	–
	37	+ –	довгі, короткі	товсті, тонкі	прямі, вигнуті	заокруглені	виражена	+	некислостійкі	+
117б	3	+ –	довгі, короткі	товсті, тонкі	прямі, вигнуті	заокруглені	виражена	+	некислостійкі	+
	37	+ –	довгі, короткі	товсті, тонкі	прямі, вигнуті	заокруглені	виражена	– +	некислостійкі	+
117в	3	+ –	довгі, короткі	товсті, тонкі	прямі, вигнуті	заокруглені	виражена	– +	некислостійкі	–
	37	+ –	довгі, короткі	товсті, тонкі	прямі, вигнуті	заокруглені	виражена	– +	некислостійкі	+
118	3	+ –	довгі, короткі	товсті, тонкі	прямі, вигнуті	заокруглені	виражена	+	некислостійкі	+
	37	+ –	довгі, короткі	товсті, тонкі	прямі, вигнуті	заокруглені	виражена	+	некислостійкі	+
Осад										
117a	3	+ –	довгі, короткі	товсті, тонкі	прямі, вигнуті	заокруглені	виражена	+	некислостійкі	+
	37	+ –	довгі, короткі	товсті, тонкі	прямі, вигнуті	заокруглені	виражена	+	некислостійкі	+
117б	3	+ –	довгі, короткі	товсті, тонкі	прямі, вигнуті	заокруглені	виражена	+	–	–
	37	+ –	довгі, короткі	товсті, тонкі	прямі, вигнуті	заокруглені	виражена	+	некислостійкі	+
117в	3	+ –	довгі, короткі	товсті, тонкі	прямі, вигнуті	заокруглені	виражена	+	некислостійкі	+
	37	+ –	довгі, короткі	товсті, тонкі	прямі, вигнуті	заокруглені	виражена	+	некислостійкі	+
118	3	+ –	довгі, короткі	товсті, тонкі	прямі, вигнуті	заокруглені	виражена	+	некислостійкі	+
	37	+ –	довгі, короткі	товсті, тонкі	прямі, вигнуті	заокруглені	виражена	кислостійкі	некислостійкі	+

Характеризуючи морфологію та тинкторіальні властивості мікобактерій в цілому необхідно відмітити наступне. У тритижневій плівці, яка формувалася за температури 3 і 37 °С, суттєвих відмінностей не виявлено. Проте L-форми мікобактерій поряд з іншими формами виявлені в плівці всіх варіантів субкультур, культивованих за 37 °С, а за 3 °С – тільки в двох із чотирьох: 117б та 118. В осаді за температури культивування 37 °С L-форми виявлені також у чотирьох субкультурах, а за температури 3 °С – в трьох субкультурах: 117а, в та 118. Ці дані свідчать про те, що осад в бульйоні утворюють в основному L-форми: овали з різною оптичною густиною поверхні і частіше за температури 37 °С. За цієї ж температури в осаді L-форми (овали, круглі утворення)

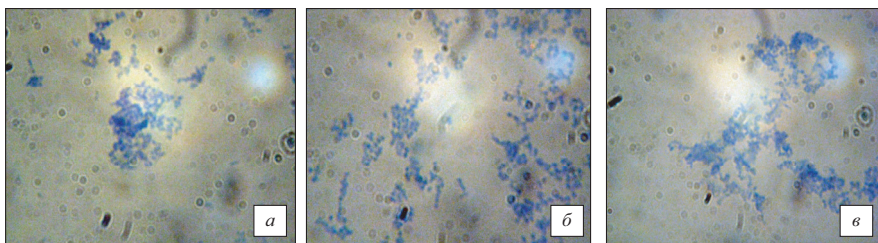


Рис. 33. M. bovis 117а, б, в та 118 варіантів дисоціативних форм, культивованих за 3 °С на МПБ (15 генерація тритижневої культури); фарбовані (плівка) за Цілем-Нільсеном × 1500

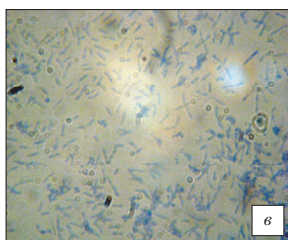
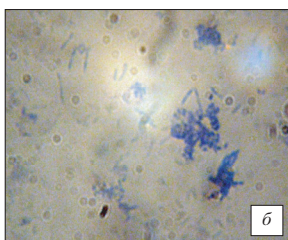
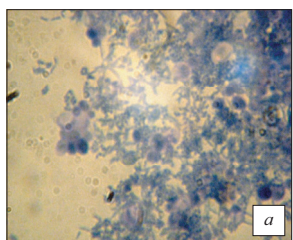
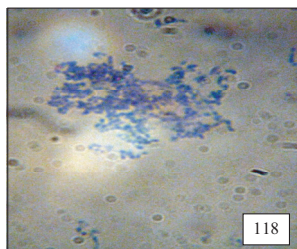
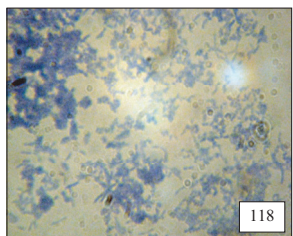


Рис. 34. M. bovis 117а, б, в та 118 варіантів дисоціативних форм, культивованих за 3 °С на МПБ (15 генерація тритижневої культури); фарбовані (осад) за Цілем-Нільсеном × 1500



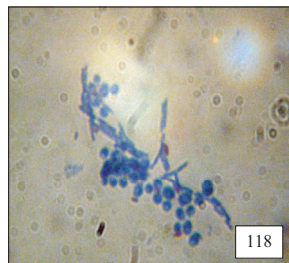
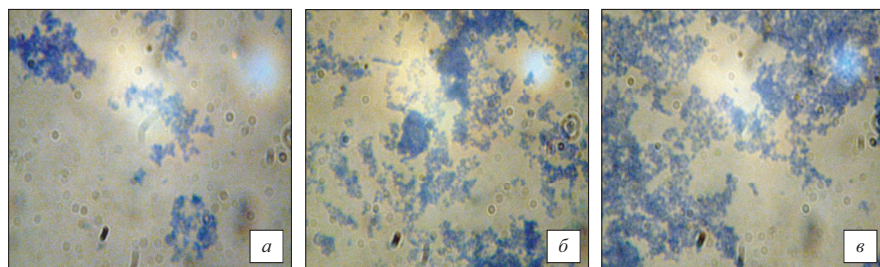


Рис. 35. M. bovis 117а, б, в та 118 варіантів дисоціативних форм, культивованих за 37 °С на МПБ (15 генерація тритижневої культури); фарбовані (плівка) за Цілем-Нільсеном × 1500

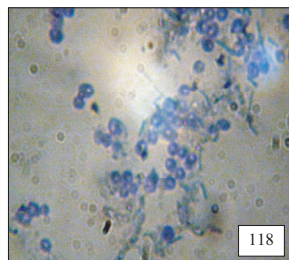
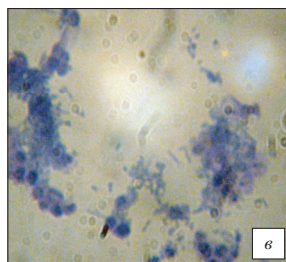
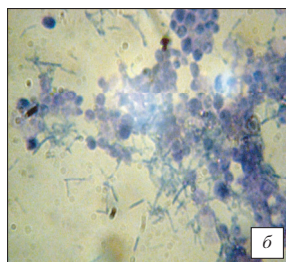
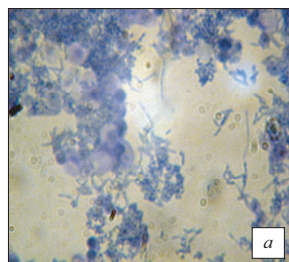


Рис. 36. M. bovis 117а, б, в та 118 варіантів дисоціативних форм, культивованих за 37 °С на МПБ (15 генерація тритижневої культури); фарбовані (осад) за Цілем-Нільсеном × 1500

чітко структуровані за наявності інших бактеріальних форм. У плівці переважають дрібніші в два–три рази овальні утворення, ніж в осаді. Така сама картина спостерігалася і за температури 3 °С.

Особливістю цих досліджень є те, що за мікроскопії мазків, приготовлених з усіх субкультур, незалежно від температури культивування, виявлялися поодинокі, в основному товсті, довжиною 9–10 мкм кислотостійкі палички,

які не ідентифікувалися за інших попередніх експериментів з цим штамом мікроорганізму.

Повертаючись до описаних форм мікобактерій тижневих субкультур та зіставляючи їх з формами мікобактерій тритижневих, одержаних в бульйоні, можна стверджувати, що конверсовані в L-форми мікроорганізми частіше виявляються в осаді, хоча й, в цілому, їх частота збільшується в часі культивування. Крім цього, наявність в тритижневих субкультурах усіх варіантів форм мікобактерій – досить товстих, порівняно довгих, у межах 9–10 мкм кислотостійких паличок – свідчить про можливу реверсію конверсованих мікроорганізмів у вихідну форму збудника. Для перевірки цього висновку було проаналізовано таку можливість мікобактерій, субкультури яких нами одержані, розпочинаючи з третьої генерації, на щільному яєчному середовищі за температур культивування 3 і 37 °С.

Водночас факт культивування мікобактерій бичачого виду на простих живильних середовищах, які нами використані в дослідах, може переконуюче свідчити тільки про одне – такі мікобактерії певних генерацій можуть набувати здатності розмножуватися на середовищі, яке не прибутанне для розмноження патогенних мікобактерій, зокрема материнського штаму.

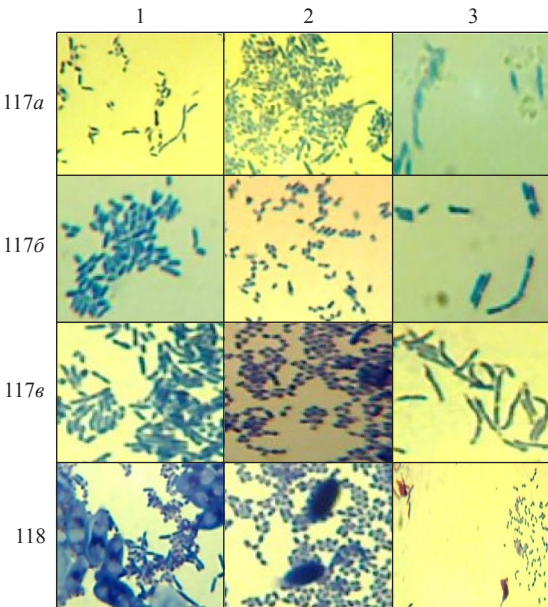


Рис. 37. Дисоціативні форми *M. bovis*, культивовані за 3 °С на середовищах:
 1 – Левенштейна-Йенсена; 2 – МПА; 3 – МПБ
 × 1500

Такі середовища певною мірою сприяють конверсії мікобактерій, що правда, в умовах культивування за 37 °С.

Частіше утворюються L-форми, й незалежно від того, чи то плівка, чи то осад. Поряд з цим можна стверджувати, що всі такі середовища володіють й індукуючими чинниками, оскільки в них утворюються L-форми.

Необхідними виявилися (у зв'язку з новими пасажами культур) повторні досліди щодо росту дисоціативних форм мікобактерій, зокрема 50-х субкультур на простих живильних середовищах. Як контроль використали *M. bovis* вірулентної материнської 100-ї субкультури (рис. 37).

Роботу, як і інші, виконували в навчально-дослідній лабораторії кафедри епізоотології ДДАЕУ в 2011–2013 рр.

Для досліджень використовували субкультури 4-х варіантів їх дисоціативних форм, які селекціоновані і вивчаються співробітниками кафедри, та середовища: щільний м'ясопептонний агар (МПА), м'ясопептонний бульйон (МПБ), Левенштейна-Йенсена.

З досліджуваних культур, які пасажували через середовище Левенштейна-Йенсена та культивували паралельно за 3 і 37 °С, готували завис мікобактерій та мазки, які фарбували за методом Ціля-Нільсена з подальшою мікроскопією. Потім проводили висів мікроорганізмів кожного варіанта, в тому числі вірулентного штаму на кожне середовище (по одній пробірці) та щоденний облік росту культур за 3 і 37 °С протягом семи діб.

З одержаних культур готували мазки й вивчали під імерсією мікроскопа в порівняльному аспекті морфологію та тинкторіальні властивості змінених форм мікобактерій.

Встановлено, що на другу добу культивування за 3 °С (табл. 38) всі досліджувані варіанти дисоціативних форм проявляли ріст на МПА у вигляді світло-сірої культури по лінії посіву, яка мала тенденцію до збільшення в часі.

38. Ріст дисоціативних форм *M. bovis* на простих живильних середовищах

Температура культивування, °С	МПА					МПБ				
	контроль	117а	117б	117в	118	контроль	117а	117б	117в	118
3	–	+	+	+	+	–	+	+	+	+
37	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

У бульйоні ріст культури в такий самий термін відмічено у вигляді осаду та слабкого помутніння (за струшування), проте плівка не формувалася. За температури 37 °С дисоціативні форми *M. bovis* досліджуваних варіантів росту не проявили ні на МПА, ні на МПБ.

У контролі *M. bovis* вірулентного штаму також не росли.

Через сім діб культивування за 3 °С зареєстровано збільшення інтенсивності росту культури на МПА та МПБ з появою плівки на поверхні останнього.

Під імерсією, в мазках, приготовлених з виділених культур і одержаних за 3 °С, виявлено (рис. 37), що мікобактерії 117а варіанта мікобактерій порівняно з вихідною культурою, розмножуючись на МПА, генерують подібні морфологічні некіслотостійкі форми – некіслотостійкі переважно зерна й, недосить часто, видовжені зігнуті зернисті палички (зерна, як правило, на кінцях). У МПБ виявлено дещо інші форми: на тлі домінування товстих і довгих із зернами некіслотостійких зігнутих паличок поодинокі некіслотостійкі зерна.

У субкультури 1176 генерації також спостерігалася певна залежність морфології клітин від середовища. Якщо вихідна культура на середовищі Левенштейна-Йенсена формувалася некіслотостійкими короткими й більш довгими паличками, то на МПА – переважно також некіслотостійкими, але зернами, в бульйоні – короткими та довгими (ниткоподібні) некіслотостійкими паличками.

Мікобактерії 1176 генерації також відрізнялися і залежали від умов культивування. На вихідному середовищі – це некіслотостійкі довгуваті (зернисті) палички та зерна, на МПА – переважно некіслотостійкі зерна й подекуди (рідко) зернисті некіслотостійкі палички, у МПБ – некіслотостійкі довгуваті зернисті палички.

Мікобактерії 118 вихідної субкультури на середовищі Левенштейна-Йенсена в рівному ступені характеризувалися наявністю L-форм, синіх зерен, які звільняються з овалів (L-форм) та поодиноких некіслотостійких паличок. На МПА відмічено суттєве домінування некіслотостійких зерен та присутність поодиноких L-форм.

Водночас у субкультури МПБ виявлено некіслотостійкі зерна, палички, інколи довгі, але поодинокі кислотостійкі.

Отже, на МПА в основному генеруються некіслотостійкі зерна, на МПБ – переважно паличкоподібні, хоча виявляються й клітини у вигляді зернистих форм. Це саме середовище (останнє) було більш благоприємним для реверсії некіслотостійких форм (хоча й рідко) в кислотостійкі мікобактерії: з чотирьох досліджених дисоціантів тільки серед одних (L-форм) встановлено таке явище.

Досліджуючи ці самі субкультури мікобактерій, тільки з 5 по 15 генерацію, про що повідомлено нами в 2012 році та викладено вище в цій роботі, відмічено ріст субкультур на досліджуваних середовищах за 3 і 37 °С. Мікроскопією виявлялися некіслотостійкі мікобактерії з дещо іншою морфологією.

Отримані дані досліджень стверджують поступову адаптацію дисоціативних форм *M. bovis* до розмноження на простих живильних середовищах в умовах низьких плюсових температур (3 °С) за одночасної втрати можливості розмножуватися за температури 37 °С, тобто умови довкілля змінили біохімічну (а значить, і біологічну) активність досліджуваних мікобактерій, яка притаманна великій групі атипичних мікобактерій. Проте жоден вид відомих мікобактерій, принаймні нами не знайдений повідомлення в літературі, в тому числі й атипичних, не володіє здатністю розмножуватися за температури 3 °С. Це свідчить про невідомі властивості мікобактерій, які можуть визначати проблему туберкульозу взагалі.

Підсумовуючи цей матеріал, наголосимо:

1) на простих живильних середовищах дисоціативні форми *M. bovis* 50-ї субкультури проявляють ріст тільки за 3 °С на другу добу культивування з таким збільшенням інтенсивності росту: на МПА – світло-сіра культура по лінії посіву; в МПБ – осад та слабке помутніння з утворенням плівки на сьому добу;

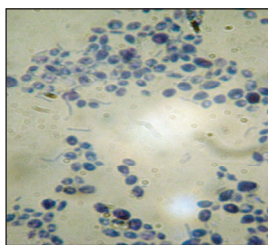


Рис. 38. L-форми *M. bovis* 118 пересіву, 13 генерація, культивовані в термостаті після 12 пасажів в умовах 3 °С × 1500

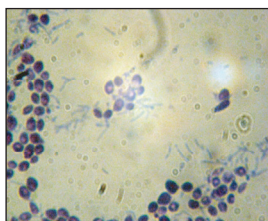


Рис. 39. L-форми *M. bovis* 118 пересіву, культивовані в термостаті × 1500

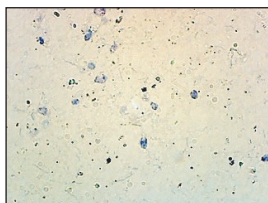


Рис. 40. *M. bovis*: морфологічні ознаки та тинкторіальні властивості за культивування в умовах термостата × 1500

2) морфогенез дисоціативних форм *M. bovis* залежить від середовища: на МПА генеруються переважно некіслотостійкі зерна; в МПБ – некіслотостійкі паличкоподібні елементи.

Водночас наведені дослідження з культивування дисоціативних *M. bovis* та L-форм 118 пересіву засвідчили, що температура культивування певною мірою впливає на морфологію мікроорганізмів та можливість утворення ними пігменту в культурі. У зв'язку з цим виникла необхідність проведення дослідів по уточненню цієї думки. Для цього культуру L-форм, яка 12 разів пересівалася й культивувалася за температури 3 °С, висіяли на те саме живильне середовище й культивували за температури 37 °С. З метою порівняння морфології мікроорганізмів, культивованих за різних температур, використали культуру цього ж 118 пересіву, але яка культивувалася за попередніх пересівів на такому самому середовищі, але тільки в умовах термостату (37 °С). У результаті досліджень (рис. 38, 39) з'ясовано, що принципових відмінностей в морфології дослідних й контрольних мікроорганізмів практично не існує. Культуру як першого, так і другого варіантів мікобактерій формували овали з різною оптичною густиною поверхні, більшого й меншого розмірів, з наявністю в них тієї чи іншої кількості дрібних синіх та червонуватих елементарних тілець, а також темно-синіх зерен, з деяких овалів зерна виштовхуються.

Проте все ж таки є й відмінність: у культурі L-форм, яка одержана тільки в умовах термостата (рис. 39), більше вміщується синіх довгих й коротких паличок, ніж у культурі, яка одержана в термостаті після 12 пересівів, культивованих тільки в умовах 3 °С (рис. 38).

Між іншим, характер культур в перші два тижні росту принципово відрізнявся: культура, яка одержана з такої, що культивувалася (попередні пересіви) за температури 3 °С формувалася окремими колоніями, які згодом зливалися (через два тижні) в суцільний ріст; культура, яка постійно культивувалася в термостаті (в попередні пересіви), виявлялася у вигляді суцільного росту (нальоту). Мікроскопія мазка, приготовленого з культури, наведена на рис. 40.

Виникло запитання: чи здатні мікроорганізми згаданої окремої колонії в наступній генерації формувати культуру у вигляді суцільного росту, чи все-таки вони набули властивостей утворювати субкультуру з окремих колоній, принаймні в перші дні культивування. Тому для з'ясування цього питання нами проведено прямий пересів мікроорганізмів на те ж саме середовище однієї пробірки, що використовувалося для подібних цілей в попередніх дослідах з подальшим культивуванням в умовах термостату (37 °C). У результаті досліджень через 24 год культивування виявлено три чітко видимі колонії; розміром 1–2 мм у діаметрі, гладкі, з рівними краями, вологі кремового забарвлення. Наступне культивування супроводжувалося збільшенням кількості окремих колоній і вже на шосту добу з'явилася значна їх кількість (дрібних й більших розмірів), з наступним (через сім дб) провалюванням (втопленням) середовища по лінії висіву мікобактерій і росту культури.

Приготувавши мазок з окремої колонії та дослідивши її під імерсією, виявили (рис. 41) чітко видимі L-форми, довгі, короткі некіслото- та кислотостійкі зернисті палички, кислотостійкі елементарні тільця. Водночас некіслото- та кислотостійкі ниткоподібні форми мікобактерій, які не виявлялися, фіксувалися в попередній субкультурі. Це може підтверджувати можливу реверсію конверсованих форм мікроорганізмів (елементарних тілець) у типові палички мікобактерій на тлі чітко сформованих L-форм.

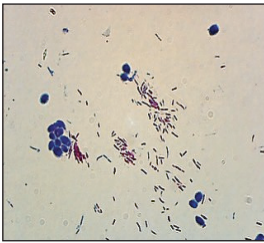


Рис. 41. *M. bovis*: морфологічні ознаки та тинкторіальні властивості за культивування другої генерації в умовах термостата × 1500

Розглянувши тільки три аспекти з різномайття біологічних властивостей мікобактерій, відзначимо, що вже ці одержані результати можуть свідчити про значні відмінності дисоціативних форм *M. bovis* від материнського варіанта, а значить про їх особливий вплив на макроорганізм.

Очевидно, тільки пасажі (пересіви) можуть виявити нові закономірності в біологічних властивостях мікроорганізму (зокрема *M. bovis*). Хоча й існують повідомлення про зміни в певній популяції мікобактерій за старіння культури, дії температури, хімічних речовин й інших чинників. Одержані дані свідчать, що зміна температури культивування на цьому етапі короткострокового дослідження, практично не впливаючи на морфологію мікроорганізмів, дещо змінює характер росту культури в перші тижні культивування.

Отже, дані проведеного дослідження мікобактерій колонії, яка сформувалася на тлі зникаючої культури, засвідчили, що в її популяції мікроорганізмів тієї чи іншої раси можуть з'являтися особини (клітини) з відновленими до конкретного часу дремаючими генами (оскільки з нез'ясованих причин активність відповідного гена пригнічується), що обумовлює інтенсивний ріст колоній.

Без сумніву, мікобактерії дисоціативних форм мають лабільний генетичний апарат, який здатний, за впливу чинників зовнішнього середовища, пристосуватися до нових умов зміною своїх властивостей.

3.2.5. Вплив температури культивування в динаміці пересівів на морфогенез *M. bovis* дисоціативних L- та інших форм

Вочевидь, що за короткочасних дослідів можна отримати необ'єктивні результати спостережень через вплив на результати різноманітних факторів. Тому для виключення впливу таких чинників нами проведені експерименти, більш подовжені у часі, з використанням чотирьох варіантів дисоціативних форм мікобактерій. Для цього в дослід включено субкультури з першої по двадцяту генерацію мікобактерій, що культивувалися на тому самому середовищі, з однаковим вмістом кислотного-лужних грам-еквівалентів за традиційної й в умовах низької плюсової температури (3 °С).

Проведення з таким методологічним підходом досліді надасть можливість не тільки з'ясувати вплив температури культивування змінених форм мікроорганізмів на їх морфологію, але й її (морфології) залежність від тривалості інкубації за таких температурних режимів. Перші субкультури перебували в згаданих умовах (температура культивування) понад шість місяців, останні – декілька діб.

У результаті мікроскопії встановлено (рис. 42), що субкультура *M. bovis* третьої генерації (в досліді перша) 117а варіанта, культивована в умовах низької плюсової температури, формувалася некіслотостійкими, дрібними, зернистої форми мікроорганізмами, в умовах термостата (37 °С) – некіслотостійкими короткими паличками (зернисті) та довгими ниткоподібними (начебо з дрібних зерен) формами, зустрічалися й поодинокі зерна.

Мікроскопія п'ятої генерації мікобактерій цього варіанта дисоціативних форм виявила, що субкультура в умовах низької плюсової температури формувалася мікроорганізмами такими ж, як і попередня, тобто некіслотостійкими зернистими формами. Субкультура, що культивувалася за температури 37 °С, характеризувалася овалами з різною оптичною густиною поверхні (L-форми) та поодинокими некіслотостійкими паличками, зернами (дещо червонуватими).

У субкультурі 7-ї генерації, за умови 3 °С культивування, виявлено практично ідентичні попереднім (5 генерація) форми, хоча зустрічаються й типові форми *M. bovis*. У культурі, яка одержана за температури 37 °С, виявлені L-форми з різною оптичною густиною поверхні, значна кількість овалів зі зруйнованою клітинною стінкою – з них звільняються дрібні зерна; крім цього, у полі зору мікроскопа виявляються поодинокі палички (тонкі й довгі).

Субкультура 8 генерації (3 °С) формувалася більш довгими зернистими паличками, хоча й зустрічалися типові форми *M. bovis*. У субкультурі, яка культивувалася за температури 37 °С, домінували L-форми, проте рідко зустрічалися й зерна з дещо червонуватим відтінком.

У 10-й генерації не відмічено суттєвих змін у морфології мікобактерій, що культивувалися за температури 3 °С: короткі палички й зернисті форми. Між тим, у паралельній субкультурі, що одержана за температури 37 °С, відбулися суттєві зміни: зменшилася кількість L-форм, але на цьому тлі значно збільшилася кількість дрібних синіх, злегка червонуватих зерен. З'явилися довгі, інколи товсті й поодинокі сині зернисті палички.

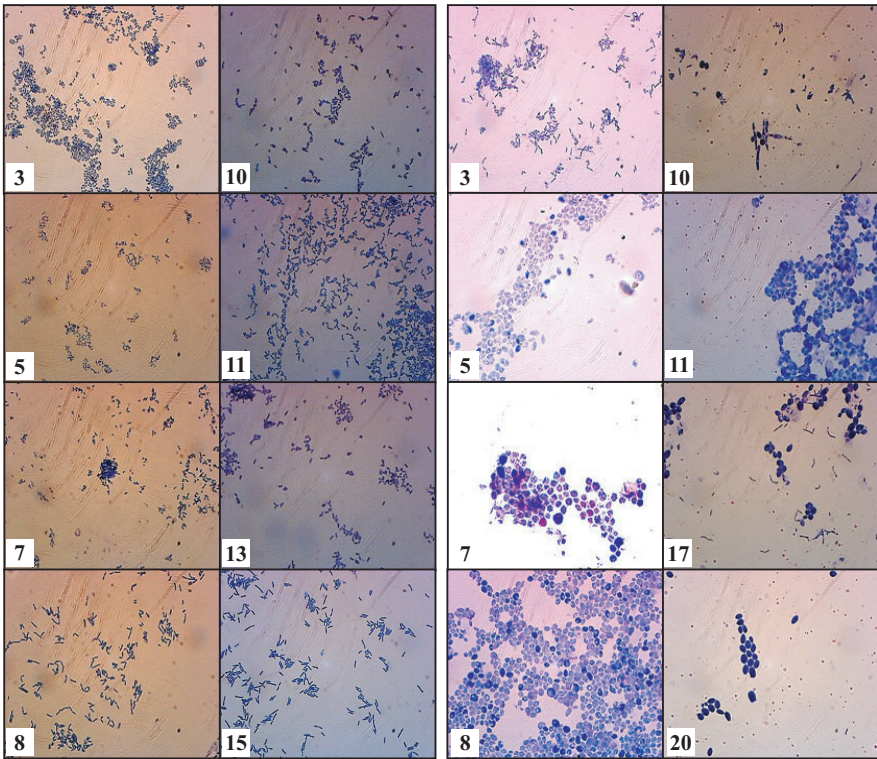


Рис. 42. Морфологічні ознаки

та тинкторіальні властивості M. bovis 117a варіанта дисоціативних форм, пасажованих через щільне живильне середовище, культивоване за температури: ліва колонка – 3 °С; права – 37 °С × 1500

В 11-й генерації морфологічна картина мікроорганізмів обох субкультур практично залишалася подібною до попередньої – 10-ї: субкультура, яка одержана за 3 °С, короткі й довгі палички; субкультура термостата – L-форми та дрібні сині, злегка червонуваті елементарні тільця.

13-та генерація мікобактерій характеризувалася (3 °С) короткими й більш довгими синіми формами паличок. У 17-й генерації мікобактерій, культивованих у термостаті (37 °С), відмічено поряд з L-формами та елементарними червонуватими тільцями наявність довгих й коротких зернистих, прямих і зігнутих, неісоціотійких паличок. Необхідно зазначити, що з появою елементарних тілець принципово змінюється зовнішній вигляд культури. Якщо за відсутності або незначної кількості культура у вигляді суцільного росту по лінії висіву завису досліджуваних мікроорганізмів інтенсивно збільшувалася у часі, то з появою в культурі елементарних тілець, через 4–5 діб культивування, вона (культура) начебто провалювалася під її тиском у середовище і

знаходилася в жолобі; згодом плівка суцільного росту культури стоншується й через 2–4 тижні середовище стікає, що свідчить, напевно, про нові, особливі властивості в елементарних тілечь досліджуваних культур (таке явище виявлено і в інших, за таких умов культивування, досліджених і описаних нижче культур), що обумовлено незвичайними, відмінними від традиційних ферментами, здатними лізувати, розчиняти традиційне штучне живильне середовище.

У 15-й генерації мікобактерій, які культивувалися в умовах температури 3 °С, виявлені більш довгі некіслотостійкі форми паличок, тоді як у 20-й генерації мікроорганізмів, культивованих за температури 37 °С, домінуючими морфологічними формами зареєстровані елементарні тільця з червонуватим відтінком, хоча й зустрічалися як L-форми, так і некіслотостійкі палички.

Отже, підсумовуючи та аналізуючи дані досліджень дисоціативних форм *M. bovis* 117a варіанта, можна відмітити певну закономірність динаміки морфологічних ознак та тинкторіальних властивостей мікроорганізмів залежно від температурних умов культивування: за температури 3 °С – характер культури, морфологічні форми, їх тинкторіальні властивості практично стабільні протягом 20 разових пересівів; за температури 37 °С – змінюються морфологія, тинкторіальні властивості й характер росту культури з появою в популяції досліджуваних мікроорганізмів елементарних тілечь.

Досліджуючи *M. bovis* 117b варіанта першої субкультури (рис. 43): в умовах температури 3 °С мікроорганізми характеризувалися некіслотостійкими кокоподібними та паличкоподібними зернистими формами, поодинокими червоними елементарними тільцями; в умовах термостата 3-я генерація – некіслотостійкими короткими й довгими тонкими зернистими паличками, з кислото- та некіслотостійкими елементарними тільцями. Палички, іноді, ниткоподібної форми.

У 2-й генерації субкультура формувалася: в умовах низької плюсової температури – здебільшого некіслотостійкими короткими й більш довгими зернистими паличками; в умовах термостата 3-я генерація мікобактерій – переважно ниткоподібними витонченими зернистими й короткими та поодинокими елементарними тільцями. Окремі ниткоподібні форми вміщували колбоподібні темно-сині утворення, в 3–4 рази більші за діаметр ниткоподібних форм.

У 3-й генерації культуру формували: в умовах низької плюсової температури культивування – переважно некіслотостійкі й більш довгі зернисті палички та інколи елементарні тільця; в умовах термостата культура (5 генерація) формувалася короткими й більш довгими некіслотостійкими паличками.

5-та генерація субкультури в умовах культивування низької плюсової температури формувалася некіслотостійкими, в основному короткими паличками; 7-ма генерація в умовах термостата – практично тільки L-формами й поодинокими елементарними тільцями.

Генерація 7-ма субкультури в умовах низької плюсової температури формувалася переважно короткими й зернистими кислото- й некіслотостійкими фор-

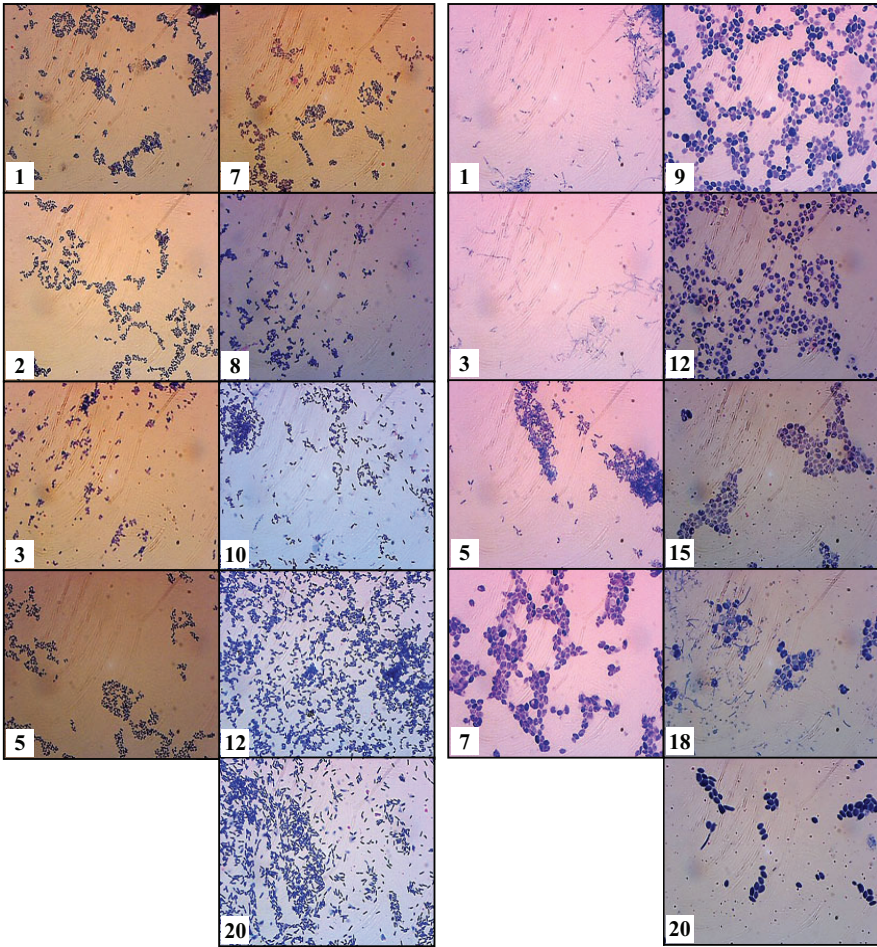


Рис. 43. Морфологічні ознаки та тинкторіальні властивості M. bovis 1176 варіанта дисоціативних форм, пасажованих через щільне живильне середовище × 1500

мами та незначною кількістю елементарних тілець; 9-та генерація в умовах термостата – L-формами та поодинокими некислотостійкими паличками та зернами.

8-ма генерація субкультури в умовах 3 °С культивування формувалася некислототійкими, переважно короткими та більш довгими, зернистими паличками й елементарними тільцями; 12-та генерація в умовах термостату – L-формами, елементарними тільцями та інколи короткими паличками.

У субкультурі 10-ї генерації за умов 3 °С культивування виявлені некислотостійкі, в основному короткі зернисті палички та поодинокі витончені

зернисті ниткоподібні форми й елементарні тільця; в субкультурі 15-ї генерації, за культивування у термостаті, виявлена значна кількість елементарних тілець (переважно некіслототійких) та L-форми.

Субкультура 12-ї генерації в умовах низької плюсової температури формувалася тільки некіслотостійкими, в основному короткими паличками та інколи зернами; субкультура 18-ї генерації в термостаті формувалася різноманіттям мікроорганізмів: L-форми, некіслотостійкі, довгі й короткі зернисті палички та елементарні тільця (окремі L-форми зруйновані, з яких виштовхуються зерна).

Субкультура 20-ї генерації в умовах 3 °С культивування продовжувала формуватися некіслотостійкими короткими й довгуватими зернистими паличками та інколи зернами; 20-ї генерації в умовах термостата формувалася переважно елементарними тільцями, L-формами та інколи зернистими некіслотостійкими паличками.

Отже, дослідження цього варіанта *M. bovis* дисоціативних форм засвідчило стабільність росту культури, морфологічних ознак й тинкторіальних властивостей мікроорганізмів у разі культивування за низьких плюсових температур (3 °С).

Відзначимо, що культивування в умовах термостата супроводжувалося динамічними змінами характеру росту культури, зміною морфологічних ознак та здатністю утримувати фарбу фуксину зміненими формами мікроорганізмів.

В останніх пересівах (культури), як і в культурі 117а варіанта, виявилися елементарні тільця, що аналогічно попередньому варіанту дисоціативних форм супроводжувалося зміною характеру росту колоній за температури 37 °С.

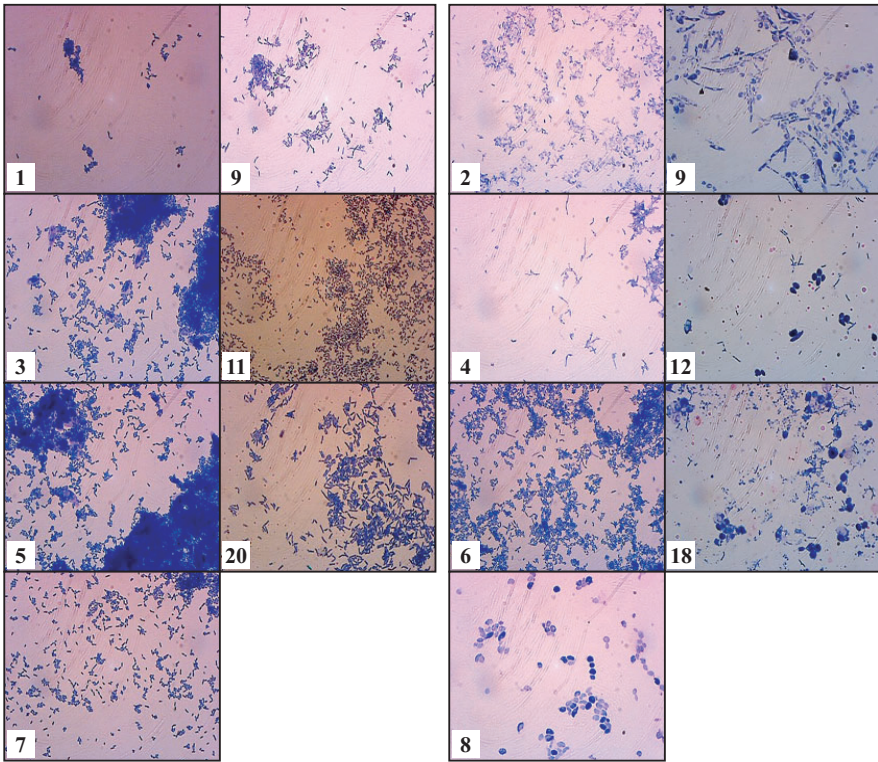
Вивчаючи *M. bovis* 117в варіанта перших генерацій (3 та 37 °С культивування), тобто вихідних мікроорганізмів, відмічено (рис. 44), що вони характеризувалися ознаками як некіслотостійкі, зернисті, короткі й довгі палички, зі значно більшою наявністю елементарних тілець в субкультурі, яка культивувалася в умовах термостата.

У 3-й генерації в умовах 3 °С культивування відмічені, так само, як і в першій, некіслотостійкі палички, а в умовах термостата (4 генерація) поміж елементарних, незначної кількості, тілець і паличок (коротких і більш довгих), були й ниткоподібні некіслотостійкі зернисті форми.

Субкультура 5-ї генерації мікобактерій продовжувала генерувати палички, а 6-а (в умовах термостата) – на тлі таких самих паличок і поодинокі L-форми. Елементарних тілець, як це реєструвалося в 1-й та 2-й субкультурах як таких мікобактерій практично не виявлено.

Суттєві відмінності встановлені у 8-й субкультурі, культивованої в умовах термостата: L-форми та поодинокі, з червонуватим відтінком елементарні тільця. 7 субкультура, яка одержана в умовах 3 °С культивування, продовжувала генерувати некіслотостійкі палички короткі і більш довгі.

Субкультура 9-ї генерації в умовах термостата вміщувала L-форми, ниткоподібні та короткі зернисті палички й елементарні, з червонуватим відтінком



*Рис. 44. Морфологічні ознаки та тинкторіальні властивості *M. bovis* 117в варіанта дисоціативних форм, пасажованих через щільне живильне середовище × 1500*

тільця. В умовах 3 °С культивування субкультура цієї ж генерації формувалася поодинокими елементарними тільцями, з червонуватим відтінком та паличками (короткими та більш довгими) зі зернами.

В 11-й субкультурі, одержаної в умовах 3 °С культивування, не виявлено суттєвих змін у мозаїці мікроорганізмів, водночас у 12-й субкультурі термостата вже не виявлялися довгі ниткоподібні мікроорганізми, натомість з'явилися (з більш вираженою кислотостійкістю) елементарні тільця.

20-а (3 °С) та 18-а (37 °С) субкультури характеризувалася відповідно попередньо описаними (11 та 12 субкультури) формами мікроорганізмів.

Отже, підсумовуючи особливості морфологічних форм та тинкторіальних властивостей мікроорганізмів 117в варіанта підкреслимо, що й вони мають практично однакову, з двома першими варіантами мікобактерій динаміку їх змін: в умовах низької плюсової температури (3 °С) розмножуються тільки палички та поодинокі елементарні тільця, а термостата – палички, L-форми, елементарні тільця. З появою останніх ріст культури змінився: через

2–4 тижні від початку росту вона нібито обрушувалася (провалювалася) в середовище й практично зникала. В умовах 3 °С культивування цього не спостерігалось – інтенсивність росту культури згодом зростала.

Вивчаючи мазки, приготовлені із 118 субкультури першої генерації, в умовах культивування за температури 3 °С, зареєстрована (рис. 45) наявність L-форм (видовжені овали, з деяких виштовхуються зерна внаслідок порушення цілісності оболонки овалів) та зернисті палички (короткі та більш довгі); в умовах термостата – тільки L-форми з різною оптичною густиною поверхні (практично круглої форми).

У 3-й генерації, в умовах 3 °С культивування, субкультуру формували L-форми (видовжені овали) та палички; у 4-й, в умовах термостата – L-форми та палички (як короткі, так і довгі).

5-а субкультура, в умовах низької плюсової температури, характеризувалася видовженими L-формами та значною кількістю зернистих невислужених форм. 7-а субкультура, в умовах термостата, формувалася практично L-формами – круглими та поодинокими, товстими зернистими короткими й довгими паличками.

У мазку 7-ї субкультури, що одержана в умовах температури 3 °С, виявлені видовжені L-форми, з яких продовжують звільнятися зернисті форми та коротенькі палички. Водночас у 9-й субкультурі термостата в полі зору мікроскопа, зафіксовані тільки L-форми, круглої форми та злегка червонуваті, поодинокі, елементарні тільця.

Мазок, приготовлений з 8-ї субкультури, що одержана за 3 °С культивування, характеризувався наявністю тих самих форм мікобактерій, що й в 7-й.

У мазку, приготовленому із 12-ї субкультури, що одержана в термостаті, виявлені L-форми та елементарні тільця з червонуватим відтінком.

У субкультурі 10-ї (3 °С) та 18-ї (37 °С) генерації суттєвих змін, порівняно з попередньою, не виявлено, хоча в першій і в другій культурах зафіксовано й наявність зернистих паличок.

У 12-й субкультурі (3 °С), так само, як і в попередніх, виявлено видовжені L-форми, з деяких звільняються зерна та палички короткі і довгі, та елементарні тільця; у 19-й субкультурі (37 °С) – L-форми, довгі, іноді ниткоподібні зернисті палички та елементарні тільця з червонуватим відтінком.

20-а (3 °С) та 21-а (37 °С) генерації характеризувалися тими ж морфологічними формами мікобактерій, що й 12 та 19-а.

Узагальнюючи динаміку морфологічних ознак, тинкторіальних властивостей та характер росту культур L-форм незаперечним є те, що й в цьому випадку вона подібна до тієї, що простежувалася з мікроорганізмом 117а, б, в варіантів *M. bovis* дисоціативних форм: в умовах низьких плюсових температур (3 °С) у часі генерувалися, на тлі стабільності культури, невислужені зернисті палички зі зменшенням їх кількості, порівняно з вихідною культурою, L-форми; в умовах термостата (37 °С) на тлі зменшення кількості та зміни морфології L-форм з'являються короткі й ниткоподібні форми та червонуваті елементарні тільця, що змінюють характер росту культури.

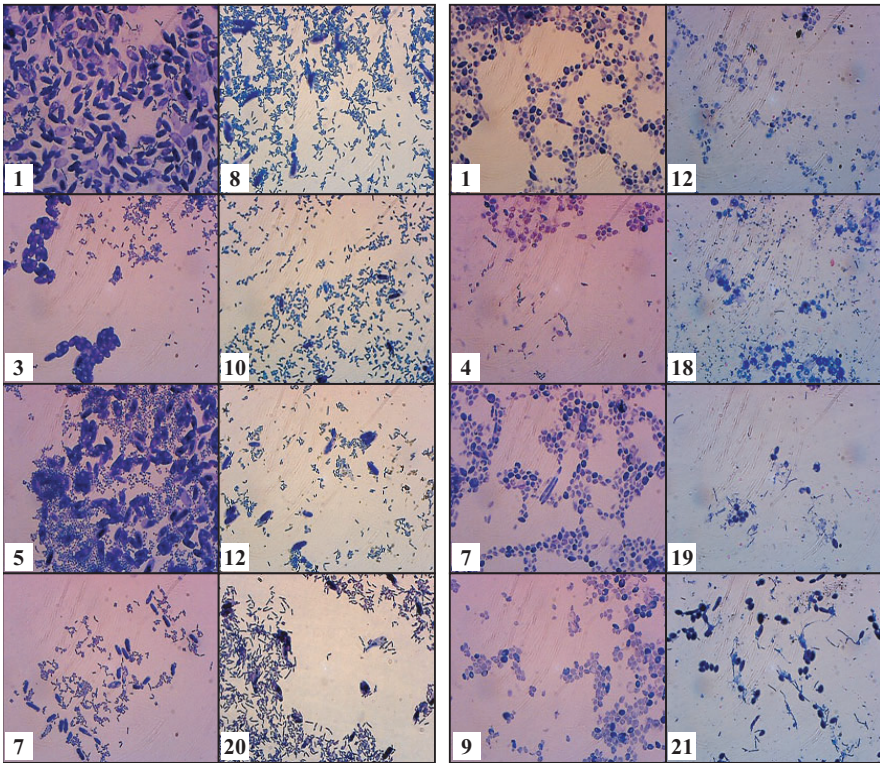


Рис. 45. Морфологічні ознаки та тинкторіальні властивості M. bovis 118 варіанту дисоціативних форм пасажованих через щільне живильне середовище × 1500

Водночас, незважаючи на загальну тенденцію формування культури з появою елементарних тілець в ній, в умовах термостата, все ж таки окремі клітини, і ми не можемо стверджувати, які саме (чи це L-форми чи елементарні тільця на тлі зникаючих субкультур усіх чотирьох варіантів, на які звернуто увагу раніше) спроможні інтенсивно розмножуватися, формувати окремі колонії. Саме в такій зникаючій субкультурі мікроорганізмів 117a варіанта в 24-й генерації на шосту добу культивування було виявлено ріст однієї колонії. Дослідивши мазок, приготовлений зі згаданої колонії, під імерсією мікроскопа виявлено, як і в попередніх мазках, не досить чітко сформовані з блідим фіолетовим відтінком L-форми та значну кількість кислотостійких елементарних тілець та, до цього не фіксовані в цій культурі, не кислотостійкі ниткоподібні форми, короткі палички й великі кислотостійкі зерна (0,3 мкм).

Поза сумнівом, наголосимо, такого спрямування робота з *M. bovis* дисоціативних форм проведена вперше. І, як засвідчили її результати, вона розкриває

велике значення температури в біології мікобактерій, їх досить швидко під її впливом конверсію (трансформацію) протягом двадцяти пересівів. При цьому температура, екстраполюючи на макроорганізм у цілому, може визначати динамічні зміни морфології, тинкторіальних показників: від типових кислостійких паличок до елементарних тілець. Останні, можна стверджувати, є кінцевим варіантом біологічного циклу розвитку зі збереженням геному, що дає початок відомій формі збудника туберкульозу. За цього не тільки палички трансформуються в елементарні тільця, але й L-форми, тобто більш висока, визначена попередниками як оптимальна для культивування мікобактерій температура стимулює, знову ж екстраполюючи і на макроорганізм ці результати дослідження, трансформацію мікобактерій в елементарні тільця, діагностувати які натепер не можливо, особливо диференціювати їх від інших, що утворюються з багатьох відомих видів грампозитивних бактеріальних форм.

Разом з цим низькі плюсові температури (3 °C) стабілізують морфологічні форми та тинкторіальну властивість і, що важливо, L-форми трансформуються в зерна, палички різної форми й довжини, що не утримують фуксин.

Грунтуючись на знаннях патогенезу туберкульозу, необхідно враховувати одержані результати досліджень, і зокрема, те, що стосується клітинного імунітету, тобто фагоцитозу.

Традиційно відомо, що фагоцитуються бактеріальні клітини розміром 300 нм, клітини менших розмірів не помічаються й не захоплюються мікро- і макрофагами.

Оскільки елементарні тільця значно менші за мікобактерії, то стає очевидним, що вони не захоплюються фагоцитами, персистуючи в кров'яному потоці, проникаючи (можливо в еритроцити) та осідаючи в клітинах різних тканин.

Наші досліді, проведені в попередні роки з визначення у досліджуваного в цій роботі штаму патогенності пасажованих мікобактерій, у тому числі й культур, що вміщували й елементарні тільця, засвідчили відсутність цієї властивості у таких форм мікроорганізма. Проте не можна, на наш погляд, стверджувати відсутність патогенності в елементарних тілець, що потребує більш поглибленого вивчення цього питання шляхом пасажів через морських свинок.

Однак повідомлення вчених з цього приводу свідчать про наявність такої властивості в елементарних тілець. Тому, враховуючи цей аспект проблеми, можна з високою вірогідністю стверджувати, що елементарні тільця, персистуючи в макроорганізмі, відіграють, якщо не головну роль в розвитку інфекційного процесу, то принаймні досить суттєву, оскільки вони не діагностуються й не диференціюються відомими у ветеринарній медицині методами, а відтак й не встановлена їх патогенетична значимість.

Усе це, з погляду на поняття інфекції, інфекційного й епізоотичного процесів, важко переоцінити. Непізнаність біологічних властивостей дисоціативних форм у контексті біологічних властивостей потребує подальших різносторонніх досліджень, й зокрема впливу рН середовища на деякі властивості мікобактерій та їх культуру.

3.2.6. Вплив вмісту кислотно-лужних грам-еквівалентів (рН) середовища на морфологію, тинкторіальні властивості та пігментотворення *M. bovis* дисоціативних форм

Для проведення такого дослідження використали *M. bovis* дисоціативних форм 117а, б, в, та 118 варіантів, що пасажувалися 26–27 разів через середовище з рН 7,1–7,2 за температури 3 °С. З цією метою провели 15 прямих пересівів культури кожного з варіантів (з 26 чи 27 генерації) на таке саме щільне ячне середовище тільки з рН 6,5 і культивували за такої ж температури (3 °С).

Чому визначено рН середовища 6,5? Це обумовлено результатами наших багаторічних попередніх досліджень, якими показано, що рН середовища суттєво підвищує активність метаболічних процесів мікроорганізму, інтенсивність розмноження та відповідно формування колоній з одночасною поступовою втратою патогенності та інших властивостей на тлі набуття нових, які не виявлялися у мікобактерій вихідної материнської популяції.

Пересіви мікобактерій на середовище з рН 7,1–7,2 супроводжувалися ростом жовтуватого кольору культури у вигляді суцільного росту по лінії посіву бактеріологічною петлею на другу–третю добу культивування.

Провівши, розпочинаючи з 26-ї субкультури 117а варіанта, яка культивувалася на середовищі з рН 7,1–7,2, 15 пересівів мікобактерій на середовище з рН 6,5 нами відмічено деякі відмінності як у часі та інтенсивності формування культури, її забарвлення, так і в морфологічних ознаках, тинкторіальних властивостях мікобактерій.

Як засвідчили результати роботи (рис. 46, 47), мікобактерії першого пересіву на 24-у годину культивування стимулювали ріст жовтуватого кольору культури по лінії посіву. Наступні пересіви характеризувалися такими ж показниками, хоча, розпочинаючи вже із 30-ї генерації, макроскопічно видимий ріст культури відмічався з 15 год дослідження.

Через 2–3 тижні пігмент культури набував вираженого помаранчевого кольору, який зберігався весь період дослідження (2 місяці).

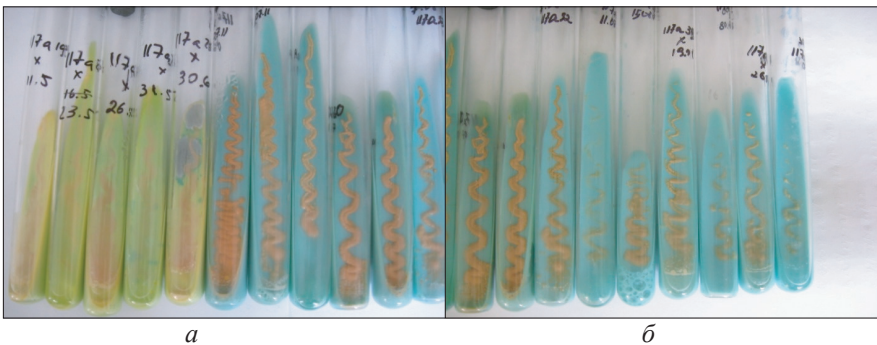


Рис. 46. Культури *M. bovis* 117а варіанта дисоціативних форм:
а – на середовищі рН 7,1–7,2; б – 6,5

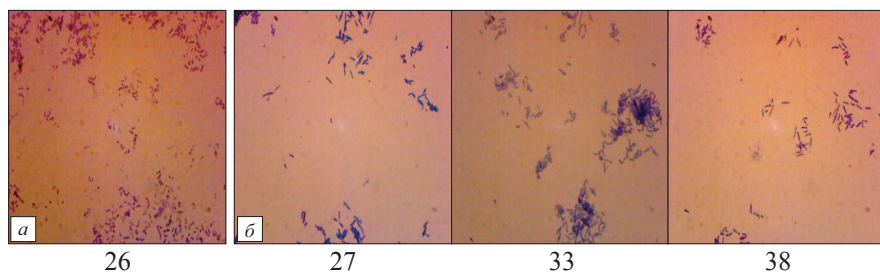


Рис. 47. Мікобактерії 117а варіанта дисоціативних форм, фарбованих за Цілем-Нільсеном: а – 26 генерація (рН середовища 7,1–7,2); б – 27; 33; 38 генерації (рН середовища 6,5) × 1500

Значні зміни, щоб їх можна було б аналізувати, виявлені й в морфології та тинкторіальних властивостях досліджуваних *M. bovis* дисоціативних форм. Якщо в 26-й генерації мікобактерії, які культивувалися на середовищі з рН 7,1–7,2, виявлялися, як правило, зернисті й подекуди паличкоподібні прямі кислото- та некислотостійкі форми, то в 27-й – переважали некислотостійкі, в основному досить довгі прямі із зернами форми. У 33-й та 38-й генераціях виявлено такі ж форми мікобактерій, що й в 27-й генерації, щоправда, подекуди виявлялися досить довгі мікроорганізми. Водночас на такому тлі зафіксовано й великі кулеподібні утворення з однаковою густиною поверхні: такі утворення розміщуються на кінці паличкоподібних форм як прямих, так і вигнутих.

Мікобактерії 117б варіанта 27-ї і в наступних генераціях проявляли (рис. 48, 49) подібний до попередньої генерації ріст культури: на 24-у год з подальшим, розпочинаючи з 30-ї генерації, утворенням макроскопічно видимої культури на 15 год та помаранчевого пігменту у динаміці культивування.

Приготувавши мазки з 26; 27; 33 та 38-ї генерацій під імерсією мікроскопа виявили в 26-й генерації некислотостійкі зерна, короткі й подекуди більш довгі ланцюгоподібні (5–6 зерен) форми, 27 та 33 генерації формувалися



Рис. 48. Культури *M. bovis* 117б варіанту дисоціативних форм: а – на середовищі з рН 7,1–7,2; б – 6,5

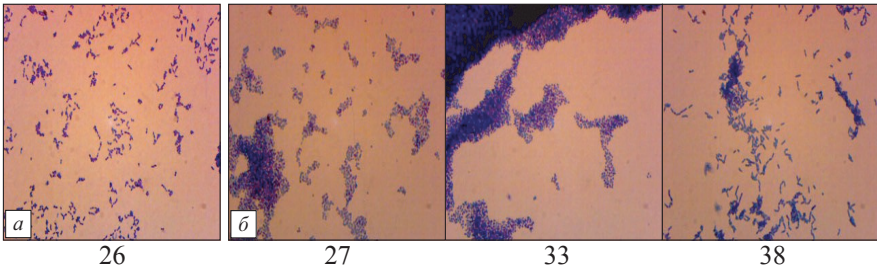


Рис. 49. Мікобактерії 117b варіанта дисоціативних форм, фарбованих за Цілем-Нільсеном: а – 26 генерація (рН середовища 7,1–7,2); б – 27, 33, 38 генерації (рН середовища 6,5) × 1500

тільки некіслотостійкими та інколи зернистими кислотостійкими формами. Мікобактерії 38-ї генерації утворювали культуру, яка не відрізнялася від 27 та 33-ї, проте за морфологією – традиційної довжини (5–7 мкм) та в більшості довгі, майже ниткоподібні сформовані з чітко видимих зерен палички. В окремих випадках на таких формах мікроорганізмів вміщуються овальні утворення з однаковою густиною поверхні.

Мікобактерії 117b варіанта 27-ї генерації на середовищі з рН 7,1–7,2 утворювали культуру (рис. 50, 51), яка подібна до такої, що формувалися мікроорганізми 117a і б варіантів.

З висівом мікобактерій і в подальших їх пасажах через середовище з рН 6,5 цей варіант дисоціативних форм також як і попередні два варіанти (117a і б) утворювали на початку на 24, а далі на 15 год досліді культуру, яка інтенсивно збільшувалася в об'ємі і вже на 48 год виглядала як товстий тяж (2–3 мм товщиною) по лінії висіву та утворювала згодом виражений помаранчевий пігмент.

У приготовлених мазках з 27-ї (середовище з рН 7,1–7,2), 28, 34 та 39-ї генерацій (середовище з рН 6,5) під імерсією мікроскопа виявлено в пер-

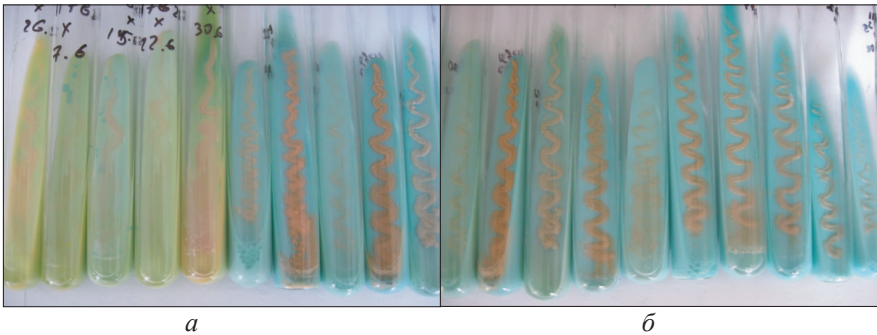


Рис. 50. Культури *M. bovis* 117b варіанта дисоціативних форм: а – на середовищі з рН 7,1–7,2; б – рН 6,5

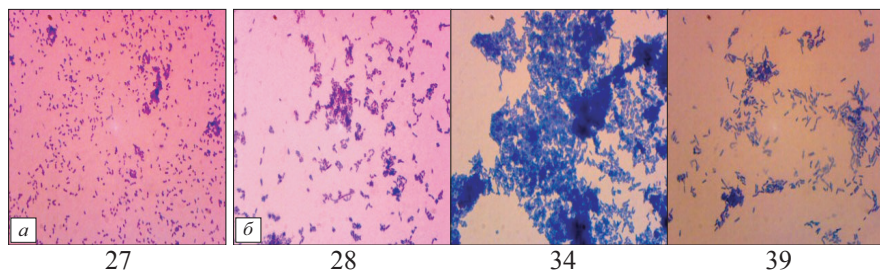


Рис. 51. Мікобактерії 117в варіанта дисоціативних форм, фарбованих за Цілем-Нільсеном: а – 27 генерація (рН середовища 7,1–7,2); б – 28, 34, 39 генерації (рН 6,5) × 1500

шому випадку дрібні й зернисті, в переважній більшості некіслотостійкі мікроорганізми, в другому, зокрема в 28 генерації, – переважно товсті зернисті, як правило, вигнуті некіслотостійкі та подекуди кислотостійкі палички, в 34 та 39 генераціях – некіслотостійкі, довгі зернисті форми та некіслотостійкі кулеподібні й овалоподібні утворення з однаковою густиною поверхні.

Оцінюючи характер росту культур 118 варіанта (L-форми) 26-ї (середовище з рН 7,1–7,2) і наступних з 27-ї по 37-му генерації, відмічено (рис. 52, 53) загальну, встановлену в попередніх дослідах закономірність їх формування та вигляду: культури на середовищі з рН 6,5 з часом, через 2–3 тижні набувають інтенсивного помаранчевого кольору, на середовищі з рН 7,1–7,2 такими ж і залишаються протягом трьох місяців культивування.

Вивчаючи під імерсією мікроскопа мазок, приготовлений з культури мікобактерій 26-ї генерації, культивованих на середовищі з рН 7,1–7,2, відмічено переважну більшість некіслотостійких зернистих форм, інколи (рідко) кислотостійкі палички та, досить рідко, товсті (15–20 мкм)

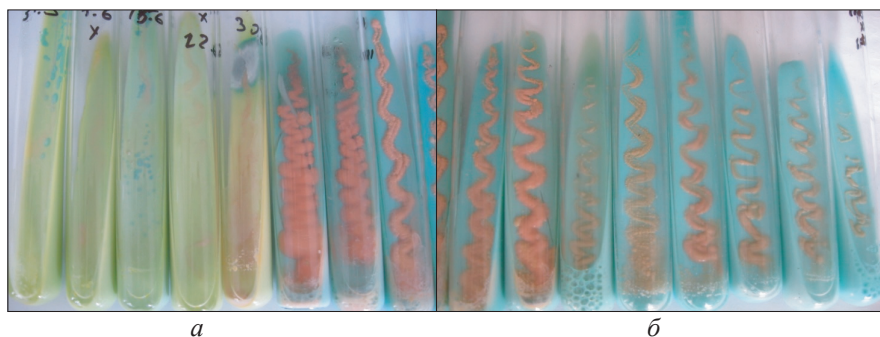


Рис. 52. Культури *M. bovis* 118 варіанта дисоціативних форм: а – на середовищі з рН 7,1–7,2; б – рН 6,5

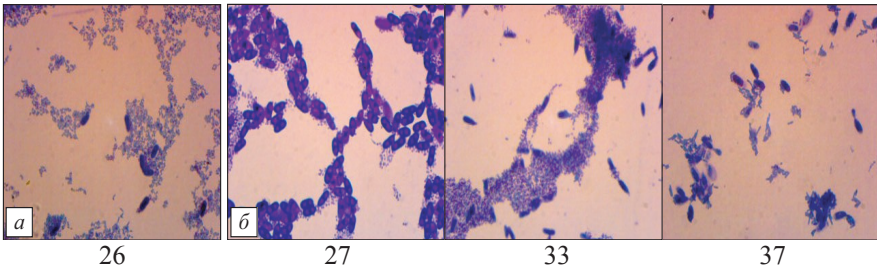


Рис. 53. Мікобактерії 118 варіанта дисоціативних форм, фарбованих за Цілем-Нільсеном: а – 26 генерація (рН середовища 7,1–7,2); б – 27, 33, 37 генерації (рН середовища 6,5) × 1500

темно-сині палички з однаковою густиною поверхні. Перший пересів таких різних форм з 26 генерації на середовище з рН 6,5 супроводжувався появою значної кількості синіх овалоподібних форм з різною оптичною густиною поверхні, дрібних зерен, інколи з червоним відтінком, які розташовуються тільки навколо і поблизу овалів (синіх). Це обгрунтовує думку про те, що такі зерна виштовхуються з овалів. Подібне виявлено в мазку, приготовленому з культури 33-ї генерації; проте з незначною кількістю синіх утворень, які набули форми товстих синіх паличок, але й на і поблизу них (або виштовхуються з них) знаходяться дрібні некіслотостійкі зернисті форми (0,1–0,2 мкм). Типових форм паличок збудника туберкульозу в цій і попередній генераціях (навіть некіслотостійких) не виявлялося.

Через 15 місяців у 27-й незмінній за виглядом і формою субкультурі 117а варіанта під імерсією мікроскопа виявлено (рис. 54) некіслотостійкі з нечіткими, розпливчастими контурами зернисті короткі й більш довгі (>7 мкм) палички та елементарні кіслотостійкі тільця.



Рис. 54. Елементарні тільця, які реверсували з некіслотостійких форм *M. bovis* протягом 15-ти місяців культивування в умовах температури 3 °С × 1500

У 27-й також незмінній субкультурі 117б і 117в варіантів виявлено некіслотостійкі короткі зернисті палички та поодинокі, також некіслотостійкі, зерна.

У незмінній за виглядом і формою 118-й субкультурі 27 генерації виявлені некіслотостійкі короткі й більш довгі зернисті палички та овальні форми.

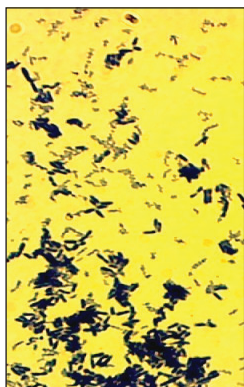
Отже, можна відзначити, зіставляючи ці дані з результатами мікроскопічних досліджень 15-місячної давнини, що кардинальні зміни в морфології та тинкторіальних властивостях зареєстровані тільки в одному з чотирьох аналізованих варіантів мікобактерій – 117а. Тут за систематичних пасажів через штучне живильне середовище виявлялися лише некіслотостійкі короткі та більш довгі палички, а через 15 місяців знахо-

дження культури в таких самих умовах (3 °С) з'явилися й кислотостійкі, тільки елементарні тільця.

Необхідно зазначити важливий факт того, що в попередніх дослідах, коли нами (Ковальова Л.О., Ткаченко О.А., 2010) вивчалася реверсія мікобактерій з некислотостійких ниток, виявляли кислотостійкі палички, тобто з ниток виштовхувалися некислотостійкі, та інколи кислотостійкі зерна, а з них уже формувалися кислотостійкі палички.



Рис. 55.
Культура *M. bovis*
дисоціативних форм
117а варіанта
(45 пасаж за 3 °С)



*Рис. 56. *M. bovis**
дисоціативних форм
117а варіанта
(45 пасаж за 3 °С)
× 1500

Можливо, ці зміни морфогенезу зумовлені тривалим впливом на метаболізм (активність певних генів) мікробної клітини за час перебування в умовах низької плюсової температури, про що детально описано в попередньому розділі роботи, а може, то є закономірний цикл розвитку цього варіанта мікобактерій. Ця остання думка аргументовано підтверджується тим, що за пасажів цього варіанта мікобактерій в умовах температури 37 °С на відміну від 3 °С, коли утворювалися тільки некислотостійкі палички, генерувалися кислотостійкі елементарні тільця й в незначній кількості L-форми, які фіксували в попередніх субкультурах.

*Культуральні властивості та морфологія *M. bovis* дисоціативних L- та інших форм 40 та 50-ї субкультур.* Зміни морфології, тинкторіальних властивостей пасажованих *M. bovis* динамічні й залежать від умов культивування й кількості репродуктивних циклів. Це очевидно. Тому цікавими, а відтак й необхідними, виявилися наступні дослідження цієї ознаки й властивості *M. bovis* дисоціативних форм за пасажів через щільне живильне середовище за температури 3 °С культивування. За 37 °С, як засвідчили попередні дослідження, неможливими виявилися такі пересіви, оскільки культура мікобактерій через 2–3 тижні практично зникала, умовно провалюючись по лінії росту в середовище.

Усього проведено 10 пересівів. У результаті досліджень встановлено, що 117а варіант дисоціативних форм *M. bovis* з 41 по 45 пересів утворювали суху культуру на другу–п'яту добу жовто-помаранчевого кольору, з подальшим її збільшенням по лінії висіву (*рис. 55*).

Приготувавши мазок з одержаної культури, виявили товсті довгі, короткі з зернами некислотостійкі палички (*рис. 56*). Зустрічаються окремі зерна та ниткоподібні форми, які формуються окремими невеликими (0,6–0,7 мкм) зернами.

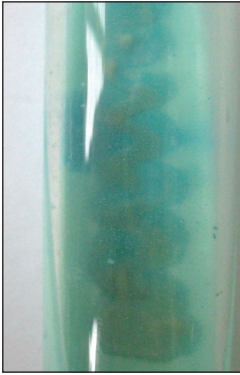
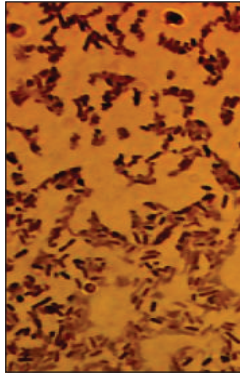


Рис. 57.
Культура *M. bovis*
дисоціативних форм
117а варіанта
(50 пасаж за 3 °С)



*Рис. 58. *M. bovis**
дисоціативних форм
117а варіанта
(50 пасаж за 3 °С)
× 1500

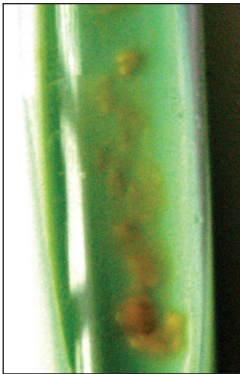
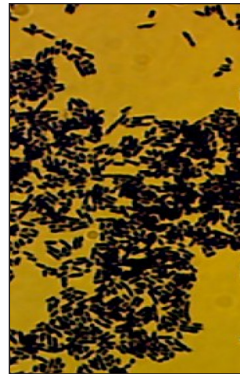


Рис. 59.
Культура *M. bovis*
дисоціативних форм
117б варіанта
(45 пасаж за 3 °С)



*Рис. 60. *M. bovis**
дисоціативних форм
117б варіанта
(45 пасаж за 3 °С)
× 1500

палички, хоча інколи зустрічаються й більш короткі (*рис. 60*).

Провівши ще п'ять пасажів мікобактерій цього варіанта через щільне живильне середовище, встановлено, що первинний ріст культури відмічався в основному на першу–третю добу (за винятком 48 пересіву – ріст культури зафіксовано на 34 добу). Напочатку росту культури мали світло-кремовий, а через 2–3 тижні – помаранчеве забарвлення. Розпочинаючи з 47 пересіву, культура мікобактерій почала змінюватися: зі сухої до вологої в'язкої зі зміною й її кольору (*рис. 61*).

Провівши ще п'ять наступних пересівів мікобактерій цієї культури, відмічали, що швидкість її росту не змінилася – 2–5 діб. Проте інтенсивність накопичення маси дещо знизилася й вона виявилася з 45 пересіву слизовою, порівняно з 41–45 пасажами, зі збереженням кольору культури (*рис. 57*).

Вивчаючи мазок під імерсією, який приготували з одержаної 50-ї субкультури, встановлено (*рис. 58*), що морфологія клітин дещо змінилася відносно до таких 45 пасажу: зникли дрібні палички та зерна. Водночас клітинна стінка мікроорганізмів стала червоноуватого кольору, але зерна залишилися темно-синіми.

Дослідивши швидкість росту мікобактерій 117б варіанта з 41 по 45 пересів, виявлено, що первинний ріст суховатої культури світло-кремового кольору спостерігався з четвертої доби висіву завису мікроорганізмів (*рис. 59*). У приготовленому з цієї культури (45 пересів) мазка та зафарбованого за Цілем-Нільсенем, під імерсією виявлено практично однорідні некислотостійкі товсті зернисті па-



Рис. 61.
Культура *M. bovis*
дисоціативних форм
117в варіанта
(50 пасаж за 3 °С)



*Рис. 62. *M. bovis**
дисоціативних форм
117в варіанта
(50 пасаж за 3 °С)
× 1500



Рис. 63.
Культура *M. bovis*
дисоціативних форм
117в варіанта
(45 пасаж за 3 °С)
× 1500



Рис. 64.
Культура *M. bovis*
дисоціативних форм
117в варіанта
(50 пасаж за 3 °С)
× 1500

Дослідивши мазок, при-
готовлений з 50 субкультури,
під імерсією мікроскопа ви-
явлено некислотостійкі тонкі,
порівняно з 45 генерацією,
зернисті, інколи більш довгі
палички (*рис. 62*).

Аналізуючи характер рос-
ту мікобактерій 117в варіанта
з 41 по 50 пересів, відзначи-
мо, що з 41 по 45 пасаж пер-
ші світло-кремові колонії у
вигляді суцільного нальоту
та формування в наступні дні
культивування на такому полі
окремих досить великих ко-
лоній (*рис. 63*) фіксувалися з
другої по п'яту добу (з подаль-
шим збільшенням та набуттям
відтінку помаранчевого кольо-
ру), інші – з 46 по 50 пасаж –
утворювали подібну культуру
в період з третьої по шосту
добу практично такого ж зо-
внішнього вигляду (*рис. 64*).

Водночас нами не зарее-
стровано відмінностей в кон-
систенції культури (колоній),
які відмічалися в двох по-
передніх варіантах (117а, б):
протягом 10 пасажів субкуль-
тури залишалися сухувати-
ми. Проте їх утворювали, як
показали наступні мікроско-
пічні дослідження, різні за
формою та й тинкторіальни-
ми властивостями дисоціа-

тивні мікроорганізми. Так, 45 субкультура (*рис. 65*) формувалася тільки не-
кислотостійкими мікобактеріями, проте різних морфологічних форм: зерна,
короткі й довгі, інколи вигнуті палички з чіткою зернистістю (часто зерна
відділяються вузькими частинами, що може визначатися як щільне розта-
шування окремих зерен); 50-а субкультура (*рис. 66*) утворювалася некисло-
тостійкими в переважній більшості зернистими формами. Але, зустрічалися
й поодинокі товсті довгі зігнуті палички. Між тим серед зерен виявляються



Рис. 65. M. bovis
дисоціативних форм
117в варіанту
(45 пасаж за 3 °С)
× 1500

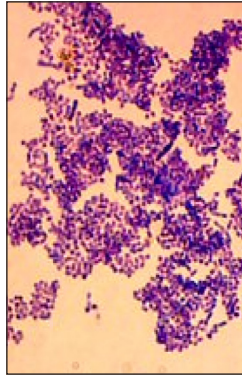


Рис. 66. M. bovis
дисоціативних форм
117в варіанту
(50 пасаж за 3 °С)
× 1500

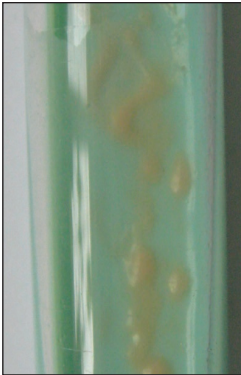


Рис. 67.
Культура M. bovis
дисоціативних форм
118 варіанту
(45 пасаж за 3 °С)



Рис. 68. M. bovis
дисоціативних форм
118 варіанту
(45 пасаж за 3 °С)
× 1500

й такі форми, які частково утримують фуксин, що надає їм червонуватий відтінок.

Якщо три попередні 117а, б, в варіанти в загальному характеризувалися подібними морфологічними ознаками та тинкторіальними властивостями мікобактерій дисоціативних форм, то 118 субкультура в динаміці пасажів мала майже протилежні відмінності в основному, що стосується морфології й характеру фарбування за Цілем-Нільсенем.

У перші п'ять пасажів (з 41 по 45) ріст культури почався з 4 доби, як правило, у вигляді кремового нальоту по лінії посіву з подальшим формуванням окремих великих сухих колоній помаранчевого кольору (рис. 67). Проте 45 субкультура виявилася слизовою та в'язкою. У мазку, приготовленому з 45 субкультури, під імерсією мікроскопа виявлені некіслотостійкі зернисті та некіслотостійкі великі (у 6 разів більші за палички) видовжені овали з однаковою густиною поверхні, з яких через ушкоджену клітинну стінку виштовхуються короткі палички (рис. 68).

У наступні п'ять пересівів культура залишалася слизо-

вою, але її ріст починався через одну–шість днів, зі зміною пігменту: з помаранчевого на жовтуватий (рис. 69).

У полі зору мазка, приготовленого з культури 50 пересіву, виявлено принципово інші форми мікроорганізмів: на тлі некіслотостійких коротких, майже зернистих форм паличок відмічено кислотостійкі мікобактерії (рис. 70).

Отже, дослідження засвідчило, що культивування *M. bovis* дисоціативних форм в умовах низьких плюсових температур (3 °С) супроводжується на тлі стабільності утворення пігменту динамічними змінами характеру культури,

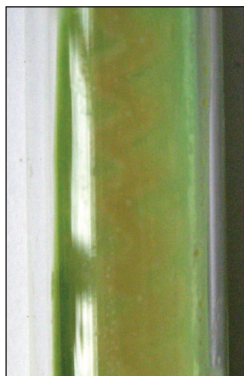


Рис. 69.
Культура *M. bovis*
дисоціативних форм
118 варіанта
(50 пасаж за 3 °С)

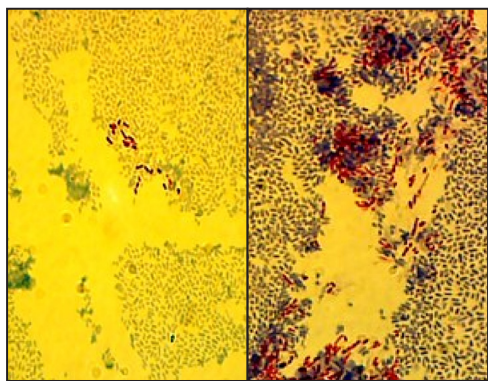
морфологічних ознак та тинкторіальних властивостей. Для мікобактерій 117а, б, в варіантів така температура є більш стабілізуючим чинником, ніж для мікобактерій 118 пересіву. Якщо перші стабільно залишалися неокислотостійкими, то другі (118 варіант) принципово змінилися й реверсували в кислотостійкі.

Підсумовуючи та обмірковуючи дані досліджень дисоціативних форм *M. bovis* 117а, б варіантів, можна побачити певну закономірність морфологічних ознак та тинкторіальних властивостей мікроорганізмів залежно від температурних умов культивування: за температури 3 °С – морфологічні форми та їх тинкторіальні властивості були практично стабільними протягом 20-разових пересівів; за температури 37 °С – динамічно змінюються морфологія та тинкторіальні властивості й характер росту культури з часу появи в популяції досліджуваних мікроорганізмів елементарних тілець. З появою останніх

ріст культури змінився: через 2–4 тижні від початку росту вона начебто провалювалася в середовище й практично зникала. В умовах низьких плюсових температур (3 °С) цього не спостерігалось, але інтенсивність росту культури згодом зростала.

Мікроорганізми 117в варіанта, маючи практично однакову з двома першими варіантами динаміку морфо-тинкторіальних змін у цілому, в умовах 3 °С культивування розмножуються тільки палички та поодинокі елементарні тільця, а термостата (37 °С) – палички, L-форми, елементарні тільця.

Узагальнюючи динаміку морфологічних ознак, тинкторіальних властивостей та характер росту культур L-форм (118 генерація), стає незаперечним



*Рис. 70. *M. bovis* дисоціативних форм*
118 варіанта (50 пасаж за 3 °С)
× 1500

те, що й в цьому випадку вона подібна до такої, яка простежувалася з мікроорганізмом 117а, б, в варіантів: в умовах 3 °С культивування в часі генерували, на тлі стабільності культури, неокислотостійкі зернисті палички зі зменшенням кількості, порівняно з вихідною культурою, L-форм; в умовах термостата (37 °С) на тлі L-форм та паличок з'являлися червонуваті елементарні тільця, що змінювали характер росту культури.

Водночас, аналізуючи попередні матеріали та повертаю-

чись до їх даних, можна стверджувати, що за 3 °С культивування відбулася певна стабілізація культуральних властивостей та морфології досліджуваних дисоціантів. Проте деякі з них мають здатність до реверсії. Це обґрунтовує наступні пересіви та з'ясування, окрім стабілізації згаданих властивостей, подальшої конверсії.

3.2.7. Дослідження культуральних, тинкторіальних властивостей та морфології *M. bovis* чотирьох дисоціативних форм 100, 110 та 120 генерацій

Для цього дослідили під імерсією мазки, приготовлені із субкультур (60, 70, 80, 90), які одержані за систематичних пересівів на живильне середовище Левенштейна-Йенсена та культивованих за умов 3 °С.

У результаті досліджень з'ясовано, що протягом численних пасажів через щільне живильне середовище визначені властивості та морфологія *M. bovis*, а дисоціантів залишалися практично незмінними.

Тинкторіальні властивості та морфологія дисоціативних форм 60, 70, 80, 90 генерацій представлені на *рис. 71*: у 60 генерації (1) – 117а – некіслотостійкі палички; 117б (5) – некіслотостійкі коки; 117в (9) – некіслотостійкі палички та коки; 118 (13) – некіслотостійкі коки та овали (L-форми); у 70 генерації – 117а (2) – некіслотостійкі палички; 117б (6) – некіслотостійкі палички; 117в (10) – некіслотостійкі палички та коки; 118 (14) – некіслотостійкі палички, коки та овали (L-форми); у 80 генерації – 117а (3) – некіслотостійкі коки; 117б (7) – некіслотостійкі палички та коки; 117в (11) – некіслотостійкі та кислотостійкі коки, великі некіслотостійкі овали (L-форми); 118 (15) – некіслотостійкі коки та великі некіслотостійкі овали (L-форми);

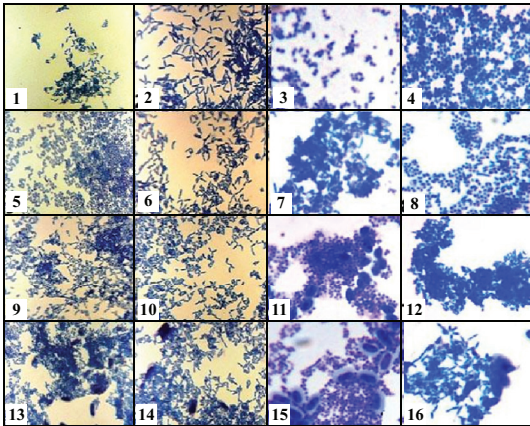


Рис. 71. Морфологія та тинкторіальні властивості M. bovis дисоціативних форм × 1500

у 90 генерації – 117а (4) – некіслотостійкі коки; 117б (8) – некіслотостійкі коки; 117в (12) – некіслотостійкі палички та коки; 118 (16) – некіслотостійкі палички та великі некіслотостійкі овали (L-форми).

Утім необхідно підкреслити, що з наступним пасажуванням (до 95 пересіву) досліджуваних дисоціативних *M. bovis* L- та інших форм не відбулося суттєвих видимих змін в культуральних, тинкторіальних властивостях та морфології. Так, в 95-у пересіві та культиву-

вання за 3 °С нами встановлено таку саму, як і в попередніх пасажах, швидкість формування культури з помаранчевим забарвленням, а за мікроскопії виявлені описані вище морфологічні некіслотостійкі форми дисоціативних варіантів (рис. 72, 73). Це переконливо може свідчити про стабілізацію основних біологічних властивостей дисоціативних форм, оскільки багаторазові пересіви не вплинули на властивості, які спостерігалися за пересівів перших субкультур дисоціативних форм практично до 50–60 пасажу.

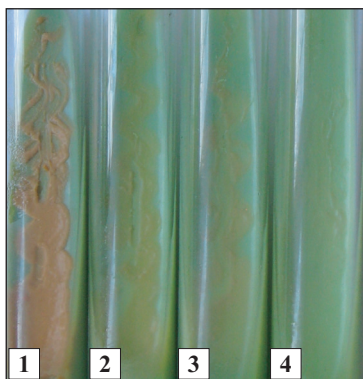


Рис. 72. Ріст культури *M. bovis* дисоціативних форм 95 генерації (за 3 °С культивування):

1 – 117а; 2 – 117б;
3 – 117в та 4 – 118

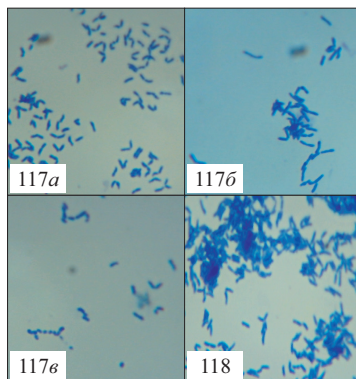


Рис. 73. *M. bovis*, пасажовані 95 разів через щільне живильне середовище за 3 °С культивування × 1500

Того ж часу в попередніх матеріалах цього видання наголошувалося на втраті здатності 40–50 генерації дисоціативних форм *M. bovis* інтенсивно культивувалися за 37 °С. У зв'язку з цим було допитливим та необхідним з'ясування такого явища в багаторазово пасажованих мікобактерій досліджуваних штамів.

Результат міг підтвердити або ж спростувати виявлену закономірність та більш аргументовано стверджувати про отриманий незвичайний феномен, який безумовно передбачений біологією збудника туберкульозу. Для цього досліду використали *M. bovis* дисоціативних форм, які 60 разів пересівали через щільне живильне середовище Левенштейна-Йенсена та культивували тільки за 3 °С.

Дослідженнями культуральних властивостей дисоціативних форм *M. bovis* 100-ї та наступних генерацій (табл. 39; рис. 74, 75) було встановлено, що в разі пасажування субкультур 117а, 117б, 117в та 118 за температури 37 °С ріст колоній спостерігався на 8–14 добу; методом прямого пересіву зазначених субкультур вдалося отримати лише три генерації – від 101 до 103. У динаміці пересівів спостерігалася тенденція до затримки росту субкультур. На початку культивування ріст культур відмічався на 8–10 добу, а в наступних пересівах на 13–14 добу з тенденцією до припинення росту.

**39. Ріст субкультур *M. bovis* дисоціативних форм
117a, 117б, 117в та 118, культивованих за 3 та 37 °С ***

№ пасажу	Субкультура							
	117a		117б		117в		118	
	температура, °С							
	3	37	3	37	3	37	3	37
101	6	9	7	8	8	8	8	10
102	9	14	8	11	9	12	7	13
103	6	13	6	14	5	13	7	13
104	5	–	6	–	5	–	6	–
105	5	–	6	–	5	–	6	–
106	4	–	5	–	6	–	5	–
107	4	–	5	–	4	–	6	–
108	4	–	5	–	4	–	5	–
109	4	–	5	–	4	–	5	–
110	4	–	5	–	4	–	5	–
111	4	–	5	–	4	–	4	–
112	4	–	5	–	4	–	5	–
113	4	–	4	–	5	–	4	–
114	4	–	5	–	5	–	4	–
115	4	–	4	–	5	–	4	–
116	4	–	5	–	4	–	4	–
117	4	–	4	–	5	–	4	–
118	4	–	4	–	4	–	4	–
119	4	–	4	–	4	–	4	–
120	4	–	4	–	4	–	4	–

* (–) – ріст відсутній.

За температури 3 °С культури *M. bovis* дисоціативних форм 117a, 117б, 117в та 118 одержано від 101 до 120 генерацій; ріст субкультур спостерігався на 6–8 добу, при чому наприкінці дослідження від 106 до 120 генерації спостерігалось пришвидшення росту згаданих субкультур до 4–5 діб.

Отже, експериментальні дослідження засвідчили закріплення у мікобактерій здатності на генетичному рівні розмножуватися за 3 °С і не розмножуватися за 37 °С. Прояв здатності мікобактерій розмножуватися та формувати культуру в перших пересівах за 37 °С після тривалого культивування за багаторазових пасажів при 3 °С може доводити потенційну здатність розмножуватися тільки певний час в незвичайних температурних режимах, які для патогенних мікобактерій є оптимальними.

Проте цього не спостерігається у мікобактерій патогенних штамів, оптимальна температура культивування яких становить 37 °С: культивування за

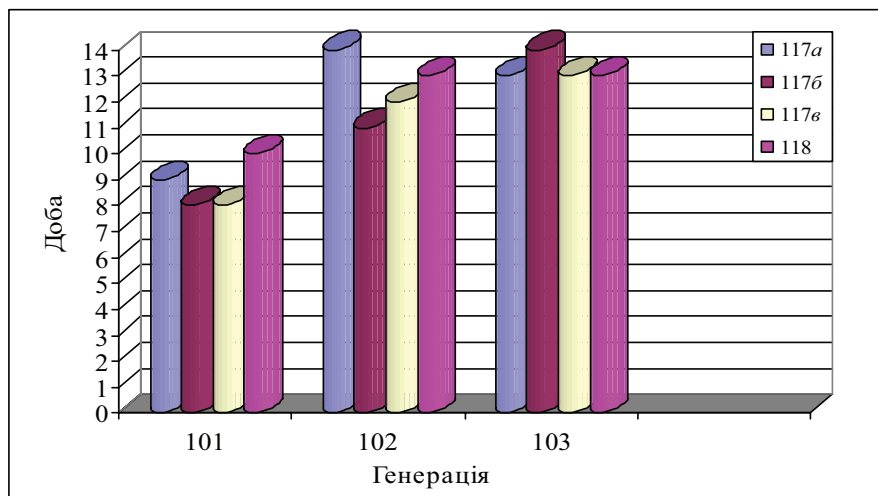


Рис. 74. Початок росту дисоціативних форм *M. bovis* субкультур 117а, 117б, 117е та 118, культивованих за температури 37 °С

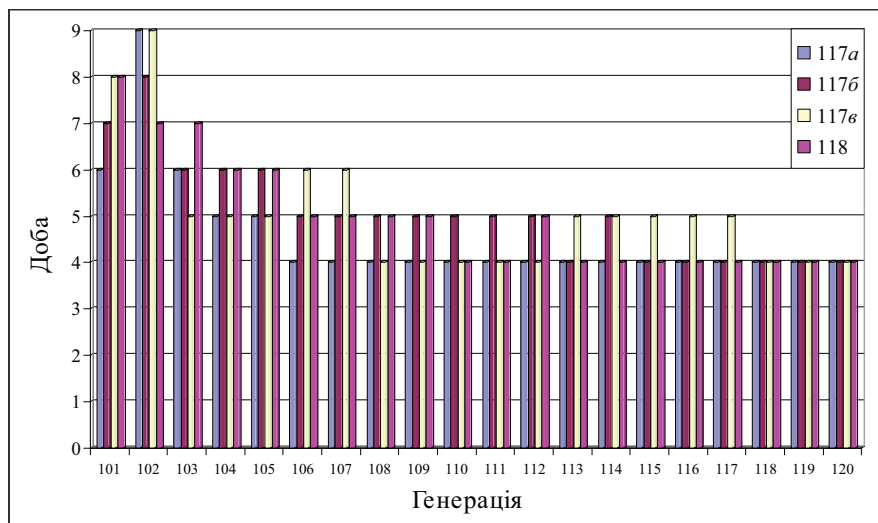


Рис. 75. Початок росту дисоціативних форм *M. bovis* субкультури 117а, 117б, 117е та 118, культивованих за 3 °С

нижчої температури не супроводжується розмноженням та утворенням культури. Для цього необхідні, як показано в цій книзі раніше, багаторазові пересіви та тривале культивування за 3 °С.

Водночас вихідні культури 100-го пересіву *M. bovis* дисоціативних форм мали такий колір колоній: субкультура 117а – суцільний ріст, яскраво-по-

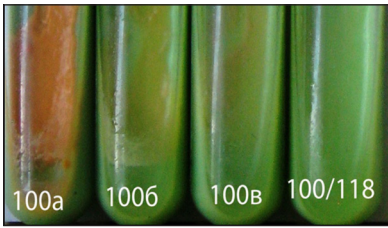


Рис. 76. Культуральні властивості *M. bovis* дисоціативних форм сотої генерації

маранчевого кольору; 117б – суцільний ріст, яскраво-жовтого кольору; 117в – суцільний ріст, блідо-жовтого кольору; 118 – суцільний ріст, блідо-кремового кольору (рис. 76).

Протягом пасажування штамів дисоціативних форм мікобактерій спостерігалася зміна забарвлення колоній, що особливо яскраво проявлялося зі зникненням та появою яскраво-помаранчевого забарвлення в усіх зазначених штамів

у темряві. Так, штам мікобактерій 117а на початку досліджу мав яскраво-помаранчеве забарвлення, із 101 до 111 пасажу блідо-жовтий колір колоній. 112 штам мікобактерій 117а генерації утворив яскраво-помаранчевий пігмент у темряві, а з 113 до 120 пересіву колонії знову мали блідо-жовте та блідо-кремове забарвлення.

Штам мікобактерій 117б у 101 та 109 пересівах утворив помаранчевий пігмент у темряві. В усіх інших пересівах штам мікобактерій 117б мав блідо-жовте та блідо-кремове забарвлення.

Штам мікобактерій 117в у 104 та 109 пересівах утворив помаранчевий пігмент. В усіх інших пасажах мікобактерії цього штаму 117в продукували блідо-жовтий та блідо-кремовий пігмент.

Штам мікобактерій 118 утворив помаранчевий пігмент у 108 пересіві.

Згідно з класифікацією атипичних мікобактерій, запропонованою Раніоном у 1959 році, штами мікобактерій, які здатні утворювати помаранчевий пігмент у темряві, відносяться до другої групи скотохромогенних атипичних мікобактерій, типовими представниками яких є *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. aquae* (В.І. Ротов, 1973).

Із викладеного можна зробити висновок, що під час пасажів за низьких температур (3 °С) дисоціативні форми мікобактерій набувають ознак, притаманних атипичним мікобактеріям.

Дослідженнями тинкторіальних властивостей штамів 117а, 117б, 117в та 118 *M. bovis* дисоціативних форм 100-го пересіву (рис. 77) було встановлено, що за мікроскопії мазків, зафарбованих за методом Ціля-Нільсена, виготовлених із колоній мікобактерій штаму 117а, у полі зору мікроскопа виявили дрібні кокоподібні мікроорганізми синього кольору, розміщені скупченнями. За мікроскопії мазків, виготовлених із мікобактерій штаму 117б, виявили сині палички з обрубаними краями та некіслотостійкі дрібні фіолетові елементарні тільця між ними. Під імерсією мазків, приготовлених із субкультури штаму 117в, виявили сині палички та кокоподібні мікроорганізми, які розміщені поодинокі та скупченнями, а 118 – великі сині овали, палички та елементарні тільця у вигляді скупчень.

Під імерсією в мазках 110 пересіву за 3 °С встановлено (рис. 78), що штам мікобактерій 117а представлений синіми паличками з обрубаними краями та

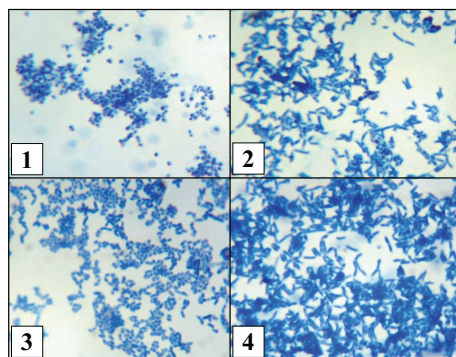


Рис. 77. Морфологія та тинкторіальні властивості *M. bovis* дисоціативних форм: 1 – 117а; 2 – 117б; 3 – 117в; 4 – 118 (100-й пересів) × 1500

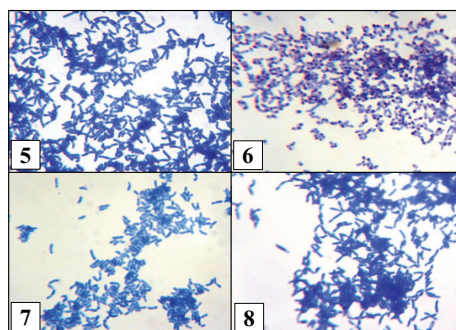


Рис. 78. Морфологія та тинкторіальні властивості *M. bovis* дисоціативних форм: 5 – 117а; 6 – 117б; 7 – 117в; 8 – 118 (110 пересів) × 1500

M. bovis дисоціативних форм штамів 117а, 117б, 117в, 118 (рис. 79) 120 пересіву виявили: 117а – сині короткі некіслотостійкі палички; 117б – довгі некіслотостійкі палички з обрубаними кінцями; 117в – сині некіслотостійкі палички з обрубаними кінцями; 118 – сині некіслотостійкі палички та великі сині овали (L-форми) із зернами.

Досліджуючи тинкторіальні властивості дисоціативних форм мікобактерій, які набули в процесі культивування здатності утворювати помаранчевий пігмент, встановлено (рис. 80): штамп 117в 104 пересіву представлений некіслотостійкими паличками та коками, у 100 пересіві – синіми коками у вигляді скупчень та ланцюжків; штамп 118 (108 пересів) – дрібними некіс-

великими синіми овалами (L-формами); штамп мікобактерій 117б – синіми паличками з обрубаними кінцями, які розміщені поодинокі та парно, і кислотостійкими зернами (елементарними тільцями); штамп мікобактерій 117в – синіми паличками та коками у вигляді скупчень; штамп мікобактерій 118 – синіми паличками та великими синіми овалами.

Отримані дані свідчать про деяку тенденцію змін морфології та тинкторіальних властивостей мікобактерій під час пасажування через штучне живильне середовище з рН 6,5 за температури 3 °С. Так, у штаму мікобактерій 117а 100-го пасажу відмічали сині коки, а 110-го – сині палички; у штаму мікобактерій 117б 100-го пасажу – сині палички та некіслотостійкі елементарні тільця, а 110-го пасажу – сині палички та кислотостійкі елементарні тільця; у штаму 117в 100-го пасажу – сині палички, швидше ланцюжки із зерен, а 110-го пасажу – сині палички та коки; у штаму мікобактерій 118 у 100-му пасажі – сині палички та великі овали, а у 110-му пасажі – сині палички та овали.

За подальших пасажувань і дослідження під імерсією мазків

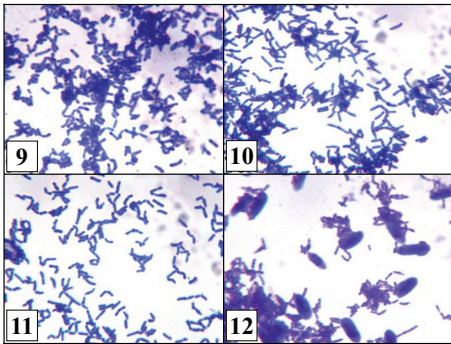


Рис. 79. Морфологія та тинкторіальні властивості *M. bovis* дисоціативних форм: 9 – 117а; 10 – 117б; 11 – 117в; 12 – 118 (120 пересів) ×1500

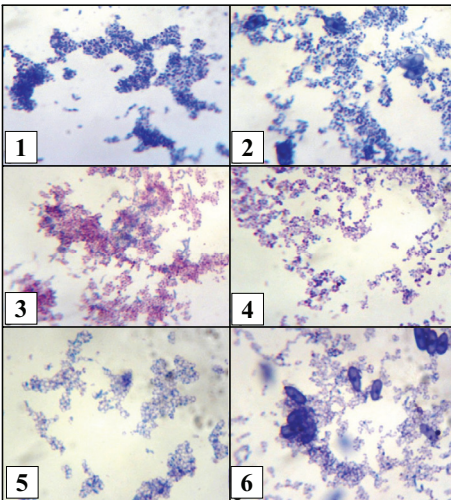


Рис. 80. Морфологія та тинкторіальні властивості *M. bovis* дисоціативних форм, що утворили помаранчевий пігмент: 1 – 117в (104 пересів); 2 – 118 (108 пересів); 3 – 117б (109 пересів); 4 – 117а (112 пересів); 5 – 117а (116 пересів); 6 – 118 (120 пересів) ×1500

117б, 117в, 118) дещо змінили свою морфологічну будову та набули здатності інколи утворювати помаранчевий пігмент за пасажування, що є притаманним

лотостійкими коками та великими синіми овалами (L-форми), у 110 пересіві – синіми паличками та великими синіми овалами; 117б (109 пересів) – некислотостійкими паличками та червонуватими коками (напівпрозорі), у 110 пересіві – синіми паличками та темно-фіолетовими зернами (тільця); 117а (112 пересів) – некислотостійкими паличками, фіолетовими коками, у 110 пересіві – синіми паличками та великими синіми овалами, 117а у 116 пересіві – некислотостійкими коками, у 120 пересіві, коли вперше виявлена культура (різниця 2 тижні), – синіми короткими й більш довгими некислотостійкими паличками; 118 (120 пересів) – великими некислотостійкими овалами та напівпрозорими L-формами, у 120 пересіві – синіми, некислотостійкими паличками та великими синіми овалами (L-форми) із зернами.

Отже, у процесі пасажування за температури 3 °С, мікобактерії дисоціативних форм набувають здатності утворювати помаранчевий пігмент та мають виражену тенденцію до зерноутворюючих форм. За пасажування *M. bovis* дисоціативних форм штамів (117а, 117б, 117в, 118) за різних температур (3–37 °С) вони отримали стійкої властивості культивуватися за 3 °С та втратили здатність розмножуватися за температури термостата (37 °С).

У процесі культивування, за температури 3 °С, мікобактерії дисоціативних форм штамів (117а,

Пі групі скотохромогенних атипових мікобактерій, типовими представниками яких є *M. scrofulaceum* та *M. goodnae*.

Культури з інтенсивно помаранчевим забарвленням вміщують дещо інші морфологічні форми мікобактерій: некислотостійкі палички та коки, дрібні некислотостійкі коки та великі сині овали (L-форми), некислотостійкі палички та кислотостійкі коки, напівпрозорі L-форми, а культури із незначним пігментоутворенням – сині палички та кислотостійкі і некислотостійкі елементарні тільця та великі сині овали. Це свідчить про певну залежність пігментоутворення від морфології мікобактерій.

Того ж часу відомо, що тільки атипові мікобактерії IV групи, за класифікацією Раніона, ростуть в перші декілька діб після висіву на штучне живильне середовище та не дуже вибагливі, як і інші види атипових мікобактерій, до його складу. Це й інше (зокрема ферментативна активність) певною мірою відмежовує їх від вірулентних мікобактерій. До інших чинників належить й їх здатність культивуватися на середовищі з умістом натрію саліциловокислого. У цьому зв'язку, визначивши особливості *M. bovis* дисоціативних форм, необхідно було з'ясувати, чи культивуються вони на середовищі з умістом натрію саліциловокислого чи ні?

3.2.8. Ріст субкультур *M. bovis* дисоціативних форм 117а, б, в та 118 варіантів на щільному живильному середовищі з 0,5 та 1 мг/см³ натрію саліциловокислого

Для виконання роботи досліджувані варіанти мікобактерій висівали на середовище, яке вміщувало 0,5 та 1 мг/см³ натрію саліциловокислого (без нього – контроль), й вивчали час появи колоній та характер їх росту, пігментоутворення та через два тижні з часу росту готували мазки й досліджували під імерсією.

Дослідження засвідчили, що мікобактерії 117а варіанта на середовищі (рис. 81) без натрію саліциловокислого формували слизову кремову з жовтуватим відтінком культуру суцільного росту на 3-ю добу.

У мазках, приготовлених з культур під імерсією, виявлено некислотостійкі, практично кокоподібної форми мікроорганізми (рис. 82).

Мікобактерії цього ж варіанта, які культивовані на середовищі з умістом 0,5 мг/см³ натрію саліциловокислого, формували слизову кремову з жовтуватим відтінком культуру суцільного росту по лінії посіву на 10-ту добу (рис. 83). У мазках, приготовлених з культури під імерсією, виявлені ідентичні контролю мікроорганізми: часто в першому й другому випадках, зернисті форми мікобактерій розташовуються ланцюжками (рис. 84).

На середовищі, яке вміщувало 1 мг/см³ натрію саліциловокислого, ріст культури відмічено (рис. 85) на 20 добу (слизова, з жовтуватим відтінком). Мікроскопією мазка, приготовленого з цієї культури, виявлено так само, як і в попередніх дослідженнях, мікроорганізми некислотостійкі, зернисті, часто розміщені ланцюжками, форми (рис. 86).



Рис. 81. Культура M. bovis дисоціативних форм (контроль) 117а варіанта

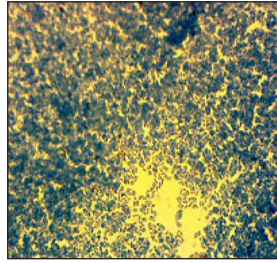


Рис. 82. M. bovis дисоціативних форм 117а варіанта × 1500



Рис. 83. Культура M. bovis дисоціативних форм (0,5 мг/см³) 117а варіанта

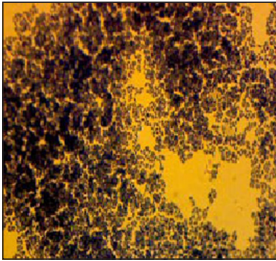


Рис. 84. M. bovis дисоціативних форм 117а варіанта × 1500

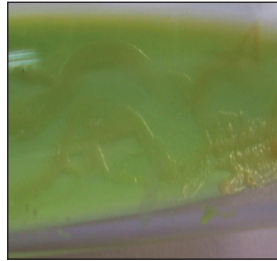


Рис. 85. Культура M. bovis дисоціативних форм (1,0 мг/см³) 117а варіанта

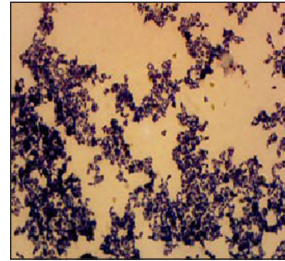


Рис. 86. M. bovis дисоціативних форм 117а варіанта × 1500

Мікобактерії 117б варіанта на середовищі без натрію саліциловокислого формували слизову, з жовтуватим відтінком культуру по лінії посіву на 4 добу (рис. 87). У мазку, приготовленому з культури мікобактерій під імерсією виявлено (рис. 88) короткі зернисті некіслотостійкі й поодинокі кіслотостійкі палички.

На середовищі з умістом 0,5 мг/см³ натрію саліциловокислого ріст слизової зі сіро-жовтуватим відтінком культури виявлено на 12 добу культивування (рис. 89). У приготовленому мазку з культури виявлено практично круглі, некіслотостійкі й поодинокі кіслотостійкі форми мікобактерій (рис. 90).

Культивуючи мікроорганізми цього ж варіанта на середовищі з 1 мг/см³ натрію саліциловокислого виявлено ріст культури на 21 добу (слизова сіро-жовтуватого кольору) (рис. 91). Під імерсією виявлено короткі, частіше зернисті, круглої форми, некіслотостійкі мікроорганізми (рис. 92).

Мікобактерії 117в варіанта на контрольному середовищі формували слизову сірувато-зеленуватого кольору культуру на 3 добу (рис. 93), а в мазку, приготовленому з культури, відмічено некіслотостійкі короткі зернисті палички (рис. 94).

Водночас на середовищі з умістом 0,5 мг/см³ натрію саліциловокислого ріст по лінії посіву слизової з жовтуватим відтінком культури відміче-



Рис. 87. M. bovis
дисоціативних форм
(контроль)
1176 варіанта

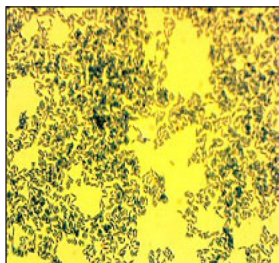


Рис. 88. M. bovis
дисоціативних форм
1176 варіанта
× 1500



Рис. 89. Культура
M. bovis дисоціативних
форм (0,5 мг/см³)
1176 варіанта

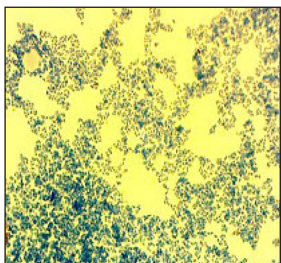


Рис. 90. M. bovis
дисоціативних форм
1176 варіанта
× 1500



Рис. 91. Культура
M. bovis дисоціативних
форм (1,0 мг/см³)
1176 варіанта

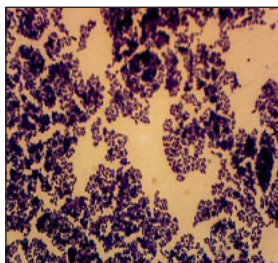


Рис. 92. M. bovis
дисоціативних форм
1176 варіанта
× 1500

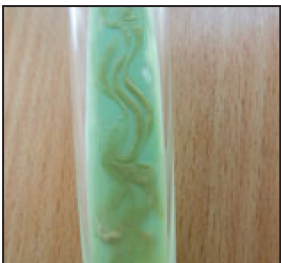


Рис. 93. Культура
M. bovis дисоціативних
форм (контроль)
1176 варіанта

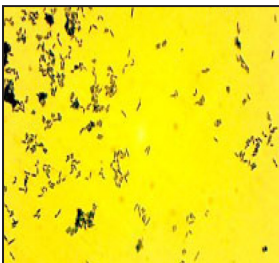


Рис. 94. M. bovis
дисоціативних форм
1176 варіанта
× 1500

но на 10 добу досліду (рис. 95), а в мазку з неї під імерсією виявлено некіслотостійкі круглої форми мікроорганізми (рис. 96).

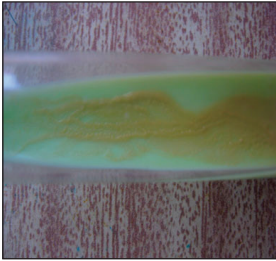
Практично ідентичними до попередніх даних виявилися результати досліджень цього варіанта мікобактерій на середовищі з 1 мг/см³ натрію саліциловокислого

за винятком строку формування культури – на 20 добу (рис. 97 та 98).

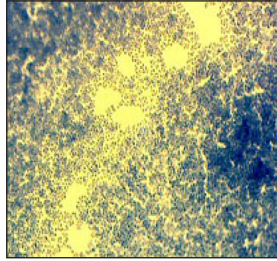
Іншими, від попередніх, були результати досліджень L-форм (118 пересів). На контрольному середовищі слизова червонуватого кольору по лінії посіву культура виявлена на 4 добу (рис. 99).

У мазку, приготовленому з культури і вивченому під імерсією, виявлено (рис. 100) некіслотостійкі, зі злегка червонуватою оболонкою і темними зернами, що знаходилися всередині, овальні форми (швидше паличкоподібні). З деяких звільнюються (внаслідок руйнування оболонки) злегка червонуваті зерна та палички.

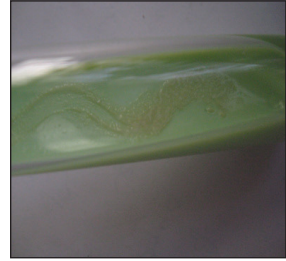
На середовищі з умістом $0,5 \text{ мг/см}^3$ натрію саліциловокислого формувалися поодинокі слизові, великі, коричневого кольору колонії на 4 добу (рис. 101). У мазку з колоній під імерсією виявлені мікроорганізми, які за



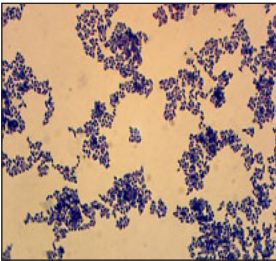
*Рис. 95. Культура *M. bovis* дисоціативних форм ($1,0 \text{ мг/см}^3$) 117в варіанта*



*Рис. 96. *M. bovis* дисоціативних форм 117в варіанта $\times 1500$*



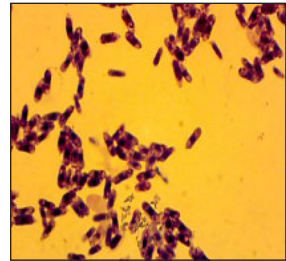
*Рис. 97. Культура *M. bovis* дисоціативних форм ($1,0 \text{ мг/см}^3$) 117в варіанта*



*Рис. 98. *M. bovis* дисоціативних форм 117в варіанта $\times 1500$*



*Рис. 99. Культура *M. bovis* дисоціативних форм (контроль) 118 варіанта*



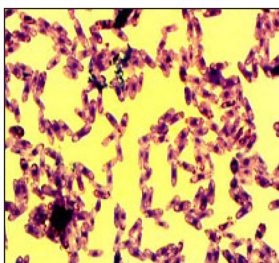
*Рис. 100. *M. bovis* дисоціативних форм 118 варіанта $\times 1500$*

морфологією і тинкторіальними властивостями подібні до таких культивованих на середовищі без натрію саліциловокислого (рис. 102).

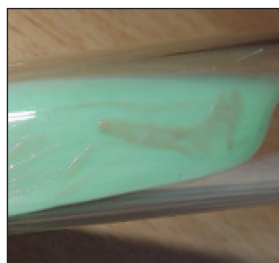
Культура, що одержана на середовищі з умістом 1 мг/см^3 натрію саліциловокислого, сформувалася на 6 добу: слизова сіро-жовтуватого кольору по лінії посіву (рис. 103). Мікроскопія мазка, приготовленого з культури, засвідчила наявність мікроорганізмів (118 пересів) як у контролі, так і з умістом $0,5 \text{ мг/см}^3$ натрію саліциловокислого. Проте з більш чітко вираженим забарвленням у червоний колір усієї клітини, окрім темних зерен, як правило, на середині мікроорганізму (рис. 104).



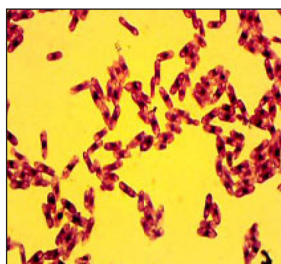
*Рис. 101. Культура *M. bovis* дисоціативних форм (0,5 мг/см³) 118 варіанта*



*Рис. 102. *M. bovis* дисоціативних форм 118 варіанта × 1500*



*Рис. 103. Культура *M. bovis* дисоціативних форм (1,0 мг/см³) 118 варіанта*



*Рис. 104. *M. bovis* дисоціативних форм 118 варіанта × 1500*

Аналізуючи дані щодо результатів культивування досліджуваних мікроорганізмів за температури 37 °С, відмічено, що варіанти дисоціативних форм 117а, б, в не росли на середовищі з умістом натрію саліциловокислого 0,5 та 1 мг/см³. У той же час мікроорганізми 118 варіанта на середовищі з обома концентраціями натрію саліциловокислого проявляли ріст на 4 добу у вигляді нальоту помаранчевого кольору по лінії висіву завису. У контролі ріст культури помаранчевого кольору виявлено на 3 добу досліду.

Приготувавши мазок із досліджуваних культур, одержаних за двох температурних режимів інкубації, та провівши мікроскопію колоній, які сформувалися на середовищі з різним умістом натрію саліциловокислого, встановлено практично ідентичні морфологічні форми (некислотостійкі овальні утворення з темними зернами). До того ж звільнення з овалоподібних форм дрібних зерен, яке відмічено, хоча й не так інтенсивно, в контролі (*рис. 100*) за вмісту в середовищі натрію саліциловокислого, спостерігалось в поодиноких випадках.

Отже, аналізуючи матеріали, одержані під час мінливості та дисоціації мікобактерій, зазначимо, що ці явища, зокрема морфологія та тинкторіальні властивості, в цілому мало чим відрізняються. Проте відщеплені від материнського патогенного штаму мікроорганізми на певному етапі генерації (розмноження), можна з високою вірогідністю стверджувати, змінюються в значній мірі, залишаючи деякі головні ознаки вихідного штаму, та набувають інших властивостей, що притаманні іншим видам, зокрема атипичним мікобактеріям.

Наші експериментальні дослідження засвідчили, що мінливість і дисоціація супроводжуються виникненням дещо подібних ознак, які різняться часом їх появи, та на тлі здатності культивуватися за 3 °С змінюють метаболізм.

Так, вивчаючи мінливість мікобактерій бичачого виду в динаміці численних пересівів, встановлено, спочатку виявлялися перехідні адаптивні форми

(некислотостійкі палички, ниткоподібні форми), з яких згодом звільнялися кислотостійкі палички та зерна, які культивувалися за температури 37 °С.

За дисоціації некислотостійких ниткоподібні форми практично не виявлялися, за винятком певних субкультур, коли відмічалось утворення L-форм з ниткоподібних варіантів (37 °С) – генерувалися на початку кислото- та некислотостійкі палички, зерна та тільки L-форми з різною оптичною густиною поверхні. Крім цього, відщеплені мікобактерії виявлялися пігментуючими, особливо за культивування на живильному середовищі з рН, зміщеним в кислую сторону, інтенсивно росли на простих живильних середовищах та, що надзвичайно важливо, суттєво змінювалися за різних температур культивування. Їх морфологія повністю залежала від температури і в меншому ступені від пігментування: за низьких температур генерувалися в основному некислотостійкі зерна, палички, за 37 °С – L-форми та кислотостійкі елементарні тільця. Цього не виявлено за мінливості мікобактерій, що багаторазово пересівалися на штучне щільне живильне середовище на ранніх етапах досліджень.

Тому ці явища, мінливість і дисоціація, й не зовсім тотожні, оскільки відщеплені мікобактерії можуть набувати, внаслідок незвичайних умов культивування, абсолютно інших властивостей, які не притаманні жодним мікроорганізмам родини мікобактерій. Саме таких незвичайних властивостей набули відщеплені багаторазово (117 і більше разів), пасажовані через щільне середовище мікобактерії від патогенних в умовах низьких плюсових температур – активно розмножуватися в подібному температурному режимі.

Вочевидь, виявлена та вивчена особлива властивість дисоціативних L- та інших форм може значною мірою пояснити появу в стадах великої рогатої худоби, неблагополучних щодо туберкульозу, атипових мікобактерій, часто та персистенції яких з кожним роком неблагополуччя підвищується, на що звертають увагу дослідники. Це відбувається через те, що патогенні мікобактерії, без сумніву, попадаючи в довкілля під впливом низьких плюсових, у тому числі й мінусових температур, суттєво змінюються: перетворюються, як засвідчено в наших дослідках, в атипових мікобактерій, а проникаючи в макроорганізм, викликають параалергічні реакції та, можливо, й не тільки їх, а і паралельно інфекційний процес певної складності.

Розмноження патогенних мікобактерій в середовищі з більш кислим рН супроводжується і набуттям інших властивостей, які визначають ріст на простих живильних середовищах та з натрієм саліциловокислим, що притаманно атиповим мікобактеріям.

Утім L-форми (овали з різною оптичною густиною поверхні), хоча і проведено численні пасажі через щільне живильне середовище, розпочали з'являтися в субкультурах тільки під час культивування за низьких плюсових температур (3 °С) – 118 пересівів. Встановлено, що на їх утворення та морфологію суттєво впливає (рис. 30, 31) температура культивування: за 3 °С L-форми утворюються із зернистих некислотостійких паличок різної довжини й мають форму видовжених овалоподібних зернистих утворень з різною оптичною густиною поверхні; за 37 °С L-форми мають практично круглу форму з

різною оптичною густиною поверхні й утворюються з ниткоподібних некіслотостійких мікобактерій; на початку виштовхування із ниткоподібних форм вони видовжені. Більш чітко це простежується в мікобактерій 1176 варіанта (рис. 32) за температури 37 °С культивування, хоча за умов 3 °С культивування цього варіанта мікобактерій L-форми взагалі не утворювалися, зокрема в 10-й генерації. Наведені дані доводять, що температура доквілля суттєво впливає на L-трансформацію та стверджує високу адаптивну здатність генетичного коду, певних генів визначати утворення L-форм (везикулярних варіантів, зокрема) залежно від температури культивування. Можна стверджувати універсальність генів у цьому явищі.

Акцентуючи увагу на тому, що біологічний цикл розвитку дослідженого штаму закономірний й залежить від температури культивування, необхідно відзначити й вплив температури на утворення елементарних тілець. За 37 °С прикінцевою морфологічною формою виявлені кіслотостійкі елементарні тільца, які погано культивуються або взагалі не культивуються; за 3 °С – некіслотостійкі зерна, палички та поодинокі видовжені L-форми.

Ураховуючи таку залежність, можна з високою вірогідністю стверджувати (екстраполюючи на макроорганізм), що в організмі тварин та людини створюється імунітет проти туберкульозу не L-формами, про що повідомляють З.С. Земскова та І.Е. Дорожкова (1984 р.), а персистуючими в тканинах елементарними тільцями. Виходячи з цієї гіпотези, імуногенний штам необхідно селекціонувати з мікобактерій, які інтенсивно конвертують в елементарні тільца, реверсійна здатність яких може бути з'ясована за тривалого культивування.

Таким чином, нами підтверджено біологічний цикл розвитку мікобактерій, про який повідомляв ряд учених попередніх десятиліть, та вперше встановлено:

- 1) здатність змінених дисоціативних форм *M. bovis* розмножуватися за 3 °С культивування на простих та елективних живильних середовищах;
- 2) утворення елементарних тілець за 37 °С та некіслотостійких зерен за 3 °С як прикінцевих форм циклу розвитку.

У цьому зв'язку можна з впевненістю стверджувати, що біологічний цикл розвитку мікобактерій – це закономірний процес існування біологічного виду мікроорганізму, незаперечний факт, який, без сумніву, необхідно враховувати в разі реалізації профілактичних та оздоровчих заходів щодо викорінення туберкульозу. Нехтування цими положеннями – значить сприяти низькій ефективності заходів, розвитку епізоотичного процесу.

Водночас залишається невирішеним питання розробки елективного живильного середовища для стабільного культивування елементарних тілець, що допомогло б всебічному вивченню та встановленню біологічного значення таких структурних утворень в етіології туберкульозу. Однак більш важливим є визначення чинників, за яких відбувається відтворення з таких структур, які персистують в тканинах макроорганізму, не тільки мікобактерій, але й інших видів бактерій.

Пошук відповідей на питання про їх хімічну й імунологічну природу становить неодмінну умову подальших наукових досліджень.

ФІЛЬТРИВНІ ФОРМИ МІКОБАКТЕРІЙ ТУБЕРКУЛЬОЗУ

Використовуючи різні за методологією експерименти дослідники достатньо широко вивчали фільтривні, ультрадрібні форми мікобактерій. Проте повідомлення останніх десятиліть свідчать про те, що такі варіанти мікобактерій належать до елементарних тілець, які не культивуються або погано культивуються на звичайних елективних середовищах. До того ж, ці тільця, на яких більш розгорнуто зосереджено увагу в попередніх розділах роботи, мають декілька типів за розмірами, що, напевно, відіграє свою роль в біологічному циклі розвитку мікобактерій.

З огляду на викладенне положення, відносно легко можна встановити такі морфологічні форми в популяції патогенних кислотостійких мікроорганізмів, оскільки вони викликають туберкульоз у лабораторних тварин, що є підтвердженням їх наявності в тому чи іншому завису матеріалу збудника. Зовсім протилежне спостерігається за дисоціації, коли відщеплені мікобактерії авірулентні, крім цього (можуть / не можуть викликати хворобу), не культивуються або слабо культивуються на звичайних середовищах. Саме цим положенням й обумовлено дослідження фільтривних елементів дисоціативних форм, які багаторазово пасажувалися через щільні живильні середовища. Можливо, досліді з таким методологічним підходом розширять та поглиблять погляди щодо цього питання.

4.1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Мікобактерії туберкульозу типових класичних форм з достатньо відомими властивостями не проникають через бактеріальні фільтри (Беркефельд, Шамберлан, Зейтц). Проте Fontes (1910), профільтрувавши гній, який видалили за туберкульозного лімфаденіту, і, ввівши його у фізіологічному розчині морським свинкам, спостерігав у дослідних тварин збільшення регіонального пахового лімфатичного вузла. Після одного чи декількох пасажів через морських свинок суспензії з цих гомогенізованих лімфовузлів у тварин розвивався туберкульоз. Fontes передбачав, що бактеріальний фільтр пропускає гранули Муха, які є життєздатними. Philibert (1912) перевіряв ці досліді, проте подібних результатів не одержав, що пояснював помилковою технікою Fontes. Напевне, з цієї причини протягом наступних 12 років не займалися вивченням цього питання.

Інтерес до цієї проблеми був знову викликаний роботами Vandremet і Handuroy (1923), які у фільтраті культури мікобактерій туберкульозу виявили наявність дрібних часточок, що здатні розвиватися в бактеріальні форми. Valtis (1924) за допомогою нових дослідів переконався в обгрунтованості

даних Fontes. Negre і співавт. (1927, 1933), Colmette і Valtis (1930) у своїх працях надавали великого значення гранулярній формі мікобактерій туберкульозу, яких називали туберкульозним ультравірусом. У цьому напрямі було проведено багато досліджень, щоб одержати перехід фільтривних форм, які знаходилися в дослідженому матеріалі (фільтрат гною, тканини, рідкі культури мікобактерій), у бактеріальні, типові форми мікобактерій туберкульозу.

Ряд дослідників (Kirchner, 1928, 1930; Mellon і Jost, 1929; Lucksch і Skuteizky, 1929, 1931; Mellon, 1931; Mellon і Fischer, 1932) бездоганними дослідками показали, що з фільтрату туберкульозної культури, розтертої із скляним порошком, можна одержати слабкорослі, кислотостійкі палички, пересів яких супроводжується ростом типових вірулентних мікобактерій туберкульозу. За пасажів фільтрату через морських свинок спостерігається і перехід фільтривних форм у типову бактеріальну форму. Тогунова (1927), Dumont (1928), Rabinowitsch-Kempner (1928), Panek і Zakharoff (1931), Feygin (1931, 1932), Verges і Sergent (1934) також одержали реверсію фільтривних форм у кислотостійкі бактерії. Sanarelli і Alessandrini (1935) виготовили колоїдний мішечок, в якому вміщувався фільтрат культури мікобактерій туберкульозу; останній переносили в колоїдний мішок більшого розміру, який вміщував живильне середовище. Все це перенесли в черевну порожнину кроля, яку зашили. Через деякий час мішечок видаляли з черевної порожнини. У результаті встановили проникнення фільтривних форм із внутрішнього в зовнішній мішечок, оскільки в живильному середовищі виявлялися невисокотостійкі палички. Висів цих паличок на середовище Левенштейна-Йенсена дав ріст типової культури мікобактерій туберкульозу. Ціхновицер і Лехцер (1939) методом Sanarelli також одержали із фільтратів слабкорослі культури кислотостійких мікобактерій. Тріус і Хольцман (1939) в досліді на 600 морських свинках за допомогою пасажів через тварин довели наявність фільтривних форм у фільтратах з патологічного матеріалу, які дали ріст авірулентних S- і хромогенних варіантів мікобактерій туберкульозу. Результати роботи про роль туберкульозного ультравірусу Vaudremer, Arloing і Dufourt, Durand, Bezanson доповідали на конгресі з туберкульозу 1935 року у Франції.

Цього ж року дослідження фільтривних форм мікобактерій туберкульозу були призупинені. Причиною стало, в першу чергу, повідомлення Negre і співавт. (1933), Valtis і van Deines (1934) з Інституту Пастера. Наступні дослідження довели необґрунтованість цих повідомлень. З'ясувалося, що морські свинки, які використані в досліді (їм вводили фільтрати й ацетоновий екстракт з мікобактерій туберкульозу, щоб одержати перетворення фільтривних форм у бактеріальні), були спонтанно заражені мікобактеріями пташиного виду, які помилково сприймалися авторами як регенеровані (реверсовані) з фільтривних форм. Saenz й співавт. (1936) повідомили про виділення з організму здорових морських свинок 12 культур мікобактерій пташиного виду. Такі повідомлення носили скептичний характер, який був викликаний рядом повідомлень про негативні результати досліджень фільтривних форм (Blumenberg, 1931; Vera і Rettger, 1940). Крім цього, Varney і Bronfenbrenner

(1932), Choucroun і Plotz (1934), Fraenkel і Pulverkraft (1935), Soltys і Taylor (1944) у фільтратах культур мікобактерій туберкульозу виявили кислотостійкі палички, проникнення яких пояснювалося їх слабким електричним зарядом, особливостями рідини, в якій готували завис, і діаметром пор фільтра.

Дослідження фільтривних форм поновилося в 1948 році завдяки роботам Negre (1948) і Negre і Bretey (1952), які вводили молодим кролям фільтрат 3–4-добової культури мікобактерій туберкульозу і з організму декількох тварин через 3–4 місяці виділили вірулентні мікобактерії (культури). Дослідники зробили висновок про те, що мікобактерії надто молодого віку, що вміщують мало ліпідів, проникають через бактеріальні фільтри і є слабковірулентними.

Значний інтерес являє робота Brieger і Glauert (1954). У туберкульозній гомогенізованій тканині кроля після суперцентрифугування вміщувалося 2 види гранул величиною 5 мкм, які за висіву на живильне середовище не давали росту культури, але викликали туберкульоз після введення кролям. Інші, менші за розміром, гранули, які проникали через пори бактеріального фільтра, виявлялися в тканинах за електронної мікроскопії. Космодоміанський й співавт. (1966) з крові туберкульозних морських свинок виділили культуру мікрококів, які реверсували з фільтривних форм.

Ю.К. Вейсфейлер (1954), адсорбуючи (гідроксид алюмінію) фільтривні форми мікобактерій туберкульозу, показав реверсуючу здатність їх у кислотостійкі мікобактерії. Дослідник, вивчаючи властивості культур реверсувавших мікобактерій із фільтривних форм, встановив, що такі мікобактерії не завжди ідентичні вихідним варіантам, а імуногенність деяких з них відрізняється від такої вихідної форми.

4.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Проблема туберкульозу існує з давніх-давен і дотепер, хоча і в її пізнанні досягнуто багато успіхів. Це, звичайно, суттєво впливає, за умови якісної реалізації результатів досліджень, на ефективність профілактики інфекції та її викорінення. Між тим ряд питань наразі недостатньо вивчені та дискусійні. До першого відносяться фільтривні форми мікобактерій, їх значення в тій чи іншій популяції мікроорганізмів, у розвитку інфекційного процесу та біологічному циклі розвитку мікобактерій. Повідомлення авторів 70-х років минулого століття та останнього часу свідчать про те, що фільтривні форми та елементарні тільця тотожні за біологічною суттю, до того ж не культивуються (погано культивуються) на звичайних штучних живильних середовищах. Це становить певну складність їх вивчення. Тим часом дисоціативні форми мікобактерій, у тому числі й фільтривні (елементарні тільця), як показують наші дослідження попередніх років, культивуються за 3 °С на звичайних живильних середовищах з рН 6,5–7,1. Це визначило можливість дослідити наявність ультрадрібних форм (елементарних тілець) у популяції *M. bovis* дисоціантів, та їх роль у біологічному циклі розвитку цього виду мікроорганізмів.

Для дослідів використали мікобактерії, субкультури яких зберігалися в музеї лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб ДДАЕУ: патогенний штам *M. bovis* 124 генерації та його дисоціативні форми, що відщепилися на 117 (а, б, в) та 118 пересівах і пасажувалися в подальшому 110 разів за температури 3 °С.

У роботі використали фільтротримач шприцевий для мембранних фільтрів модель ДН 25РWТ1-1, діаметр фільтра 25 мм, матеріал фільтротримача – тефлон, виробник AWL-Tech (Чехія).

Фільтри мембранні дискові типу МФАС-Б1 та МФАС-Б2, матеріал мембран–мікропористий плівковий, приготовлений на основі суміші ацетатів целюлози, з розміром пор 0,1 та 0,05 мкм і загальною пористістю 80–85 %, виробник ЗАТ НТЦ “Владіпор” (м. Володимир, Російська Федерація).

Завис мікобактерій (1 мг/см³) дослідних зразків готували шляхом відбору культури бактеріологічною петлею, над полум’ям горілки в умовах боксу та вміщували в стерильну ступку. За допомогою товкачика гомогенізували бактеріальну масу в ступці з додаванням стерильного ізотонічного розчину натрію хлориду.

Фільтрацію завису дослідних зразків мікобактерій різних морфологічних форм проводили за допомогою шприца, з’єданого за принципом Луер-конуса в стерильні мірні пробірки. Для проведення процесу фільтрації розгвинчували корпус фільтротримача, на опірній сіточці (трегері) розміщували мікрофільтраційні мембрани, загвинчували корпус та з’єднували зі шприцом.

Фільтрат 1 (фільтр МФАС-Б1; 0,1 мкм) та фільтрат 2 (фільтр МФАС-Б2; 0,05 мкм) кожного дослідного зразка висівали бактеріологічною петлею на ячне живильне середовище для культивування мікобактерій чотирьох бактеріологічних пробірок і культивували за температури 3 та 37 °С 90 діб. Облік росту культур мікобактерій перші сім діб проводили щодоби, а в подальшому – раз на тиждень протягом дослідів.

У культур вивчали швидкість росту на ячному живильному середовищі, зовнішній вигляд, пігментоутворення, а в мазках, зафарбованих за методом Ціля-Нільсена, морфологію, тинкторіальні властивості мікобактерій.

Мікроскопію мазків, приготовлених з первинних культур та із субкультур, проводили за їх пересіву до і після фільтрації.

4.2.1. Дослідження фільтривних форм дисоціативних *M. bovis* 117а, б, в та 118 генерації

У результаті досліджень встановлено, що культура 60 генерації 117а варіанта дисоціативних форм мікобактерій характеризувалася суцільним ростом жовто-помаранчевого кольору по лінії висіву (рис. 105).

Під імерсією в мазку, приготовленому з досліджуваної культури, виявлено поодинокі субмікроскопічні некислотостійкі (інколи кислотостійкі) зерна та значну кількість коротких (традиційних розмірів) й більш довгих (ниткоподібних) паличок (рис. 105.2).

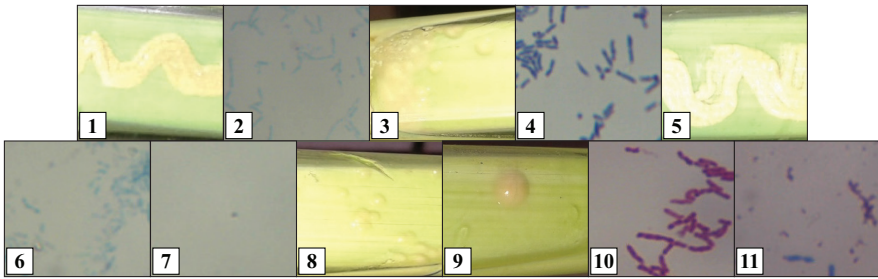


Рис. 105. Культуральні властивості та морфологія M. bovis 117a варіанта; культура: 1 – 60 генерація; 3 – із фільтривних форм 60 генерації; 5 – 110 генерація; 8–9 – із ультрадрібних форм 110 генерації; морфологія: 2–60 генерація; 4 – із фільтривних форм 60 генерації; 6 – 110 генерація, 7 – ультрадрібні форми 110 генерації; 10–11 – M. bovis, одержані з ультрадрібних форм 110 генерації (0,1 та 0,05 мкм) ×1600

У фільтраті (діаметр пор 0,1 та 0,05 мкм), одержаному з вихідної культури мікобактерій, не виявлено морфологічних форм досліджуваних мікобактерій. Проте фільтрат (0,05 мкм), висіяний на живильне середовище, стимулював ріст культури (рис. 105.3) на 50 добу культивування, що свідчить про наявність у ньому ультрадрібних форм.

Інший фільтрат (0,1 мкм), в якому також не виявлено ультрадрібних форм мікобактерій, дав негативні результати культуральних досліджень. Під імерсією в мазку, приготовленому з одержаної культури (фільтр 0,05 мкм), зареєстровані некіслотостійкі зернисті палички та поодинокі зерна (рис. 105.4).

Під час з'ясування наявності ультрадрібних форм у 110 генерації *M. bovis* дисоціантів 117a варіанта, по-перше, за висіву фільтрату на живильне середовище спостерігався ріст культури по лінії посіву на 7–9 добу культивування (рис. 105.5), а по-друге, під імерсією в полі зору мікроскопа виявлено некіслотостійкі кокоподібні, короткі й більш довгі (інколи ниткоподібні) палички (рис. 105.6).

У фільтраті, одержаному зі згаданої вище субкультури за допомогою фільтра з порами 0,1 та 0,05 мкм, виявлено поодинокі некіслотостійкі субмікроскопічні зерна (рис. 105.7). Культуральні дослідження фільтрату, одержаного через пори фільтра обох розмірів, дали позитивні результати: ріст культури (окремо розташовані колонії) після висіву фільтрату відмічено на 19–22 добу культивування (рис. 105.8 та 105.9).

Під імерсією в мазку, приготовленому з одержаних культур, виявлено (рис. 105.10) у першому випадку (пори фільтра 0,1 мкм) кислотостійкі короткі й більш довгі прямі та зігнуті палички, а також поодинокі субмікроскопічні зерна. У другому випадку, де фільтрат одержано через пори 0,05 мкм, під імерсією були субмікроскопічні некіслотостійкі та кислотостійкі зерна, а також некіслотостійкі зернисті палички (рис. 105.11).

Отже, дослідження дисоціативних *M. bovis* 117a варіанта засвідчили, що фільтривні форми мікобактерій генеруються в популяції мікроорганізмів постійно. Такі форми (зерна) в першій субкультури (*рис. 105.10* та *105.11*) генерують як різних форм палички, так і зерна, в тому числі й субмікроскопічні. Це доводить, що ультрадрібні форми різних розмірів є одним із етапів біологічного циклу розвитку збудника туберкульозу.

Вивчаючи культуральні властивості 60 субкультури 117b варіанта дисоціативних форм мікобактерій бичачого виду (*рис. 106*), встановлено на живильному середовищі суцільний ріст маслянистої культури злегка жовтуватого-помаранчевого кольору (*рис. 106.1*).

Приготувавши завис мікобактерій з цієї культури та висіявши на живильне середовище, одержано ріст подібної субкультури на 7–8 добу спостереження (*рис. 106.2*). З'ясовуючи морфологію мікобактерій з одержаної субкультури, виявлено некіслотостійкі кокоподібні, короткі й більш довгі палички (*рис. 106.3*).

Фільтрат, одержаний зі субкультури, не вмщував за мікроскопії мікроорганізмів, що визначило відсутність росту культури протягом 90 діб інкубації.

Під час дослідження за подібною схемою властивостей 110 субкультури 117b варіанта відмічено, що ріст слизової культури сіро-жовтуватого забарвлення спостерігався за лінією висіву завису мікобактерій (*рис. 106.4*). Подібне реєстрували і за висіву завису, приготовленого з досліджуваної вихідної 110 культури (*рис. 106.5*).

Водночас вивчення під імерсією мазка, приготовленого зі завису мікобактерій 117b варіанта (110 субкультура), виявило (*рис. 106.6*) дрібні як некіслотостійкі, так і кіслотостійкі (30 %) зерна. У фільтраті, одержаному з цього завису (пори фільтра 0,1 мкм), під імерсією помічено поодинокі субмікроскопічні некіслотостійкі зерна (*рис. 106.7*). Аналогічне встановлено і у фільтраті, одержаному через пори фільтра 0,05 мкм (*рис. 106.8*).

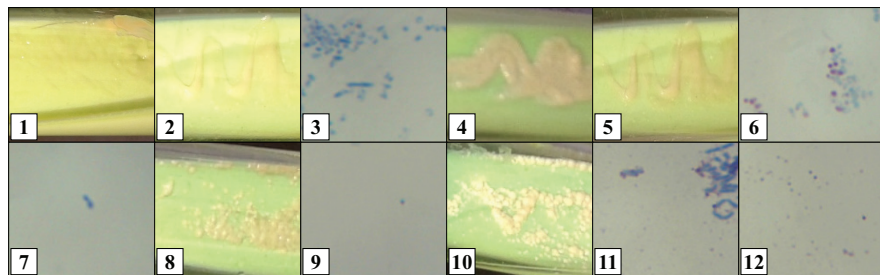


Рис. 106. Культуральні властивості та морфологія M. bovis 117b варіанта; культура: 1 – 60 генерація; 2 – 61 генерація; 4 – 110 генерація (нативна); 5 – 111 генерація (завис); 9–10 – із ультрадрібних форм 110 генерації (пори 0,1 та 0,05 мкм); морфологія: 3 – 61 генерація; 6 – 111 субкультура; 7–8 ультрадрібні форми 110 генерації (пори 0,1 та 0,05 мкм); 11–12 – M. bovis, одержані з ультрадрібних форм 110 генерації (0,1 та 0,05 мкм) ×1600

Висіявши перший та другий фільтрати на живильне середовище, одержали практично суцільний ріст жовтої суховатої культури, сформованої окремими колоніями (рис. 106.9 та 106.10).

Під імерсією в мазках, приготовлених з культур, які стимулювали ультрадрібні *M. bovis*, виявлено (фільтр з порами 0,1 та 0,05 мкм) субмікроскопічні некіслотостійкі зерна та паличкоподібні (різних форм і довжини) форми (рис. 106.11 та 106.12).

Отже, дисоціативні *M. bovis* 117б варіанта 60 генерації не вмщували ультрадрібних форм. Вони виявилися тільки в 110 субкультури.

Дослідження наступного штаму *M. bovis* дисоціативних форм 117в варіанта засвідчили (рис. 107), що вихідна жовто-помаранчева культура (рис. 107.1) формувалася некіслотостійкими поодинокими зернами, паличками та значною кількістю зернистих ниткоподібних (гіллястих) форм, деякі з яких розпадаються на окремі частини (рис. 107.2).

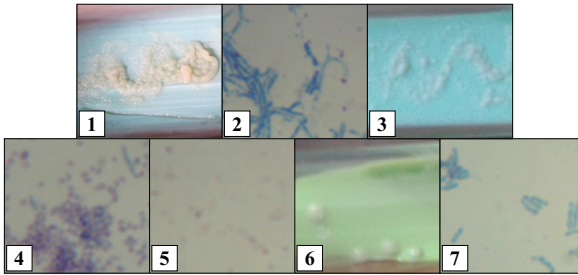


Рис. 107. Культуральні властивості та морфологія *M. bovis* 117в варіанта;

культура: 1–60 генерація (вихідна); 3–110 генерація; 6 – 111 генерація з ультрадрібних форм 110 генерації; морфологія: 2 – 60 генерація; 4 – 110 генерація; 5 – ультрадрібні форми 110 генерації; 7 – *M. bovis*, одержані з ультрадрібних форм 110 генерації
×1600

вихідна жовтуватого кольору 110 субкультура формувалася некіслотостійкими зернами та окремими (як виняток) зернистими паличками (рис. 107.4). У фільтраті (пори 0,1 мкм) виявлені поодинокі некіслотостійкі зерна та інколи тонкі короткі палички (рис. 107.5).

Між тим, висіявши фільтрат на штучне живильне середовище та культивуючи його за 3 °С, зафіксовано ріст культури (з деяких колоній) на 23–26 добу (рис. 107.6), яка формувалася некіслотостійкими зернистими паличками (рис. 107.7).

Отже, ультрадрібні форми (елементарні тільця) частіше утворюються в субкультурах мікобактерій, які багаторазово пасажуються через щільне живильне середовище, генеруючи за цього паличкоподібні некіслотостійкі дисоціативні форми. Можливо, це зумовлено адаптивною здатністю ультрадрібних форм

Але після проведення їх фільтрації та дослідження приготовлених мазків під імерсією не виявлено жодних форм мікобактерій, а 3-місячні культуральні дослідження одержаного та висіяного на живильне середовище фільтрату не дали позитивних результатів.

Такі ж самі дослідження 110 субкультури мікобактерій 117в варіанта показали протилежні результати. На рис. 107.3 видно, що

(в основному елементарних тілець) до елективного живильного середовища, які з часом, за багаторазових пересівів, пристосовуються до нього. Проте ультрадрібні форми на штучному середовищі не генерують собі подібних за морфологією нащадків, а утворюють некіслотостійкі паличкоподібні варіанти мікобактерій.

Наші дослідження попередніх років, а також повідомлення інших авторів констатують, що елементарні тільця практично не культивуються на звичайних живильних середовищах. Однак ця робота переконує стверджує, що дисоціативні елементарні тільця можуть культивуватися одночасно з іншими формами, зберігаючи можливість реверсії в некіслотостійкі форми збудника туберкульозу, тобто в таких клонах мікобактерій постійно утворюються з елементарних тілець паличкоподібні форми збудника, інакше кажучи, вони є невід'ємною частиною біологічного циклу розвитку, хоча таке явище не завжди спостерігається в кожній популяції мікобактерій того чи іншого штаму. Напевно, це визначається особливістю стадії розвитку мікобактерій.

Водночас у літературі повідомляється, що L-форми мікобактерій, культивовані на селективному живильному середовищі, незважаючи на свої великі розміри порівняно з типовими паличками, внаслідок зміни складових клітинної стінки, витягуючись, проходять через бактеріальні фільтри. Для уточнення цього факту дослідили L-форми 118 генерації (рис. 108).

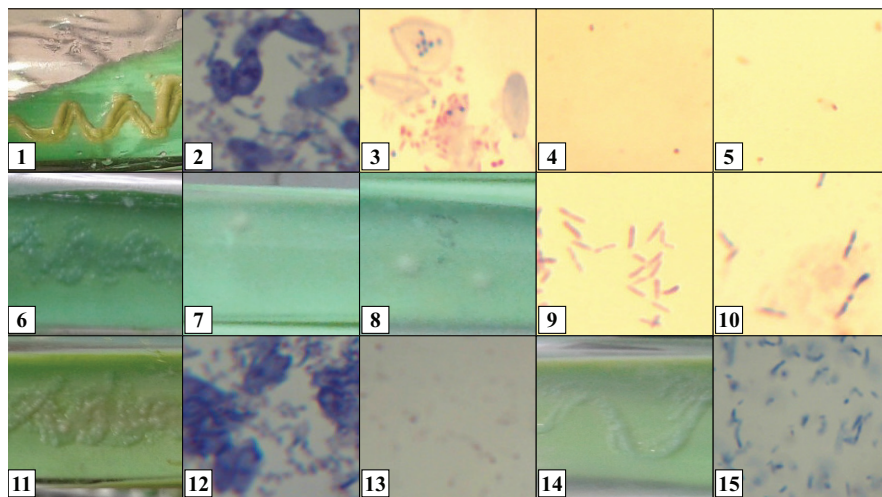


Рис. 108. Культуральні властивості та морфологія *M. bovis* 118 варіанта; культура: 1 – 60 генерація; 6 – 61 генерація (ко-нтроль); 7, 8 – з фільтривних форм 60 генерації (пори 0,1 та 0,05 мкм); 11 – 110 генерація; 14 – із фільтривних форм 110 генерації; морфологія: 2 – 60 генерація (нативна); 3 – 60 генерація (завис); 4, 5 – ультрадрібні форми 60 генерації (пори 0,1 та 0,05 мкм); 9, 10 – *M. bovis* з фільтривних форм 60 генерації; 12 – 110 генерація; 13 – ультрадрібні форми 110 генерації (пори 0,1 мкм); 15 – *M. bovis* з ультрадрібних форм 110 генерації ×1600

Підкреслимо, що наступні пасажування (до 95 пересіву) досліджуваних дисоціативних *M. bovis* L- та інших форм не показали суттєвих видимих змін у культуральних, тинкторіальних властивостях та морфології. Так, у 95 пересіві та культивуванні за 3 °С нами встановлено таку ж, саму, як і в попередніх пасажах, швидкість формування культури з помаранчевим забарвленням, а за мікроскопії виявлені описані вище морфологічні некіслотостійкі форми дисоціативних варіантів (рис. 72, 73). Це переконливо може свідчити про стабілізацію основних біологічних властивостей дисоціативних форм, оскільки багаторазові пересіви не вплинули на їх властивості, які спостерігалися в пересівах перших субкультур дисоціативних форм практично до 50–60 пасажу.

Результати досліджень засвідчили, що за 20 місяців перебування 60 культури 118 генерації в умовах низької плюсової температури практично не відбулося змін у її зовнішньому вигляді (рис. 108.1).

Утім морфологічні ознаки мікобактерій та їх тинкторіальні властивості за аналізований період дещо змінилися. Вихідна культура формувалася (рис. 108.2) некіслотостійкими дрібними зернами (поодинокі), кокоподібними, зернистими – короткими й більш довгими паличками, нитками (які формувалися зернами) та L-формами (овали), з яких звільняються зернисті утворення.

Через 20 місяців перебування в умовах низької плюсової температури мікроскопією цієї ж субкультури виявлено іншу морфологію та тинкторіальні властивості мікобактерій. Тільки поодинокі L-форми залишалися некіслотостійкими, в той час як переважна більшість з них набула червонуватого забарвлення із переважно синіми зернами всередині (рис. 108.3). Такі зерна, але в більшості червонуватого забарвлення, виштовхуються (звільняються) через оболонку.

Зерна як червоного, так і синього забарвлення домінують в полі зору мікроскопа. Палички (некіслотостійкі) виявлялися тільки поодинокі.

Отже, тривале перебування L- та інших форм мікобактерій 60 генерації в умовах низької плюсової температури супроводжується здебільшого перетворенням некіслотостійких паличок та поодиноких зерен у кислотостійкі. L-форми, зазначимо, мають чітку тенденцію до руйнації.

Провівши фільтрацію завису з досліджених під імерсією мікобактерій після 20 місяців зберігання за 3 °С через фільтри з порами 0,1 та 0,05 мкм у діаметрі та знову дослідивши під мікроскопом, встановили як у першому, так і в другому випадках (рис. 108.4 та 108.5), тільки поодинокі дрібні некіслотостійкі зерна.

За висіву ж фільтрованого матеріалу (завису мікобактерій – контроль) (рис. 108.6) виявлено ріст значної кількості колоній на 8–10 добу.

Між тим, висіявши одержаний фільтрат мікобактерій з досліджуваної культури на живильне середовище та культивуючи за 3 °С, виявили на 23 добу одночасний ріст поодиноких колоній (1–3 в пробірці) незалежно від діаметра пори фільтра (рис. 108.7 та 108.8).

Проте в мазку під імерсійною системою з одержаних культур зафіксовано кислотостійкі (частково) короткі й довгі зернисті палички та окремо розта-

шовані поодинокі зерна (рис. 108.9). В іншій культурі (рис. 108.10), одержаної з фільтрату (пори 0,05 мкм), під імерсією виявлені кислотостійкі довгі із заокругленими кінцями та зернами всередині палички.

Водночас ідентифіковані і субмікроскопічні (на межі видимості) поодинокі кислотостійкі зерна (елементарні тільця). Вочевидь, різний діаметр пор фільтра пропускає ультрадрібні форми (елементарні тільця) різних розмірів, з певною потенційною здатністю генерувати кислотостійкі чи не кислотостійкі форми мікобактерій. Це стверджує різноманітність (можливо) їх біологічного значення.

Досліджуючи культуру 110 пересіву (рис. 108.11) цього ж штаму дисоціативних мікобактерій, під імерсією виявили (рис. 108.12) не кислотостійкі форми, ідентичні 60 генерації: короткі палички (швидше кокоподібні), видовжені L-форми з темними зернами всередині. З окремих L форм звільняються зерна. У фільтраті з підготовленого завису мікобактерій (фільтр тільки з порами 0,1 мкм) під імерсією виявили (рис. 108.13) субмікроскопічні зерна.

Після висіву профільтрованих мікобактерій на живильне середовище через 20 діб одержали культуру суцільного росту (рис. 108.14), а у мазку, приготуваному з одержаної культури, виявлено (рис. 108.15) тільки не кислотостійкі зерна, кокоподібні, короткі й довгі зернисті палички за відсутності L-форм.

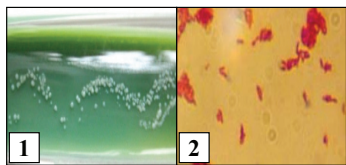


Рис. 109. Субкультура (1) та морфологія (2) патогенних *M. bovis* 124 пасажу ×1600

Досліджуючи *M. bovis* патогенного материнського штаму 124 генерації (рис. 109), зафіксували численні дрібні та середні за величиною, правильної форми матові колонії жовто-білого кольору (рис. 109.1), а під імерсією (рис. 109.2) – кислотостійкі палички: короткі, тонкі, прямі зі заокругленими кінцями, що розташовувалися як поодинокі, так і скупченнями (температура культивування тільки 37 °С).

Провівши фільтрацію досліджених *M. bovis* патогенного штаму 124 генерації та дослідивши мазок під імерсією, який приготували з фільтрату, ми не виявили форм мікобактерій та не одержали росту культури (3-місячна інкубація).

Отже, дослідження дисоціативних L-форм засвідчили беззаперечну динаміку змін біологічних властивостей, які показують, що за чисельних пасажів через штучне живильне середовище підвищується частота утворення ультрадрібних форм та їх адаптація до середовища. Однак це не супроводжується (частіше всього) генерацією таких самих форм мікобактерій у подальших субкультурах, тобто з елементарних тілець (тільки поодиноких) у віддалені строки утворюються паличкоподібні не кислотостійкі форми. Це стверджує закономірну участь ультрадрібних форм у біологічному циклі розвитку мікобактерій, оскільки вони генерують паличкоподібні форми збудника туберкульозу. Досліджені L-форми з різною оптичною густиною поверхні через бак-

теріальні фільтри не проникають, хоча й мають, через змінену в біохімічному напрямі, пластичну клітинну стінку.

Того ж часу зазначимо, що усі досліджувані *M. bovis* дисоціативних форм, за винятком патогенного штаму, не культивувалися за 37 °С.

Узагальнюючи результати роботи, можна з впевненістю стверджувати, що субкультури *M. bovis* дисоціантів уміщують фільтривні форми, частота виділення яких підвищується залежно від кількості генерацій (пасажів).

Фільтривні некіслотостійкі форми за висіву на елективне середовище для культивування мікобактерій, розмножуючись, утворюють культури у вигляді поодиноких колоній та суцільного росту (у результаті злиття окремих колоній) в декілька разів повільніше, ніж у контролі.

У культурах, одержаних з фільтрату, під імерсійною системою виявляються відмінні від висіяних на живильне середовище морфологічні форми мікобактерій.

Наявність фільтривних форм у популяції мікобактерій та їх здатність генерувати морфологічно змінні мікроорганізми в субкультурах переконливо свідчать про їх беззаперечне значення в біологічному циклі розвитку цього дослідженого виду збудника туберкульозу.

КОРД-ФАКТОР ТА БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ МІКОБАКТЕРІЙ

Мікобактерії різних видів розпізнають за біологічними властивостями, які в сукупності визначають активність того чи іншого штаму мікроорганізму. За І.І. Дедю (1990), біологічна активність визначається як: "...проявление организмом важнейших биологических функций...". Зрозуміло, що в такому випадку біологічну активність мікобактерій характеризують різні біохімічні складові (властивості), які забезпечують функціонування мікроорганізму: морфологія мікобактерій, культуральні, тинкторіальні, біохімічні (ферментативна активність), вірулентні властивості, хімічна будова (метаболічна активність) мікробної клітини, сенсibiliзувальна здатність й ін. Звичайно, що загальна активність мікобактерій жодною мірою не може визначатися тільки однією якоюсь функцією (властивістю), оскільки всі складові мікробної клітини хімічно й фізично пов'язані і послаблення якоїсь однієї з них призводить до зміни рівня активності мікроорганізму в цілому. Тому для дослідження властивостей мікобактерій використовують різні методи, серед яких і метод мікрокультивування мікроорганізмів у живильному середовищі. Застосовуючи його, можна виявити корд-фактор (6,6-диміколат трегалози). Наявність та інтенсивність такого фактору в мікобактерій свідчить певною мірою про ту чи іншу біологічну їх активність.

5.1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Як повідомляв Н. Bloch в 1950 році, разом із відкриттям збудника туберкульозу та дослідженням його культуральних властивостей Р. Кох описав здатність *M. tuberculosis* та *M. bovis* рости на живильному середовищі в характерній формі, яка нагадувала "коси" та "джуги". Ці мікроколонії склалися зі щільно та паралельно розташованих клітин, тоді як *M. avium* та нетуберкульозні мікобактерії формували хаотичний та дифузний ріст. Досліджуючи таку здатність мікобактерій, Н. Bloch встановив, що подібний специфічний ріст вірулентних культур збудника туберкульозу відбувається завдяки одній ліпідній фракції, виділеній петролейним ефіром, яка отримала назву корд-фактор. Отримана сполука добре екстрагувалася з вірулентних мікобактерій туберкульозу та в незначній кількості містилася в мікобактеріях штаму *BCG*. Корд-фактор володів такими властивостями, як затримувати міграцію лейкоцитів *in vitro* та токсичними за дво- та багаторазового введення мишам. Разом з тим мікобактерії з видаленим корд-фактором зберігали життєздатність і викликали захворювання та загибель лабораторних тварин, але в більш віддалені строки, ніж мікобактерії з корд-фактором.

У 1956 році Noll й співавт. встановили, що корд-фактор складається з гліколіпиду – 6,6-диміколат трегалози.

Крім родини *Mycobacteriaceae*, 6,6-диміколат трегалози, за повідомленнями М. Senn й співавт. (1967); М. Kato (1970); С.Л. Silva й співавт. (1979); Р. Rapp й співавт. (1979); А. Kretschmer й співавт. (1982); К. Kaneda й співавт. (1986); Y. Natsuhara й співавт. (1990); І. Matsunaga й співавт. (1996); І. Sakaguchi й співавт. (2000); S. Ueda й співавт. (2001); J.C. Philp й співавт. (2002); R. Kanngo співавт. (2002); S. Niescher й співавт. (2006), виділено у мікроорганізмів і інших родин, таких як *Corynebacteriaceae*, *Gordoniaceae* та *Nocardiaceae*.

Збудники прокази – *Mycobacterium leprae* та *Mycobacterium lepramurium* як, повідомляють М. Nakamura (1975) та К. Masanori й співавт. (2007), мають корд-фактор та здатні утворювати мікроколонії у вигляді “кіс” та “джгутів”.

Результати досліджень багатьох учених вказують на те, що переважна більшість культур *M. tuberculosis* і *M. bovis* та незначна кількість *M. avium* й атипівих мікобактерій здатні формувати аналогічні мікроколонії (табл. 40, рис. 110 та 111).

40. Результати дослідження корд-фактору (здатність формувати “коси”) мікобактерій

<i>M. tuberculosis</i> та <i>M. bovis</i>		<i>M. avium</i> та атипіві		Автори
досліджено культур <i>n</i>	кількість культур, які формували “коси”, %	досліджено культур <i>n</i>	кількість культур, які формували “коси”, %	
1	2	3	4	5
100	100	–	–	Lorian Y., 1966
337	100	–	–	Яворська Г., 2004
245	100	–	–	Darzens E. і Fahr G., 1956
41	100	–	–	Sula I. й співавт., 1960
600	98,5	143	11,9	Coelho A.G.V. й співавт., 2007
115	96,5	–	–	Mahapatra B.; 1964
350	99,5	30	43,3	Lal M.M. й співавт., 1972
108	95,3	240	5,0	Kaminski D.A. і Hardy D.J., 1995
88	93,2	180	1,7	Yagupsky P.V., й співавт., 1990
840	92,9	468	3,6	Hui-Zin Tu й співавт., 2003
1122	92,7	86	5,8	Koksalan O.K., й співавт., 2002
106	90,6	42	47,6	Badak F.Z., й співавт., 1999
313	90,0	–	–	Gonzales J., й співавт., 1998

1	2	3	4	5
221	89,6	395	1,0	McCarter Y.S., й співавт., 1998
279	88,2	78	2,6	Badak F.Z., й співавт.; 1999
2601	83,0	391	16,9	Monteiro P.H., й співавт.; 2003
373	64,0	526	3,8	Attorri S., й співавт., 2000
170	22,9	543	1,5	Morris A.J. i Reller L.B., 1993
–	–	12	16,7	Joishy K.N. i Sant M.V., 1969

Серед різних штамів одного й того ж виду атипівих мікобактерій та *M. avium* відмічено невелику кількість культур, які формують характерні “гіллясті” мікроколонії (табл. 41).

Подібні результати отримано і в роботі Т.Р. McCorry й співавт. в 2004 році, де за бактеріологічного дослідження біоматеріалу, відібраного від 48 корів

41. Частота виявлення корд-фактору (здатність формувати “коси”) атипівих мікобактерій

Вид мікобактерій	Досліджено культур <i>n</i>	Кількість культур, які формують “коси”, %	Автори
<i>M. avium-intracellulare</i>	16	18,6	Koksalan O.K., й співавт., 2002
	293	3,4	Attorri S., й співавт., 2000
	408	1,2	Morris A.J. i Reller L.B., 1993
	210	0,5	McCarter Y.S., й співавт., 1998
	34	0	Рудайтис В.Б., 1974
	11	0	Coelho A.G.V. й співавт., 2007
	136	0	Hui-Zin Tu й співавт., 2003
<i>M. goodnae</i>	16	6,3	Koksalan O.K., й співавт., 2002
	75	5,3	Attorri S., й співавт., 2000
	40	5,0	Badak F.Z., й співавт., 1999
	48	2,0	Morris A.J. i Reller L.B., 1993
	134	1,5	McCarter Y.S., й співавт., 1998
<i>M. kansasii</i>	50	11,0	Coelho A.G.V. й співавт., 2007
	56	1,8	Hui-Zin Tu й співавт., 2003
	76	1,3	Attorri S., й співавт., 2000
	9	0	Morris A.J. i Reller L.B., 1993
<i>M. chelonae</i>	33	3,0	Morris A.J. i Reller L.B., 1993
	5	0	Badak F.Z., й співавт., 1999
	4	0	Koksalan O.K., й співавт., 2002
<i>M. marinum</i>	4	25,0	Morris A.J. i Reller L.B., 1993
<i>M. fortuitum</i>	22	18,2	Coelho A.G.V. й співавт., 2007
	20	0	Koksalan O.K., й співавт., 2002

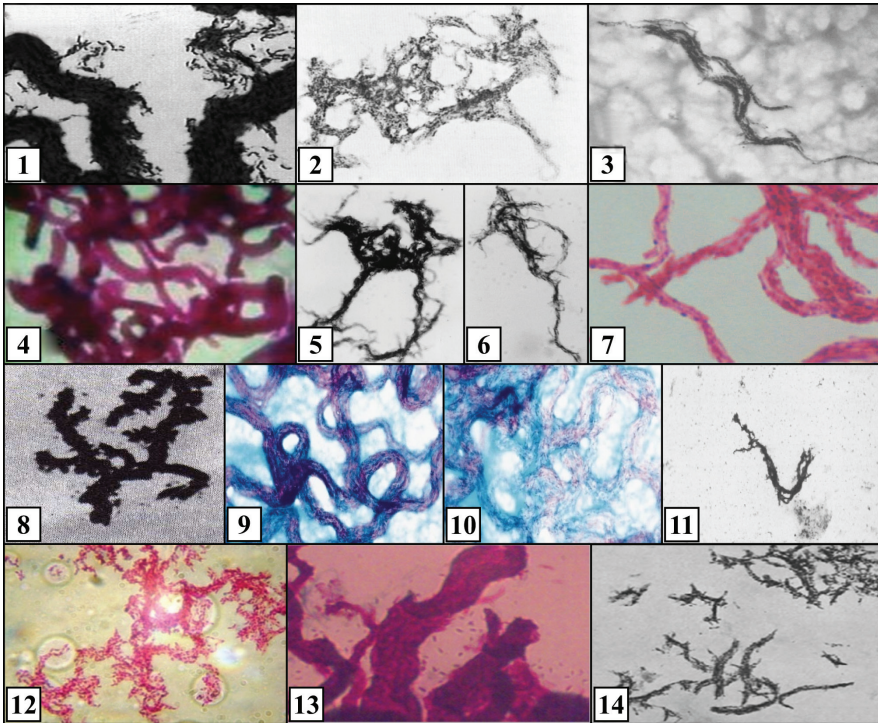


Рис. 110. Мікроколонії *M. tuberculosis* та *M. bovis*:

1 – *M. tuberculosis* complex, за даними Monteiro P.H. et al., 2003; 2 – *M. bovis* у живильному середовищі Proskauer-Beck з додаванням 5 % сироватки, за даними Karlson A.G. and Lessel E.F., 1970; 3 – *M. tuberculosis* у живильному середовищі BACTEC 7H12, за даними Yagupsky P.V. et al., 2003; 4 – *M. tuberculosis* у середовищі MB/BacT, за даними Coelho A.G. et al., 2007; 5 та 6 – *M. tuberculosis* у живильному середовищі BACTEC, за даними Attori S. et al., 2000; 7 – *M. tuberculosis* complex, за даними Hui-Zin Tu et al., 2003; 8 – *M. bovis*, за даними Колычева Н.М., 1980; 9 та 10 – *M. tuberculosis* у середовищі BACTEC MGIT, за даними Pantanowitz L. and Girolami P., 2001; 11 – *M. tuberculosis* complex, за даними J. Gonzalez et al., 1998; 12 та 13 – *M. bovis*, за нашими даними; 14 – *M. tuberculosis* (штам H37Rv), за даними Middlebrook G. et al., 1947 × 600–1000

одного гурту, було виділено 22 культури *M. nonchromogenicum* і тільки 6 з них мали корд-фактор.

Як стверджують А.Д. Морріс і Л.В. Реллер (1993), Д.А. Камінські; Д.Д. Гарді (1995), У.С. МакКартер й співавт. (1998), С. Аттіорі й співавт. (2000), деякі культури *M. avium-intracellulare* мають 6,6-диміколат трегалози й здатні формувати мікроколонії у вигляді “кіс” та “джгутів”.

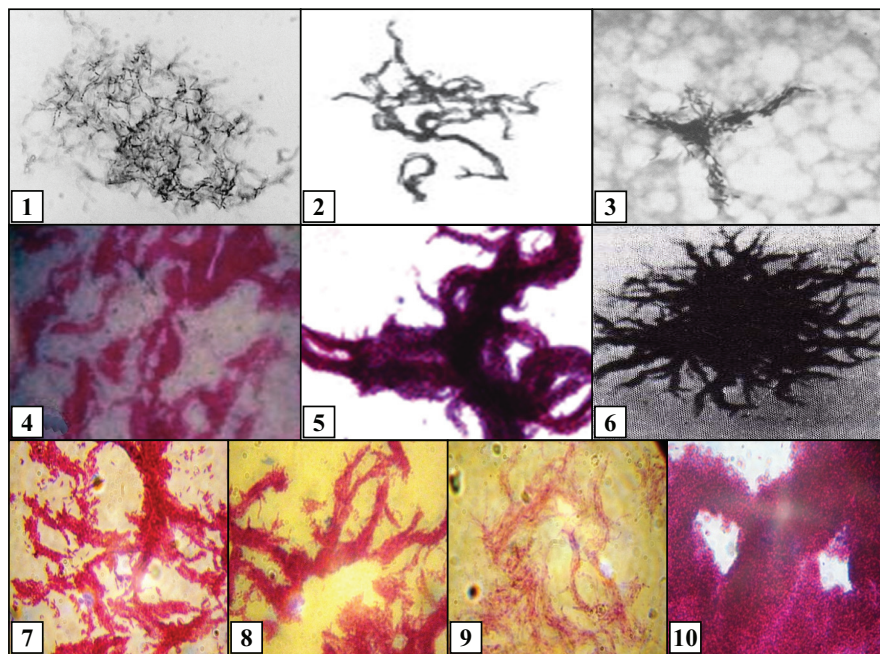


Рис. 111. Мікроколонії *M. avium* та атипівих мікобактерій:

1 – *M. kansasii* у середовищі ВАСТЕС 7Н12, за даними Yagupsky P.V. et al., 2003; × 950; 2 – *M. abscessus* у середовищі 7Н9, за даними Howard S.T. et al., 2006; × 400; 3 – *M. avium* у середовищі ВАСТЕС, за даними Attori S. et al., 2000; 4 – *M. kansasii* у середовищі MB/VacT, за даними Coelho A.G. et al., 2007; × 1600; 5 – *M. marinum*, за даними J. F. Staropoli and J. A. Branda, 2008; 6 – *M. phlei*, за даними Количева Н.М., 1980; × 900; 7, 8, 9, 10 – *M. xenopi*, *M. phlei*, *M. vaccae*, *M. phlei* у середовищі Школьникової, за нашими даними; × 1500

Т.В. Закарідзе в 1965 та М.М. Lal в 1972 роках повідомили, що окремі види атипівих мікобактерій з фотохромогенної та нехромогенної груп, за класифікацією Раніона, здатні утворювати “косоподібні” мікроколонії.

Про атипіві мікобактерії, які мають корд-фактор, повідомляють L. Richmond і М.М. Cummings (1950); L. Richmond і М.М. Cummings (1950); S.W. Gilkerson й співавт. (1966); K.N. Joishy і М.В. Sant (1969); Н.М. Кольчев (1980) – *M. phlei*; P.V. Yagupsky й співавт. (1990); А.Ј. Morris і L.B. Reller (1993); А.Ј. Morris й співавт. (1993); D.A. Kaminski і D.J. Hardy (1995) – *M. szulgai*; Y.S. McCarter й співавт. (1998); F.Z. Badak й співавт. (1999); F.Z. Badak й співавт. (1999); F.Z. Badak й співавт. (1999) – *M. xenopi*; F.Z. Badak й співавт. (1999) – *M. scrofulaceum*; F.Z. Badak й співавт. (1999) – *M. terrae*; S. Attori й співавт. (2000) –

M. gordonae; S. Attorri й співавт. (2000); Т.Р. McCorry й співавт. (2004) – *M. nonchromo-genicum*; L. Hall-Stoodley й співавт. (2006); S.T. Howard (2006) – *M. abscessus*; Andrea Gobetti Vieira Coelho й співавт. (2007) – *M. kansasii*; Andrea Gobetti Vieira Coelho й співавт. (2007) – *M. fortuitum*; J.F. Staropoli (2008) – *M. marinum*.

Поряд із виявленням здатності *M. tuberculosis* та *M. bovis* формувати “коси” та “джугти”, Р.Р. Коemoth й співавт. в 1991 році описали й особливості морфології мікроколоній атипичних мікобактерій деяких видів. Так, у мазках, приготовлених з *M. xenopi*, спостерігаються палички, які розташовані у вигляді “частоколу”, “морського їжака” та “пташиного гнізда”. Подібна форма мікроколоній відмічена у 47 (96 %) культур *M. xenopi* J. Gonzales й співавт. в 1998 році. *M. kansasii* являють собою довгі товсті палички з нерівномірним забарвленням, мають поперекону смугастість і своєю формою нагадують “сходи”.

Таку морфологію було описано у 66–83 % досліджених культур цього виду бактерій J. Gonzales й співавт. в 1998 році; S. Attorri й співавт. в 2000 році; Tu Hui-Zin й співавт. в 2003 році.

Мікобактерії окремих груп розташовуються у скупченнях, які мають вид “китайських ієрогліфів”, про що повідомляє J. Gonzales й співавт. (1998).

S. Attorri й співавт. (2000), Tu Hui-Zin й співавт. (2003) описали особливості морфології *M. gordonae* та *M. avium* деяких культур. Так, підкреслено, що *M. gordonae* розташовуються довгими ланцюжками, а *M. avium* у вигляді “куль”.

Мікобактерії штаму *BCG* з залишковою вірулентністю та атенуйовані штами мають незначну кількість корд-фактору й здатні утворювати мікроколонії у вигляді “джугтів”, “пухких кіс” та “косоподібної” форми (*рис. 112*), про що повідомлено G. Middlebrook й співавт. (1947); H. Bloch (1950); S. Froman й співавт. (1955); E. Darzins і G. Fahr (1956); М.М. Дыхно (1964); М.А. Сафин (1981); С.Л. Silva й співавт. (1985); С.Л. Silva й співавт. (1986); E. Rhoades й співавт. (2003); R.E. Geisel й співавт. (2005); Y. Fujita й співавт. (2005).

Деякі автори за мікроскопії тканин курячих ембріонів дійшли висновку, що і патогенні, і атипичні мікобактерії утворюють скупчення клітин у вигляді “кіс” та “джугтів” (Федосеев В.С., 1966; Гелетюк В.З., 1968; Кравченко Н.О., 2003).

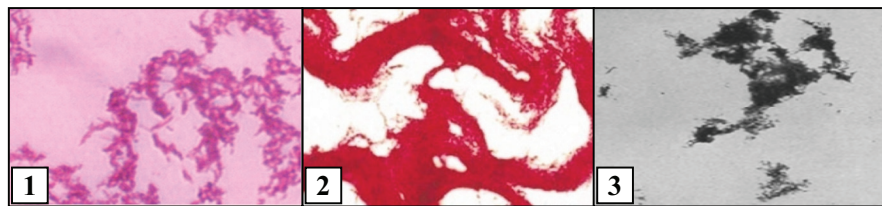


Рис. 112. Мікроколонії *M. bovis* атенуйованого штаму та *BCG*:
 1 – штаму *BCG*, за нашими даними; 2 – штаму *BCG*, за даними Glickman
 M.S. et al., 2000; 3 – авірулентного штаму *H37Ra*,
 за даними Middlebrook G. et al., 1947 × 600–1000

Електронно-мікроскопічним дослідженням виявлено, що патогенні мікобактерії в мікроколоніях з'єднані між собою за допомогою мостів. Мікобактерії людського виду розташовуються в мікроколоніях, щільно прилягаючи одна до одної. При старінні культури клітини направлені в різні сторони і розташовуються більш пухко (Левченко Т.Н. й співавт., 1988). А.О. Бокун в 1989 році описав протилежний процес за старіння культури: кількість бактерій збільшується, а культура ущільнюється.

Нативною мікроскопією L-форм мікобактерій із середовища Школьнікової інколи відмічають наявність корд-фактору у вигляді мікроколоній “тяжистого” типу (Гольшевская В.И. й співавт., 1987; Козак Т.И. и Потоскуев Ю.А., 1987). Подібне явище спостерігали за прямої реверсії L-форм у бактеріальну форму Е.А. Асташова и А.Н. Кадочкин у 1989 році; И.Р. Дорожкова й співавт. в 1989 році; Ю.І. Фещенко й співавт. в 2006 році; В.М. Манченко й співавт. в 1994.

6,6-диміколат трегалози є біологічно активним гліколіпідом і в разі введення лабораторним тваринам проявляє токсичність та призводить до формування гранулом у внутрішніх органах, про що повідомляють К. Fukuyama й співавт. (1971); E. Yarkioni й співавт. (1976); С.Л. Silva й співавт. (1986); E. Sueoka й співавт. (1995); T. Baba й співавт. (1997);

N. Namasaki й співавт. (2000); J.K. Actor й співавт. (2001); H. Yamagami й співавт. (2001); J.K. Actor й співавт. (2002-2003); J. Indrigo й співавт. (2003); T.V. Guidry й співавт. (2004); R.E. Geisel й співавт. (2005); С.W. Borders й співавт. (2005); T.V. Guidry й співавт. (2006); R.L. Hunter й співавт. (2006); R.L. Hunter й співавт. (2006); Y. Okamoto й співавт. (2006); Y. Fujita й співавт. (2007); T.V. Guidry й співавт. (2007); K.J. Welsh й співавт. (2008). Механізм цього явища пов'язаний з тим, що в організмі тварин корд-фактор індукуює виробництво передзапальних цитокінінів: фактори некрозу пухлин (tumor necrosis factor), комплементу (complement C5), інтерлейкінів (interleukin-6, interleukin-1 beta), запального білка (macrophage inflammatory protein-1 alpha), хемокіну (СХС chemokine KC); на гістозрізах знаходять лімфоїдну інфільтрацію тканин легень, структурний розпад ендоплазматичного ретикулуму й збільшення кількості вільних рибосом у гепатоцитах. Такої думки дотримуються К. Fukuyama й співавт. (1971); С.W. Borders й співавт. (2005); T.V. й Guidry співавт. (2006); K.J. Welsh й співавт. (2008).

Проте наявність корд-фактору в авірулентних мікобактерій, про що повідомляють перелічені автори, повністю спростовує механізм біологічної активності 6,6-деміколат трегалози.

Корд-фактор можна використовувати як ад'ювант у складі вакцин та в системі протипухлинної терапії, стверджують E. Yarkioni й співавт. (1974); С. Leclerc й співавт. (1976); R. Saito й співавт. (1976); R. Saito й співавт. (1977); E. Yarkioni й співавт. (1977); E. Yarkioni й співавт. (1979); E. Yarkioni (1979); E. Yarkioni й співавт. (1979); A. Sharma й співавт. (1985); К.М. Lima й співавт. (2003).

Дехто з учених під час мікрокультивування використовують 30-добове

культивування мікобактерій у живильному середовищі (Федосеев В.С., 1966), що свідчить про різну потенційну здатність мікроорганізмів.

Це підтверджується тим, що додавання деяких речовин до складу живильного середовища може змінювати інтенсивність утворення мікобактеріями туберкульозу мікроколоній “тяжистого” типу. Так, ТВІН-80 значно послаблює формування “кіс” та “джгутів”, про що повідомляють G. Middlebrook й співавт. (1947); R. Dubos і G. Middlebrook (1948), а Triton WR-1339 та екстракт курячого ембріона посилюють цей процес (рис. 113 й 114). На цьому наголошують Н. Bloch (1948); Y. Lorian (1966).

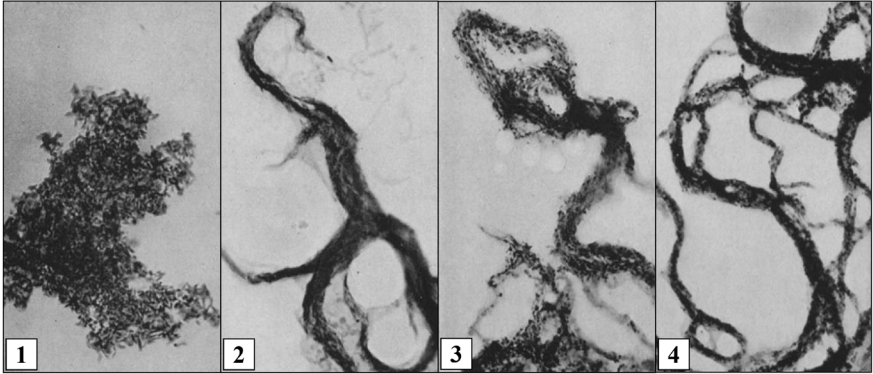


Рис. 113. Вплив екстракту курячого ембріона на морфологію мікроколоній мікобактерій 8-добового віку в середовищі “oleic acid-albumin”, за даними Bloch H., 1948: 1 та 2 – *M. tuberculosis* авірулентного штаму H37Ra без та з додаванням 0,5%-вого екстракту курячого ембріона; 3 та 4 – *M. tuberculosis* вірулентного штаму H37Rv без та з додаванням 0,5%-вого екстракту курячого ембріона відповідно $\times 1090$

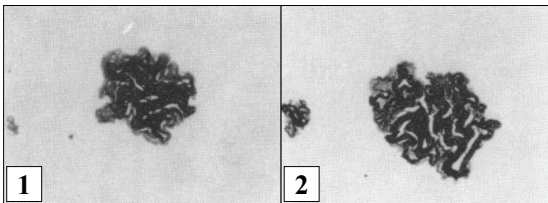


Рис. 114. Вплив 0,5%-вого розчину WR 1339 на морфологію мікроколоній *M. tuberculosis* у середовищі Middlebrook 7H10, за даними Lorian V., 1966:

1 – без додавання розчину WR 1339;
2 – з додаванням такого розчину $\times 60$

О.А. Дьячкова в 1991 році доводила, що метод висіву суспензії досліджуваного матеріалу на кров'яне середовище з подальшим виявленням росту мікобактерій у вигляді “кіс” на 13,4 % ефективніше, ніж висів на традиційне живильне середовище Левенштейна-Йенсена, що дозволяє скорочувати час отримання результатів більш ніж у 9 разів.

За даними Є.А. Лієпинш (1975), паралельне використання середовищ Гельберга та кров'яного (для мікрокультивування) ефективніше, ніж кожного окремо.

Така властивість мікобактерій визначає те, що результати бактеріологічного дослідження молока шляхом макро- та мікрокультивування можуть не співпадати. За наявності росту мікрокультур на середовищі Юменса зі сироваткою крові не завжди утворюються колонії на щільному яєчному середовищі Петраньяні, на що звертав увагу В.Г. Звозчик (1967).

І.П. Білько (1989) стверджує пропорційність між часом появи мікро- та макроросту. Так, при дослідженні мікобактерій семи культур макроріст був виявлений на 21, а мікроріст на 5–6 добу, шести культур відповідно – на 28 та 7 добу, семи культур – на 35 та 10 добу, у 12 культур – на 42 та 12 добу.

Ряд дослідників вважають, що мікроскопічне виявлення росту мікобактерій у вигляді “кіс” та “джгутів” може використовуватися як швидкий метод попередньої лабораторної діагностики туберкульозу (Lorian Y., 1966; Yagupsky P.V. й співавт., 1990; Kaminski D.A., Hardy D.J., 1995; McCarter Y.S. й співавт., 1998; Gonzales J. й співавт., 1998; Badak F. Z. й співавт., 1999; Attorri S. й співавт., 2000; Koksalan O.K. й співавт., 2002; Hui-Zin Tu й співавт., 2003; Monteiro P.H. й співавт., 2003; Abe K. й співавт., 2006; Andrea Gobetti Vieira Coelho й співавт., 2007; Staropoli J.F. і Branda J.A., 2008). Такий погляд дослідників не поділяють Morris A.J. та Reller L.B. (2003), які переконані в недоцільності використання результатів виявлення корд-фактору (Morris A.J. і Reller L.B., 1993) в лабораторній діагностиці туберкульозу.

Одним із суттєвих недоліків методу виявлення мікроколоній у вигляді “кіс” та “джгутів”, на думку P.V. Yagupsky й співавт. (1990); F.Z. Badak й співавт. (1999), є суб'єктивність висновків результату мікроскопії. Так, з перегляду мазків 88 культур *M. tuberculosis complex* трьома дослідниками, мікроколонії як “коси” були виявлені першим бактеріологом у 82 (93,2 %) культур, другим – у 78 (88,6 %) та третім – у 73 (83,0 %). Того ж часу в мазках 182 культур атипових мікобактерій такі мікроколонії були описані тільки двома науковцями (1,6 % від усіх культур), тоді як третій таких мазків взагалі не виявив. Подібні висновки зробили й S. Attorri й співавт. (2000): без попереднього досвіду та тренувань науковець може виявити до 11 % менше мазків з мікроколоніями у вигляді “джгутів”.

Тест на наявність корд-фактору можна використовувати для визначення чутливості мікобактерій до протитуберкульозних препаратів, так стверджують Н.М. Рудой (1965); Г.А. Юдин (1966); P.R. Gupta й співавт. (1992); О.А. Журило й співавт. (2001); Г.Б. Соколова й співавт. (2002), та для бактеріологічного контролю якості дезінфекції в неблагополучних щодо туберкульозу господарствах: Б.Я. Хайкин и И.С. Селистратов (1986); Л.А. Вареца (1972); С.Г. Письменная (1973); И.А. Дудницкий (1991); С. Piersimoni й співавт. (2001).

Отже, екскурс в глибину досліджуваного питання засвідчив, що й дотепер роль корд-фактору в біологічній активності мікобактерій остаточно не визначена, тому потребує подальшого з'ясування, особливо на тлі появи швидкорослих *M. bovis*.

5.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Досить тривале вивчення прояву корд-фактору мікобактерій науковцями різних країн залишило ще й донині нез'ясованими питання, які не дають однозначної відповіді стосовно його значення в лабораторній діагностиці туберкульозу взагалі. Звичайно, це й визначає напрям досліджень, які б уточнювали характер та розкривали роль корд-фактору в біологічній активності мікобактерій того чи іншого виду та штаму.

5.2.1. Корд-фактор та зв'язок його з біологічною активністю мікобактерій

Корд-фактор досліджували та оцінювали за здатністю мікобактерій формувати мікроколонії у вигляді “кіс” та “джгутів” шляхом культивування їх у напівсинтетичному середовищі Школьникової. Для цього використали мікобактерії (штами):

- культур № 2–5; 7, виділених із патолого-анатомічно змінених лімфатичних вузлів великої рогатої худоби неблагополучного щодо туберкульозу господарства “Чумаки” Дніпропетровського району;
- культур № 1 та 6, виділених із патолого-анатомічно змінених лімфатичних вузлів великої рогатої худоби неблагополучного щодо туберкульозу господарства “Злагода” Новомосковського району;
- культур № 12–14, виділених із патолого-анатомічно незмінених лімфатичних вузлів корови, реагуючої на ППД-туберкулін для ссавців, благополучного щодо туберкульозу господарства “Самарський” Дніпропетровського району;
- культури № 15, виділені з патолого-анатомічно незмінених лімфатичних вузлів корови, реагуючої на ППД-туберкулін для ссавців, благополучного щодо туберкульозу господарства “Аврора” Солонянського району;
- культури № 16, виділені з патолого-анатомічно незмінених лімфатичних вузлів корови, реагуючої на ППД-туберкулін для ссавців, благополучного щодо туберкульозу господарства “Вікторія” Солонянського району;
- культур № 17 та 18, виділених із біоматеріалу морської свинки;
- культури:
 - штаму “Шахтар” (*M. bovis* епізоотичні), який у 2003 році був виділений аспірантами М.В. Білан та Г.І. Хільченко і знаходиться в музеї навчально-дослідної лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету;
 - штаму Vallee, який у 2002 році був наданий нам на середовищі Павловського Інститутом сільськогосподарської мікробіології (м. Чернігів);
 - штаму BCG (взятий із вакцини БЦЖ, виробник “НПО Микроген” МОЗ РФ, м. Ставрополь);
- культури епізоотичного штаму (*M. bovis* швидкорослі), який у 2003 році був виділений професором О.А. Ткаченком і знаходиться в музеї навчально-дослідної лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб Дніпропетровського державного аграрного університету:
 - ✓ вихідної (“Ш6”);
 - ✓ пасажовані 60 разів через щільне яєчне середовище ДП “Ветеринарна медицина” (рН = 7,0–7,2)– культура “Ш7”;
 - ✓ пасажовані 60 разів через щільне яєчне середовище “Нове” Мордовського (рН = 6,5) – культура “Ш8”;
 - ✓ пасажовані 100 разів через щільне яєчне середовище з рН = 7,0–7,2 – культура “Ш9”;
 - ✓ пасажовані 100 разів через щільне яєчне середовище з рН = 6,5 – культура “Ш10”;
 - ✓ пасажовані 160 разів через щільне яєчне середовище з рН = 6,5 – культура “Ш11”.

5.2.2. Динаміка “косоутворення” у *M. bovis* швидко- та повільно-рослого штамів

V. Lorian в 1966 році повідомив, що подовження терміну культивування мікобактерій до 21-ї доби підвищує інтенсивність формування “кіс”. Проте В.С. Федосеев в 1966 році заперечив, що збільшення терміну культивування до 25–30 діб не підвищує частоту виявлення штамів, які здатні до “косоутворення”. Тому, враховуючи такі повідомлення, для з’ясування ступеня інтенсивності формування мікроколоній у вигляді “кіс” спочатку культивували мікобактерії у середовищі Школьникової протягом 40 діб та на 2–3, 5–7, 10–12, 15–20, 25–30 та 35–40 добу, з осадку кожних трьох пробірок робили мазки, фарбували за Цілем-Нільсеном і мікроскопіювали. Матеріалом для досліджень були *M. bovis* швидко- та повільнорослого штамів.

У результаті досліджень встановлено, що швидкість формування макроколоній не впливає на здатність мікобактерій формувати “коси”.

На 2–3-ю добу культивування у мазках обох штамів мікроколоній у вигляді “кіс” не було. Ріст мікобактерій відбувався дифузно.

Дослідженнями на 5–7-у добу помічено, що в мазках серед хаотичного розміщення мікобактерій спостерігалися поодинокі скупчення “косоподібної” форми. Такі мікроколонії формувалися щільно прилеглими одна до одної клітинами. Ширина скупчень становила до 2–3 мкм.

Зі збільшенням терміну культивування до 10–12 діб виявлено, крім “косоподібних” скупчень, “косички” та “коси”. Ширина таких мікроколоній була 5–7 мкм.

У більш віддалені терміни культивування (15–20, 25–30 та 35–40 діб) максимальна ширина мікроколоній в обох штамів не перевищувала 10, 12–13 та 15 мкм відповідно. Густина прилягання мікобактерій у мікроколоніях була високою.

Отже, швидкість формування колоній мікобактеріями різних штамів на щільному живильному середовищі в проміжку 2–3 та 7–10 діб не впливає на інтенсивність формування мікроколоній у вигляді “кіс” (на 5–7 добу культивування). Зі збільшенням терміну культивування мікобактерій з 15–20 до 35–40 діб спостерігається зростання інтенсивності мікроколоній у 1,5 раза, тобто наростає інтенсивність „косоутворення”. Це обґрунтувало необхідність проведення подальших досліджень з обліком мікроколоній (“кіс”) на 15–20 та 35–40 добу. Такий методичний підхід, за розширених досліджень такого спрямування, може сприяти одержанню більш об’єктивних результатів.

Тому на початку цієї роботи вивчали корд-фактор у *M. bovis* з класичними за морфологією, культуральними, біохімічними й патогенними властивостями, а в подальшому зі зміненими. Для порівняння використали п’ять штамів атипових мікобактерій.

5.2.3. Корд-фактор та біологічна активність мікобактерій бичачого виду

За дослідженнями, результати яких подані у викладеному матеріалі, *M. bovis* культур № 1, 3–6, “Шахтар” та Vallee мали відносно однакову вірулентність: морські свинки гинули протягом 35–44 діб з характерними для туберкульозу патолого-анатомічними змінами.

Вивчаючи та оцінюючи корд-фактор, встановили, що на 15–20 добу культивування тільки мікобактерії культур № 1, 3, 4, “Шахтар” та Vallee формували характерні мікроколонії у вигляді “кіс” (табл. 42, рис. 115 та 116).

42. Корд-фактор (“коси”, “джгути”) мікобактерій бичачого виду

Культура, №	Вірулентність мікобактерій ¹	Час появи макроколоній, доба ³	Характеристика мікроколоній, доба					
			форма		максимальна ширина, мкм		густина скупчення мікобактерій	
			15–20	35–40	15–20	35–40	15–20	35–40
6	35–39	18,8	скупчення до 100 клітин	“коси”	3–4	7–8	пухко, щільно	щільно
5	37–39	18,8	скупчення до 30 клітин	НД	2–3	НД	щільно	НД
“Шахтар”	37–39	13,7	“коси”	“коси”, “джгути”	10	15	щільно	щільно
1	37–44	12,4	“коси”	“коси”	5	6–7	пухко, щільно	щільно, пухко
3	36–42	17,6	“коси”	“коси”	5	10	пухко, щільно	щільно, пухко
4	38–42	17,4	“коси”	“коси”	5	12	щільно, пухко	щільно, пухко
Vallee	41–44	7,3	“коси”	“коси”, “джгути”	10	15–17	пухко, щільно	щільно, пухко
7	90	31,2	скупчення до 30 клітин	“коси”, “косоподібна”	2–3	5	пухко	пухко, щільно
BCG	90 ²	15,3	скупчення 2–5 клітин	“косоподібна”	–	2–3	–	пухко

¹ Період життя заражених морських свинок; ² без видимих патолого-анатомічних змін в органах морських свинок; ³ час появи колоній на середовищі з рН 7,0–7,2 в середньому за п'ять пасажів; НД – не досліджувалися.

У мазках, приготовлених з культури “Шахтар”, мікроколонії, що утворилися, мали максимальну ширину 15 мкм. Проте в культур № 1, 3, 4 ширина “кіс” була втричі менша.

Біологічною пробою було засвідчено, що вірулентність мікобактерій культур № 5–7 та BCG була різною. Так, культури № 5 та 6 викликали загибель лабораторних тварин у період від 35 до 39 доби. Морські свинки, яким вводили *M. bovis* культури № 7 та BCG, залишалися живими протягом досліду, але на розтині тварин патолого-анатомічні зміни відмітили тільки в тих, які були заражені мікобактеріями епізоотичного штаму (№ 7). Однак різновірулентні культури не формували мікроколонії у вигляді “кіс” та “джгутів”. Розташування мікобактерій у мазках було дифузним та у вигляді різної форми скупчень з 20–100 клітин (рис. 117).

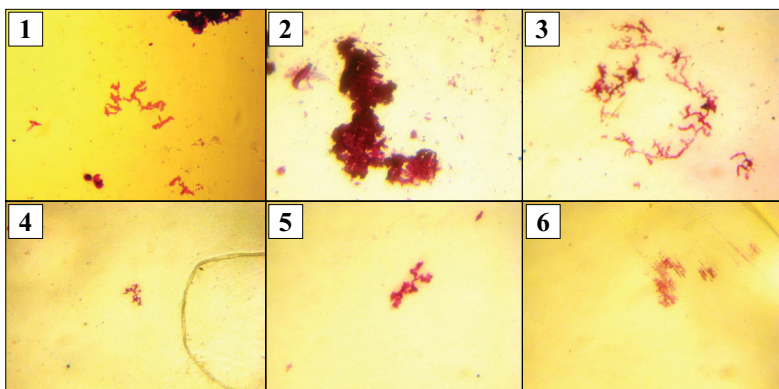


Рис. 115. Мікроколонії *M. bovis* на 15–20 добу культивування:
1, 2 – штами *Vallee*; 3, 4 – культури № 4; 5 – культура № 3; 6 – культура № 1
×150

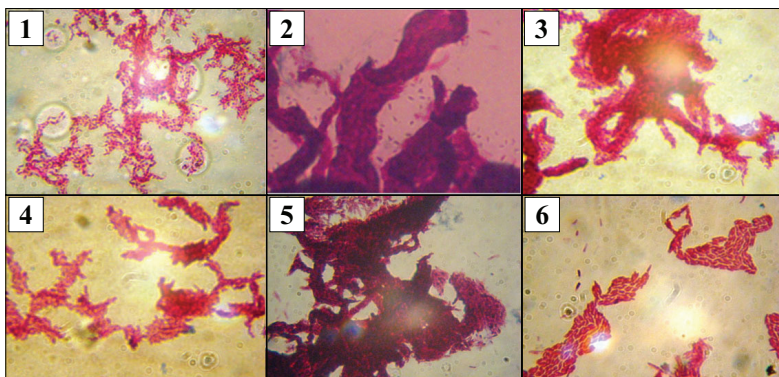


Рис. 116. Мікроколонії *M. bovis* на 15–20 добу культивування:
1 – культура № 3; 2 – штам “Шахтар”; 3, 4 – культура № 4;
5, 6 – штами *Vallee* ×1500

Культури мікобактерій, у яких не виявили на 15–20 добу культивування мікроколонії у вигляді “кіс”, мали різну швидкість росту на щільному яєчно-му середовищі.

Появу росту мікобактерій штаму *BCG* відмічали в середньому з 15,3 доби, культур № 5 та 6 – з 18,8, а № 7 – з 31,2 доби. Відзначимо, що мікобактерії штаму *Vallee* формували колонії на середовищі з рН 7,0–7,2 швидше у два рази, ніж мікобактерії культур № 3 та 4, хоча максимальна ширина мікроколонії була в культур № 3 та 4 у два рази менша, ніж у *M. bovis* референтного штаму *Vallee*.

Мікобактерії штаму “Шахтар” на яєчному середовищі формували колонії у два рази повільніше, ніж штаму *Vallee*.

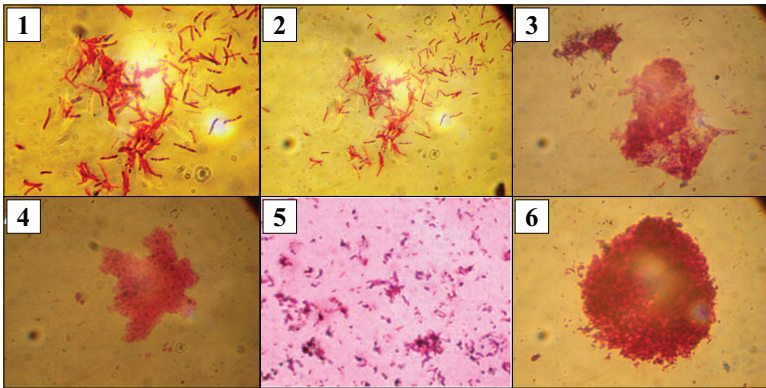


Рис. 117. Мікроколонії *M. bovis* на 15–20 добу культивування: 1, 2 – штам BCG; 3 – культура № 6; 4 – культура № 5; 5, 6 – культура № 7 ×1500

Мікроскопією мазків, приготовлених з культури (колоній) штаму „Шахтар” із середовища Школьнікової, на 15–20 добу культивування виявили, що ширина мікроколоній обох культур не перевищувала 10 мкм.

Зі збільшенням часу культивування мікобактерій до 35–40 діб у рідкому напівсинтетичному середовищі додатково було виявлено культури, які утворювали мікроколонії характерного “гіллястого” типу. Так, на 35–40 добу культивування культури № 6 та 7 утворювали “коси” різної інтенсивності. Мікобактерії культури № 6 формували поодинокі “товсті коси”, ширина яких не перевищувала 5 мкм. Були виявлені також щільні скупчення клітин, форма яких була різноманітною (рис. 118). Мікрокультура № 6 формувала “коси”, ширина яких сягала 7–8 мкм.

M. bovis вакцинного штаму формували скупчення клітин, які дещо нагадували “косички”. Такі “пухкі косоподібні” утворення були шириною 2–3 мкм і довжиною до 80 мкм.

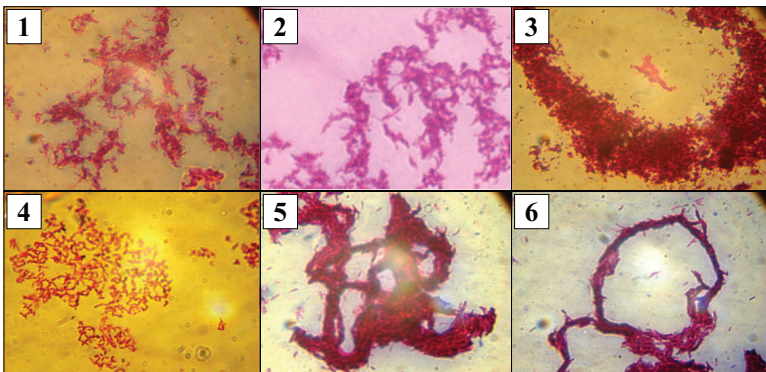


Рис. 118. Мікроколонії *M. bovis* на 35–40 добу культивування: 1, 2 – штам BCG; 3, 4 – культура № 7; 5, 6 – культура № 6 ×1500

Більш подовжене (35–40 діб) культивування мікобактерій культур № 3 та 4 сприяло збільшенню удвічі й більше ширини мікроколонії. Встановлено, що серед досліджуваних мікобактерій ширина “джгутів” була найбільшою у штамів *Vallee* та “Шахтар” – до 15–17 мкм.

Отже, отримані результати не підтверджують думку E. Darzins і G. Fahr (1956), Алеб Мохамед Омар (1974), И.П. Билька (1989), які наголошують на зв’язку між корд-фактором та біологічною активністю штамів *M. bovis* (патогенністю, швидкістю росту на живильному середовищі й ін.).

У той же час нами вперше встановлено появу корд-фактору (“кіс”) за більш тривалого культивування мікобактерій (40 діб), що підтверджує думку про непізнаність явища.

5.2.4. Корд-фактор та біологічна активність *M. bovis* швидкорослого штаму, пасажованого через живильні середовища

Мікобактерії швидкорослого штаму, пасажовані через живильне середовище з рН 6,5 та 7,0–7,2, володіли здатністю утворювати мікроколонії у вигляді “кіс”. Але зі збільшенням кількості пасажів через щільне живильне середовище паралельно відбувалося зниження вірулентності мікобактерій та інтенсивності формування характерних мікроколоній. Так, після 60-кратного пасажування мікобактерій через обидва яєчні середовища на 35–40 добу культивування в обох культур максимальна ширина “кіс” була до 10 мкм, що на 5 мкм менше, ніж у вихідній культурі (табл. 43, рис. 119, 120).

43. Корд-фактор (“коси”, “джгути”) *M. bovis* швидкорослого штаму, пасажованих через живильні середовища

Культура		Вірулентність мікобактерій ¹	Характеристика мікроколоній, доба					
пасаж, №	рН середовища		форма		максимальна ширина, мкм		густина скупчення мікобактерій	
			15–20	35–40	15–20	35–40	15–20	35–40
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 ²	“коси”	“коси”	5	10	щільно, пухко	щільно, пухко
160	6,5	НД	“коси”	“коси”	5	5	щільно	щільно
			“косоподібні”	“косоподібні”	2–3	2–3	пухко	пухко

¹Період життя заражених морських свинок;

²без видимих патолого-анатомічних змін в органах морських свинок;

НД – не досліджувалися.

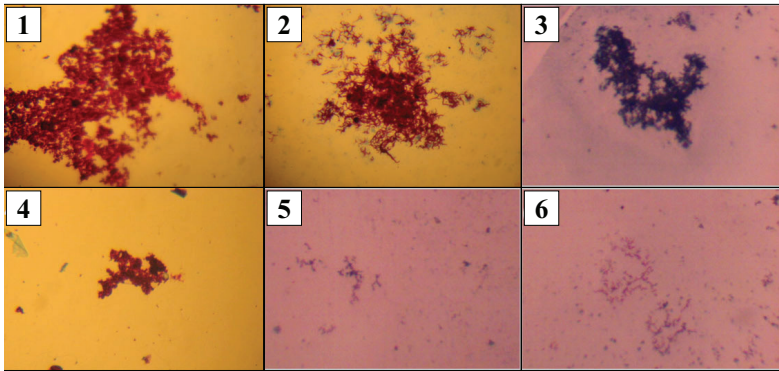


Рис. 119. Мікроколонії M. bovis швидкорослого штаму:

1 – вихідна культура на 35–40 добу культивування; 2 – пасажовані 60 разів через живильне середовище з рН 7,0–7,2 на 35–40 добу культивування; 3 – пасажовані 60 разів через живильне середовище з рН 6,5 на 35–40 добу культивування; 4 – пасажовані 100 разів через живильне середовище з рН 7,0–7,2 на 15–20 добу культивування; 5 – пасажовані 100 разів через живильне середовище з рН 6,5 на 15–20 добу культивування; 6 – пасажовані 160 разів через живильне середовище з рН 6,5 на 15–20 добу культивування
×150

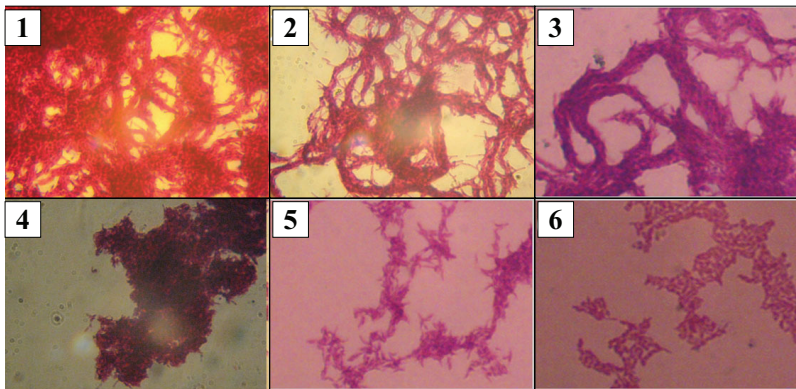


Рис. 120. Мікроколонії M. bovis швидкорослого штаму:

1 – вихідна культура на 35–40 добу культивування; 2 – пасажовані 60 разів через живильне середовище з рН 7,0–7,2 на 35–40 добу культивування; 3 – пасажовані 60 разів через живильне середовище з рН 6,5 на 35–40 добу культивування; 4 – пасажовані 100 разів через живильне середовище з рН 7,0–7,2 на 15–20 добу культивування; 5 – пасажовані 100 разів через живильне середовище з рН 6,5 на 15–20 добу культивування; 6 – пасажовані 160 разів через живильне середовище з рН 6,5 на 15–20 добу культивування
×1500

Авірулентні мікобактерії, які 100 разів пасажувалися через щільне середовище з рН 6,5, порівняно з вихідними вірулентними, на 15–20 добу культивування мали ширину мікроколоній меншу вдвічі. Того ж часу мікобактерії, які 100 разів пасажувалися через середовище з рН 7,0–7,2, викликали загибель морських свинок наприкінці досліду з характерними для туберкульозу патолого-анатомічними змінами. Максимальна ширина мікроколоній була практично однакова з культурою, яка пасажувалася 60 разів через аналогічне середовище. Із 100-го пасажу в мікроколоніях мікобактерії розташовувалися пухко. Такі дані підтверджують, що мікобактерії, культивовані на щільному середовищі з рН 7,0–7,2, зберігають вірулентність та здатність проявляти корд-фактор (формувати “коси” та “джугути”) більш тривало, ніж на середовищі з рН 6,5. На це вказують й М.В. Зеленська (2006); О.А. Ткаченко й співавт. (2010).

Мікобактерії, які були пасажовані 160 разів через середовище з рН 6,5, формували поодинокі “коси”, ширина яких зменшилася, порівняно з вихідними, у два рази на 15–20 добу культивування та у три рази на 35–40 добу. У мазках цієї культури спостерігалися мікроколонії “косоподібної” форми, які морфологічно схожі зі скупченнями, що утворювали мікроорганізми штаму *BCG*.

Отже, зі збільшенням кількості пасажів відібраних для експерименту мікобактерій знижується вірулентність та інтенсивність прояву корд-фактору (формування “кіс” та “джугутів”), хоча ці процеси більш виражені в мікобактерій, які пасажувалися на щільному середовищі з рН 6,5. Результати, одержані в цих дослідженнях, підтверджують наявність зв’язку між вірулентністю та корд-фактором (“косоутворенням”) *M. bovis* швидкорослого штаму. Тобто за наявності, певно на достотньо високому рівні, в мікробній клітині 6,6-диміколат трегалози спостерігається його прояв у вигляді “кіс” та “джугутів”, а за її зниження косоутворення не відбувається. Звичайно, що за змін метаболізму, які відбуваються в процесі пасажування мікобактерій, змінюється не тільки кількісний вміст 6,6-диміколат трегалози, а й інших біохімічних складових клітини, в тому числі й таких, що відповідають за вірулентність. Тому можна тільки умовно пов’язувати ці аналізовані показники.

5.2.5. Корд-фактор та біологічна активність атипівих мікобактерій

Для вивчення цього питання в атипівих мікобактерій використали швидкорослі штами (формували колонії на щільному живильному середовищі до семи діб), які не володіли патогенністю для морських свинок.

Атипові мікобактерії культур № 13 (*M. phlei*) та 14 на 15–20 добу культивування в мазках, приготовлених з культури середовища Школьникової розміщувалися дифузно та у вигляді невеликих безформених скупчень, які склалися з 20–70 щільно прилеглих одна до одної клітин. Крім цього, у культурі № 14 були виявлені невеликі мікроколонії “гіллястого” типу та поодинокі “коси”, які мали колоподібну форму (рис. 121).

Ширина “кіс” була неоднаковою і коливалася в межах 3–12 мкм. Мікобактерії культури № 14 іноді розміщувалися невеликими ланцюжками, які склалися з коротеньких (1,0–1,5 мкм) паличок та гранул.

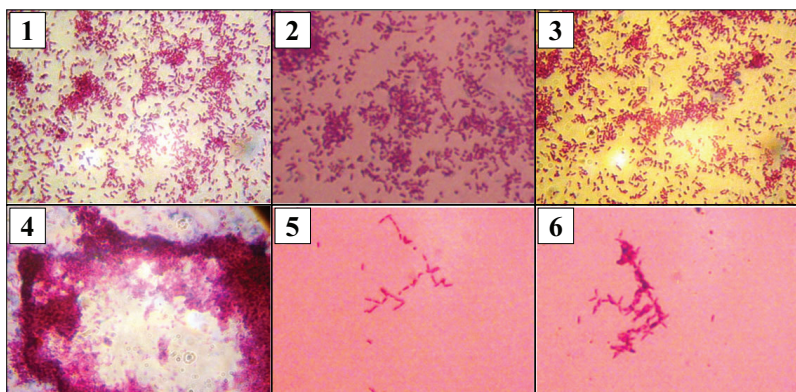


Рис. 121. Мікроколонії культур № 13 (*M. phlei*) та 14 на 15–20 добу культивування:

1–3 – № 13 (*M. phlei*) у вигляді невеликих безформених скупчень мікобактерій;
4–6 – № 14 у вигляді колоподібної форми та невеликих ланцюжків
×1500

Культури № 12 (*M. xenopi*) та 16 (*M. phlei*) формували мікроколонії у вигляді “кіс” та характеризувалися практично подібними властивостями. Так, на 15–20 добу культивування ширина “кіс” була до 5 мкм, мікобактерії у “косах” були розташовані щільно (табл. 44). За межами сформованих “кіс” мікобактерії культури № 12, окрім паличок, мали форму коротких кислотостійких ниток із вираженою грануляцією. У той же час мікобактерії культури № 16 розміщувалися невеликими скупченнями у вигляді “паркану” або “частоколу” (рис. 122).

Культура № 15 (*M. vacca*) формувала мікроколонії у вигляді “кіс”. Ширина “кіс” становила до 5 мкм, мікобактерії в них розміщувалися пухко.

44. Корд-фактор (“коси”, “джгути”) атипичних мікобактерій

Культура, №	Характеристика мікроколоній, доба					
	форма		максимальна ширина, мкм		густина 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”	3–12	2–3	щільно	пухко
		“коси”		5		щільно
15 (<i>M. vacca</i>)	“коси”	НД*	2–5	НД	пухко	НД
16 (<i>M. phlei</i>)	“коси”	НД	2–5	НД	щільно	НД

*НД – не досліджувалися.

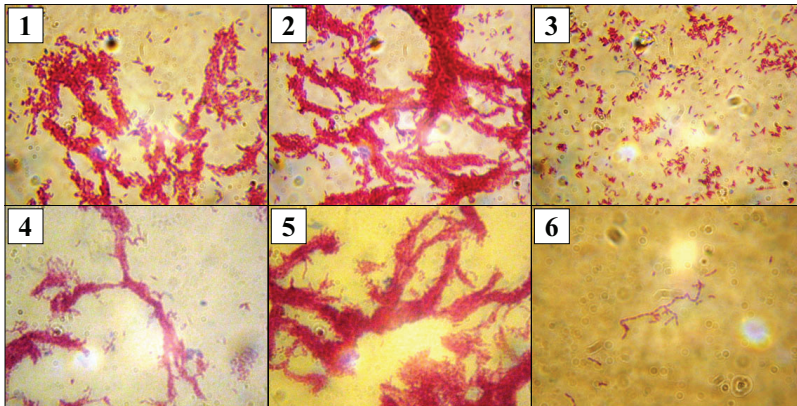


Рис. 122. Мікроколонії культур № 16 (*M. phlei*) та 12 (*M. xenopi*) на 15–20 добу культивування: 1, 2 – № 12 (*M. xenopi*) у вигляді „кіс”; 3 – № 12 (*M. xenopi*) в скупченнях у вигляді „паркану” або „частоколу”; 4, 5 – № 16 (*M. phlei*) у вигляді „кіс”; 6 – № 16 (*M. phlei*) у вигляді “ланцюжкоподібного” скупчення ×1500

У мазках, приготовлених з культури № 13 (*M. phlei*), на 35–40 добу культивування виявлено мікроколонії у вигляді „кіс” та „джгутів” із шириною до 40 мкм (рис. 123).

У культури № 14 було відмічено появу мікроколонії з більш характерною формою “кіс” та “джгутів” та численні “косоподібні” утворення мікобактерій.

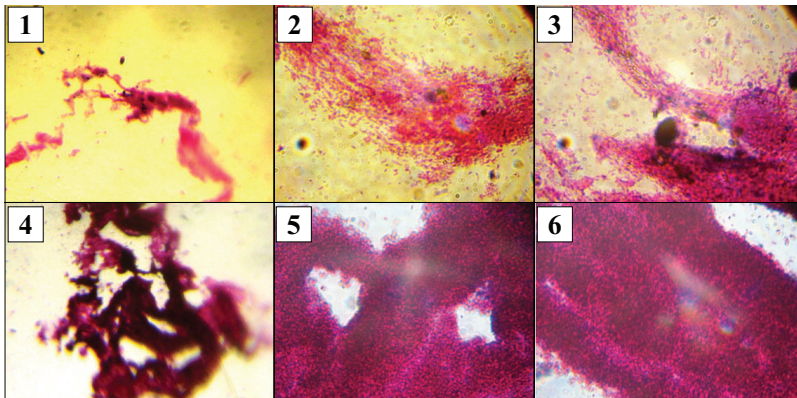


Рис. 123. Мікроколонії культур № 15 (*M. vacca*) та 13 (*M. phlei*):
 1 – № 15 (*M. vacca*) на 15–20 добу культивування ×150;
 2, 3 – № 15 (*M. vacca*) на 15–20 добу культивування ×1500;
 4 – № 13 (*M. phlei*) на 35–40 добу культивування ×150;
 5, 6 – № 13 (*M. phlei*) на 35–40 добу культивування ×1500

Отже, з п'яти досліджених чотири (80 %) культури атипичних мікобактерій (*M. vacca*, *M. phlei*, *M. xenopi* та неідентифікована) утворювали мікроколонії у вигляді “кіс” та “джгутів” (корд-фактор “+”) на 15–20 добу культивування, на 35–40 добу – всі п'ять (100 %). Ці дані на відміну від даних попередніх досліджень *M. bovis* швидкорослого штаму вказують на відсутність зв'язку між корд-фактором (“косоутворенням”) та біологічною активністю атипичних мікобактерій (патогенністю, швидкістю росту на щільному середовищі й ін.), оскільки всі вивчені штами мікроорганізмів не викликали у морських свинок патолого-анатомічних змін, характерних для туберкульозу, та були швидко-рослими.

5.2.6. Корд-фактор та біологічна активність мікобактерій, виділених від зараженої морської свинки

Під час бактеріологічних досліджень проб від морської свинки № 40, що була заражена мікобактеріями бичачого виду, виділили культури мікобактерій, які значно відрізнялися за культуральними властивостями від вихідної. Проведення туберкулізації перед дослідом значною мірою виключає можливість спонтанного туберкульозу, на чому наголошують В.М. Манченко й співавт. (1994). Тому наступним етапом досліджень було вивчення біологічної активності мікобактерій, виділених від зараженої *M. bovis* морської свинки.

За бактеріологічного дослідження біологічного матеріалу, відібраного від морської свинки № 40, було виділено культури № 17 та 18, які в першій генерації на 6–8 добу культивування формували колонії R-форми (нерівні краї та шорстка поверхня), сіруватого кольору, діаметром 2–3 мм. Ріст колоній субкультур спостерігався з 2–3-ї доби (табл. 45).

Нами було встановлено, що тільки мікобактерії швидкорослого штаму формували окремі колонії при культивуванні за температури 45 °С, не рос-

45. Культуральні властивості вихідних мікобактерій та виділених від морських свинок

Культура, №	Поява росту, доба	Форма колоній	Колір колоній	Ріст на яєчному середовищі за температури, °С			Ріст на м'ясо-пептонному агарі	Ріст на середовищі з натрієм саліцилово-кислим, мг/см ³	
				20–22	37	45		0,5	1,0
“Ш10” (вихідна)	2–3	R	слонової кістки	+	+	+	–	+	–
17	2–3	R	сірий	+	+	–	–	+	+
18	2–3	R	сірий	+	+	–	+	+	+

* спостерігався ріст мікобактерій на середовищі деяких пробірок.

ди на м'ясо-пептонному агарі та на середовищі з натрієм саліциловокислим у концентрації 1,0 мг/см³. Виділені культури № 17 та 18 росли на яєчних середовищах за кімнатної температури та з натрієм саліциловокислим (0,5 та 0,1 мг/см³).

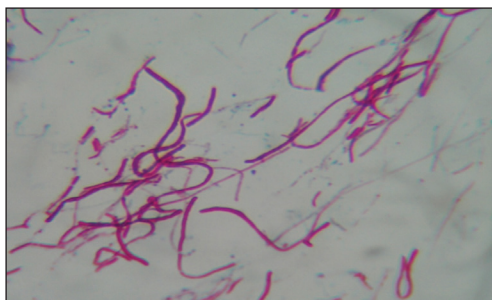


Рис. 124. Ниткоподібні мікобактерії культури № 18 ×1500

На м'ясо-пептонному агарі формували колонії тільки мікобактерії культури № 18. За мікроскопії мазків, приготовлених із колоній, які формувалися на простому середовищі, спостерігалися ниткоподібні мікобактерії довжиною до 40 мкм та товщиною 0,5–1,0 мкм (рис. 124).

Дослідженнями біохімічних властивостей мікобактерій культур № 17 та 18 встановлено високу каталазну активність,

здатність акумулювати залізо, позитивну реакцію гідролізу ТВІНу-80 та відсутність нітроредуктази.

Мікобактерії культури № 18, на відміну від № 17 та вихідної, були толерантними до 5%-вого хлористого натрію (табл. 46).

Мікобактерії культури, виділені від лабораторних тварин, викликали в морських свинок гіперчутливість сповільненого типу, яка виявлялася ППД-туберкуліном для ссавців.

Алергічні реакції у тварин протягом досліду носили як постійний характер, так і зникали на 60 добу. На розтині евтаназованих наприкінці досліду лабораторних тварин специфічних для туберкульозу змін не виявля-

46. Біохімічні властивості вихідних мікобактерій та виділених від морських свинок

Культура, №	Властивість						
	редукція нітратів	каталазна ¹	каталазна ²	пероксидазна	акумуляція заліза	реакція гідролізу ТВІН-80	толерантність до 5 % NaCl
“Ш10”	–	++	+	+	–	–	–
17	–	+++	+	–	+	+	–
18	–	+++	+	++	+	+	+

¹ За методом Г.Н. Перицина зі співавт. (1958).

² За методом Kubica Get al. (1960).

но, а лабораторними дослідженнями біоматеріалу одержаний негативний результат (табл. 47).

Інтактні тварини за час досліду не реагували на введений ППД-туберкулін для ссавців. За бактеріологічного дослідження з відібраних проб евтаназованих незаражених свинок одержаний негативний результат.

47. Вірулентність та сенсibiliзувальна здатність вихідних мікобактерій та виділених від морських свинок*

Культура, №	№ тварини	Алергічне дослідження, доба		Тривалість досліду, діб	Індекс ураження внутрішніх органів	Бактеріологічне дослідження
		30	60			
“Ш10” (вихідна)	41–43	+	+	90	0	–
17	48–49	+	–	90	0	–
18	50	+	+	90	0	–
	51	+	–	90	0	–
Інтактні тварини	54–55	–	–	90	0	–

* Результат: (+) – позитивний, (–) – негативний.

Із мікобактерій двох культур, виділених від морської свинки, на 15–20 добу культивування тільки одні утворювали мікроколонії у вигляді “кіс” (табл. 48).

48. Корд-фактор (“коси”, “джугути”) вихідних мікобактерій та виділених від морських свинок

Культура, №	Вірулентність мікобактерій ¹	Характеристика мікроколоній, доба					
		форма		максимальна ширина, мкм		Густина скупчення мікобактерій	
		15–20	35–40	15–20	35–40	15–20	35–40
“Ш10”	902	“коси”	“коси”	5	10	щільно, пухко	щільно, пухко
17	902	Скупчення 30–50 клітин	НД	–	НД	щільно	НД
18	902	“коси”	“коси”	5	10	пухко	пухко

¹ Період життя заражених морських свинок;

² без видимих патолого-анатомічних змін в органах морських свинок;

НД – не досліджувалися.

Мікроколонії культур № 18 та 15 були морфологічно подібні: формували мікроколонії у вигляді “кіс”, мали однакову ширину та пухке розміщення клітин (рис. 125).

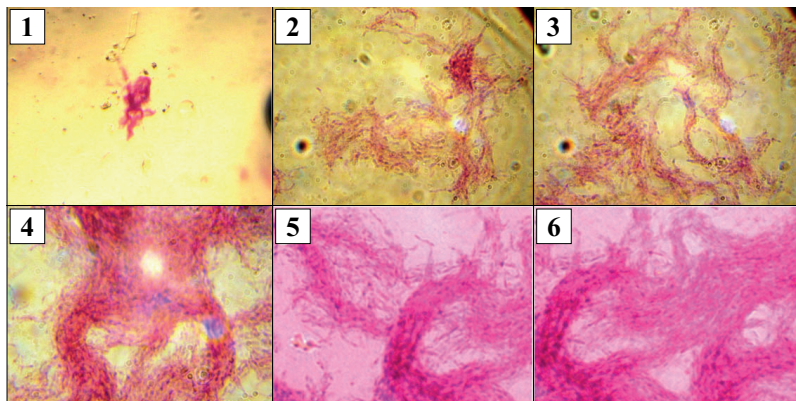


Рис. 125. Мікроколонії культури № 18 на 15–20 добу культивування:
1 – $\times 150$; 2, 3, 4, 5, 6 – $\times 1500$

Мікобактерії культури № 17 у мазках розміщувалися дифузно.

За порівняння біологічних властивостей мікобактерій культур № 17 та 18 було встановлено їх належність до одного виду атипичних мікобактерій. Серед видів атипичних мікобактерій, які класифікувалися Ю.Я. Кассичем й співавт. (1987), культура № 18 була подібна до *M. vaccae* на 100 % (табл. 49).

49. Ідентифікація мікобактерій, виділених від морських свинок (Sneath-метод)

Вид мікобактерій	Група за Раніоном	Кількість порівняних властивостей	Культура			
			№ 17		№ 18	
			кількість відмінностей	індекс подібності, %	кількість відмінностей	індекс подібності, %
1	2	3	4	5	6	7
<i>M. kansasii</i>	I	11	3	72,7	5	54,5
<i>M. marinum</i>	I	11	3	72,7	4	63,6
<i>M. scrofulaceum</i>	II	11	3	72,7	4	63,6
<i>M. gordone</i>	II	11	2	81,8	3	72,7
<i>M. avium-intracellulare complex</i>	III	11	4	63,6	5	54,5

1	2	3	4	5	6	7
<i>M. gastrii</i>	III	11	4	63,6	5	54,5
<i>M. nonchromogenicum</i>	III	11	3	72,7	4	63,6
<i>M. terrae</i>	III	11	3	72,7	4	63,6
<i>M. triviale</i>	III	11	4	63,6	3	72,7
<i>M. xenopi</i>	III	10	3	70,0	4	70,0
<i>M. ulcerans</i>	III	10	4	60,0	5	50,0
<i>M. smegmatis</i>	IV	11	3	72,7	2	81,8
<i>M. phlei</i>	IV	11	3	72,7	2	81,8
<i>M. fortuitum</i>	IV	11	2	81,8	1	90,9
<i>M. vaccae</i>	IV	11	1	90,9	0	100
<i>M. diernhoferi</i>	IV	11	1	90,9	2	81,8
<i>M. thamnopheos</i>	IV	11	1	90,9	2	81,8
<i>M. flavescens</i>	IV	11	3	72,7	2	81,8
<i>M. peregrinum</i>	IV	9	2	77,8	1	88,9
<i>M. chelonae complex</i>	IV	10	1	90,0	3	70,0

Культура № 17 мала найменшу кількість відмінностей з *M. vaccae*, *M. thamnopheos* та *M. diernhoferi* (індекс подібності 90,9 %). Відмінності полягали в толерантності до 5 % хлористого натрію (*M. vaccae*), реакції гідролізу ТВІН-80 (*M. diernhoferi*) та здатності рости при культивуванні за 37 °С (*M. thamnopheos*).

Отже, від морських свинок, заражених мікобактеріями бичачого виду, були виділені культури, відмінні за біологічною активністю від вихідної. Встановлено належність однієї виділеної культури до атипових мікобактерій.

На 15–20 добу культивування корд-фактор (“коси”, “джугути”) виявлено в одній культурі (*M. vaccae*). Це підтверджує відсутність зв’язку між патогенністю та корд-фактором (“косами”, “джугутами”) мікобактерій, виділених із біологічного матеріалу морської свинки, яка була заражена *M. bovis* швидко-рослого штаму 100 пасажу (рН середовища 7,0–7,2).

У цілому, по мірі відновлення вірулентності за пасажування через організм тварин, мікобактерії набували здатності в середовищі Школьникової утворювати мікроколонії, які морфологічно нагадували “коси” та “джугути”.

Спочатку спостерігалось дифузне та “косоподібне” розташування мікобактерій у препаратах з авірулентної та слабковірулентної культур “ДЗ”, а пізніше і “косички” з культури “ВЗ” (рис. 126).

Водночас мікобактерії бичачого виду з відновленням вірулентності, зокрема в організмі морських свинок, за винятком однієї культури, формували більш виражені “коси” та “джугути”, що підтверджує зв’язок між вірулентністю та корд-фактором (“косоутворенням”) *M. bovis* швидко-рослого штаму.

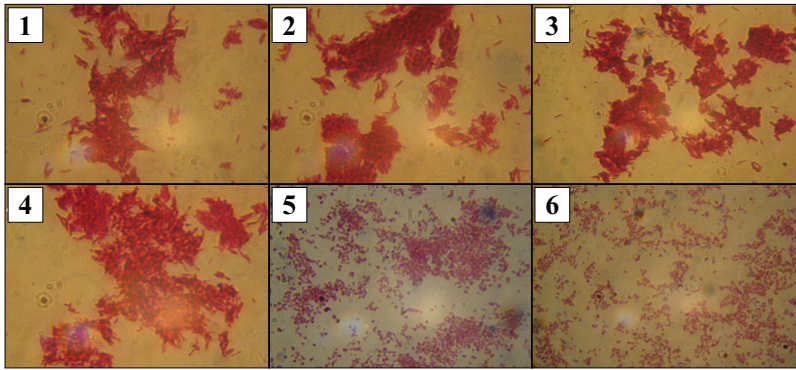


Рис. 126. Мікроколонії культури “В3” та “Д3” на 15–20 добу культивування: 1, 2, 3, 4 – культури “В3”; 5, 6 – культури “Д3” ×1500

Отже, проведені дослідження засвідчили відсутність чіткої залежності між аналізованими явищами; тобто вірулентністю і здатністю мікробактерій утворювати корд-фактор.

5.2.7. Некислотостійкі мікобактерії та корд-фактор

Необхідно зазначити, що поряд із традиційними (кислотостійкими) формами мікобактерій у мазках з деяких культур спостерігали й некислотостійкі мікроорганізми. Некислотостійкі бактерії мали різну форму: коко-, паличко- та ниткоподібну без / або з вираженою грануляцією.

Культури “В3” та № 5 з Пф (пєфлєксацин) формували мікроколонії у вигляді “кіс” та “джгутів” на 15–20 добу культивування, в яких розташувалися мікобактерії червоного та синього кольорів (рис. 127 та 128).

Співвідношення кількості кислото- і некислотостійких мікобактерій було приблизно однаковим, а інколи й переважали кислотостійкі.

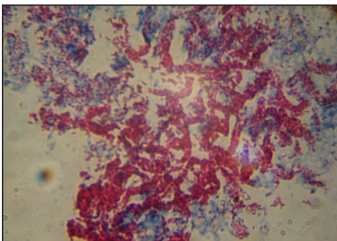


Рис. 127. Мікроколонії *M. bovis* культури № 5, які отримані на середовищі з Пф ×1500

Різні тинкторіальні властивості мікобактерій у сформованих мікроколоніях спостерігалися й у культур № 3, 4 на 15–20 добу культивування, а штаму *BCG* – на 35–40 добу.

M. bovis культур № 4 на 35–40 добу (рис. 129) та № 4 з Ет, “В3”, “Ш9” (100 пасаж через середовище з рН 7,0–7,2), “Ш11” (164 пасаж через середовище з рН 6,5) на 15–20 добу культивування формували мікроколонії синього кольору “косоподібної” та “джгутоподібної” форм, у яких розміщувалися некислотостійкі палички та коки. Окремі з них морфологічно нагадували капсули.

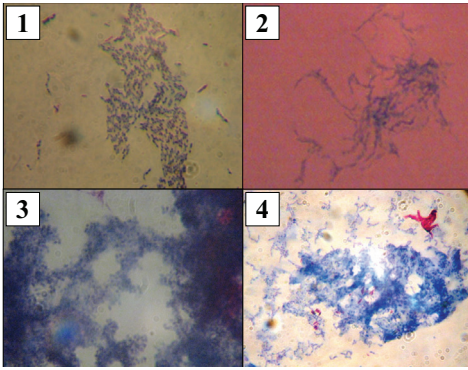


Рис. 128. Мікроколонії некислотостійких мікобактерій:

- 1 – “В3” на 15–20 добу культивування;
 2 – “Ш9” на 15–20 добу культивування;
 3 – “Ш11” на 15–20 добу культивування;
 4 – № 4 на 35–40 добу культивування
 ×1500

ючи форму невеликих ланцюжків. Дуже рідко всередині ниткоподібних форм знаходилися кислотостійкі тільця. Значно частіше в мазках були виявлені сині паличкоподібні форми бактерій.

Таким чином, некислотостійкі мікобактерії досить часто виявляються у мазках, приготовлених з культур рідкого напівсинтетичного середовища Школьникової, що вказує на необхідність подальшого деталального вивчення їх біологічних властивостей.

Отже, підсумовуючи результати цих досліджень, можна узагальнити: після 15–20-добового культивування у середовищі Школьникової виявлено

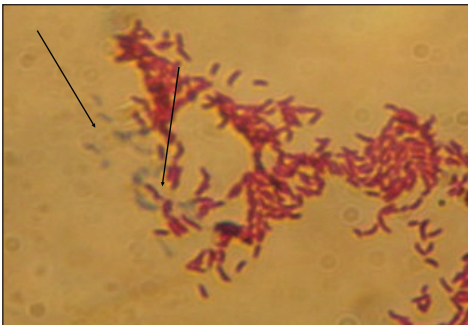


Рис. 129. Мікроколонії культури № 4, які отримані на середовищі з Ам, на 35–40 добу культивування ×1500

Некислотостійкі форми збудника туберкульозу були виявлені в мазках, які зроблені під час культивування мікобактерій в середовищі Школьникової, що отримані на живильному середовищі з протитуберкульозними препаратами: зокрема, № 4 з Ам (амікацин), № 1 з Ет (етіонамід) та Пф (пєфлєксацин), № 7 з Ка (канаміцин) та Пф (пєфлєксацин).

Після культивування культури № 4 з Ам у напівсинтетичному середовищі були виявлені некислотостійкі ниткоподібні форми мікобактерій з тільцями (рис. 130). При цьому некислотостійкі тільця знаходилися як усередині ниткоподібних форм, так і вільно, маючи

форму невеликих ланцюжків. Дуже рідко всередині ниткоподібних форм знаходилися кислотостійкі тільця. Значно частіше в мазках були виявлені сині паличкоподібні форми бактерій. Таким чином, некислотостійкі мікобактерії досить часто виявляються у мазках, приготовлених з культур рідкого напівсинтетичного середовища Школьникової, що вказує на необхідність подальшого деталального вивчення їх біологічних властивостей. Отже, підсумовуючи результати цих досліджень, можна узагальнити: після 15–20-добового культивування у середовищі Школьникової виявлено “коси” та “джугти” мікобактерій видів *M. bovis* (13 із 17 культур), *M. phlei* (одна із двох культур), *M. vacca* (дві із двох культур), *M. xenopi* (одна культура) та неідентифікована (одна із двох культур), що свідчить про відсутність зв’язку між корд-фактором та патогенністю мікобактерій.

Подовження терміну культивування (до 35–40 діб) супроводжується додатковим виявленням корд-фактору (“кіс” та “джугтів”) у *M. bovis* та атипових мікобактерій.

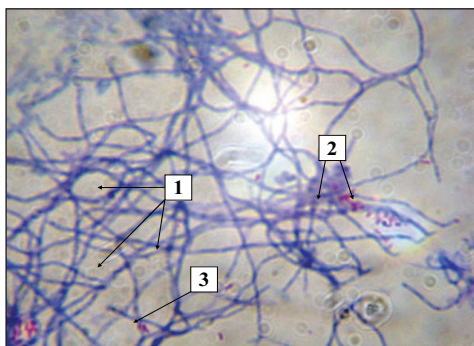


Рис. 130. Мікроколонії *M. bovis* культури № 4, які отримані на середовищі з Ам, на 15–20 добу культивування:

1 – некислотостійкі тільця, які розташовані всередині ниткоподібних клітин;
2 – перетворення частини некислотостійкої форми в кислотостійку ×1500
 джується втрапою патогенності.

Аналізуючи та узагальнюючи одержаний експериментальний матеріал, відзначимо, що потенційна здатність *M. bovis* швидкорослого штаму втрачати (за багаторазового пасажування через живильне середовище) та поновлювати (за пасажу через морських свинків) корд-фактор вказує на його зв'язок із вірулентністю, а подовження терміну культивування до 35–40 діб супроводжується додатковим виявленням корд-фактору (“кіс” та “джгутів”) у *M. bovis* та атипових мікобактерій.

Вочевидь некислотостійкі мікобактерії бичачого виду самостійно або разом із кислотостійкими здатні утворювати мікроколонії.

Патогенні мікобактерії за культивування на середовищі з протитуберкульозними препаратами (канаміцин, амікацин, етіонамід, пefлоксацин) зберігають здатність утворювати мікроколонії у вигляді “кіс” та “джгутів” (корд-фактор).

Таким чином, наявність або відсутність косоутворення у того чи іншого виду мікобактерій не може свідчити про патогенність або апатогенність досліджуваних мікобактерій.

Того ж часу зазначимо, що на біологічну активність (у тому числі й на інтенсивність утворення корд-фактору) мікобактерій, можливо, суттєво впливає вміст ліпідів у клітинній стінці збудника туберкульозу.

У цьому зв'язку необхідно було б дослідити, в різних варіантах, вплив умов культивування мікобактерій на вміст ліпідів у клітинній стінці, як патогенних, так і апатогенних збудників туберкульозу (включаючи й атипових), та встановити вміст вільних жирних кислот, фосфоліпідів залежно від патогенності.

Потенційна здатність *M. bovis* швидкорослого штаму втрачати (за багаторазового пасажування через живильне середовище) та поновлювати (за пасажу через морських свинків) корд-фактор вказує на його зв'язок з вірулентністю.

Некислотостійкі форми мікобактерій бичачого виду самостійно або разом із кислотостійкими здатні формувати мікроколонії (“коси” та “джути”).

Останнє свідчить про те, що корд-фактор мікобактерій самостійно не визначає біологічну активність, бо, екстрагування його з мікробної клітини, як наголошують літературні дані, не супрово-

ЛІПІДИ МІКОБАКТЕРІЙ

Ліпіди, як і біохімічний склад видів мікобактерій, широко вивчаються дослідниками з використанням різноманітних методів методологічних підходів. Вважається, що саме ліпіди визначають стійкість мікобактерій до факторів довкілля, тривалість виживання на об'єктах та в продуктах й сировині тваринного походження. Допускається, що по даних умісту ліпідів, їх фракцій, у тому числі вільних жирних кислот, можна ідентифікувати види мікобактерій та покращити на підставі цього ефективність діагностики туберкульозу тварин і людини. Найбільш поширеним методом дослідження ліпідів є хроматографічний.

6.1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Оболонка мікобактерій забезпечує стабільність розмірів та форми мікобактерій, їх механічний та осмотичний захист, а також бере участь в регуляції важливих метаболічних процесів (Махбанов А.А. та Кушнарєв В.М., 1972; Кац Л.Н. й співавт., 1972; Barksodale та Kim K.S., 1977; Ерохин В.В., 1982; Степанюк В.В. й співавт., 1983; Гизатулина Н.М., 1996).

У світі прокариотів мікобактерії займають особливе місце щодо складності організації їхньої оболонки, в якій важливу роль відіграють ліпіди, які надзвичайно різноманітні і складні. Загальний вміст ліпідів у клітинах мікобактерій становить 10–60 %, – повідомляє М.Н. Бехтерева й співавт. (1971), у той час як у клітинах інших прокариотів не переважає 5 %, на думку С.Р. Ractz (1978).

Високу стійкість мікобактерій до несприятливих умов зовнішнього середовища Т.В. Коронелли (1984) пов'язує з високим вмістом у мікобактеріях загальних ліпідів.

Ліпіди мікобактерій поділяють на вільні та міцно зв'язані з мікробною клітиною. Останні обумовлюють кислотостійкість мікобактерій. Видалення їх з клітини примушує мікобактерії втрачати здатність викликати гіперчутливість сповільненого типу в тварин. Вільні ліпіди становлять 25–30 % клітинної стінки повільнорослих мікобактерій, зв'язані ліпіди – 26–30 %. На цьому наголошують Н.С. Гельман й співавт. (1972).

Як стверджує ряд учених (Коронелли Т.В., 1968; Залашко М.В., 1971; Верецагин А.Г., 1972; Демиховский Е.Н., 1974; Кейтс М., 1975; Ленинджер А., 1976; Линчук Л.М. та Лизовская А.Л., 1977; Смирнов В.В. й співавт., 1978; Бурлакова Е.Б., 1980; Грачёва М.М. й співавт., 1980; Кулаев Н.С. та Неслянова М.А., 1980; Антонов В.Ф., 1982; Васюренко З.П. й співавт., 1992), ліпіди виконують багато важливих біологічних функцій. Як основна частина поверхневих клітинних структур, вони, перш за все, беруть участь у здійс-

ненні зв'язку мікроорганізму із зовнішнім середовищем та в кардинальних процесах метаболізму – синтезі білків і нуклеїнових кислот, мембранних макромолекул різних класів ліпідів, пептидогліканів, тейхоевих кислот, ліпополісахаридів; у поділі клітин, транспортуванні електронів, окисному фосфорилуванні, регуляції активності ферментів і проникності оболонки для різних речовин. Ліпіди та полісахариди мікобактерій володіють максимальною активністю в усіх імунологічних реакціях, – повідомляють М. В. Goren (1970); Е. Ridi та співавт. (1975).

Згідно з даними Т.В. Коронелли (1984), мікобактеріальні ліпіди являють інтерес і з точки зору їх використання в таксономії для диференціації мікобактерій від споріднених організмів. Особливо гостро питання постає відносно сапрофітних мікобактерій. Щоб розділити їх, використовують хемотаксономічні ознаки, найважливішою з яких є будова ліпідів.

М.М. Грачева зі співавт. (1980), Г.С. Калачева (1986), А.М. Кузин (1946) вважають, що функціональна роль бактеріальних ліпідів визначається їхньою локалізацією в зовнішніх шарах клітини, специфікою структури і швидкістю зміни їхнього складу під час пристосування клітини до змін умов зовнішнього середовища.

Ліпіди належать до великої групи біокомпонентів клітини мікобактерій. Клітинна стінка мікобактерій являє собою міцну багат шарову ліпофільну структуру. Вона визначає характерні фізіологічні властивості мікобактерій: стійкість до кислот та лугів, здатність переживати у вегетативному стані довгі періоди голоду та висушування, здатність до пасивного поглинання гідрофобного субстрату, здатність до подолання імунологічної реактивності організму. Специфічна будова та властивості мікобактерій забезпечують тривалу життєздатність в різноманітних несприятливих умовах (Коронелли Т.В., 1968; Авербах М.М., 1976).

Як повідомляють Т.В. Коронелли (1968), М.В. Залешко (1971), Р. Стейниер й співавт. (1979), наразі відсутня єдина класифікація ліпідів мікроорганізмів. Д.Ж. Старз (1987) їх поділяє на прості та складні. Але в кожного дослідника своя точка зору на класифікацію ліпідів.

В останні роки за допомогою таких методів дослідження, як тонкошарова і газорідинна хроматографія, мас-спектрометрія, ядерний магнітний резонанс з'явилося багато інформації про склад і будову мікобактеріальних ліпідів.

У клітинах мікобактерій більша частина ліпідів представлена *полярними ліпідами*, серед яких превалюють фосфоліпіди, що й стверджує Т.В. Вейсфелер (1984).

Молекули полярних ліпідів – це збалансовані частини полярних гідрофільних компонентів (фосфатів, цукрів, амідів) і гідрофобних аліфатичних ланцюгів, а двоєка (амфіфільна) природа забезпечує тонку взаємодію їх з різними сполуками, – сповіщають Л.М. Пинчук та А.Л. Лазовская (1989).

Фосфоліпіди є похідними фосфатидної кислоти, в молекулі якої одна гідроксильна група гліцерилу, етерифікована залишком фосфорної кислоти, а дві інші гідроксильні групи – залишками жирних кислот ($C_{16}-C_{26}$), які фор-

мують неполярну частину молекули фосфоліпиду. Крім фосфатидної кислоти, у мікобактерій виявлені інші групи фосфоліпідів: фосфатидил-етаноламіни (кефаліни), фосфатидиламінокислоти, фосфатидилацилгліцероли, дифосфатидилацилгліцероли (кардіоліпіни), фосфатидилінозити, фосфатидилінозитманозиди, які утворюються під час з'єднання з фосфатною групою відповідних радикалів. У цьому переконують Л.М. Пинчук та А.Л. Лазовская (1989).

За даними Н.С. Гельмана зі співавт. (1972), у мікобактерій та корінебактерій домінуючим фосфоліпідом є глікозилфосфатидилінозит. Але в деяких мікобактерій до 50 % фосфоліпідів становить дифосфатидил-ацилгліцерол, 10 % – фосфатидилетаноламін і 40 % – фосфатидилінозитманозид.

Т.В. Коронелли (1984), Р.А. Нурадинов зі співавт. (2001) фосфатидилінозит вважають попередником у біосинтезі фосфатидилінозитманозидів. Останні є головними компонентами клітинних стінок і регулюють їх біологічні властивості. Тому клітинні стінки стабільні за різних температур і мають повільний обмін, особливо в молодих клітинах, що й наголошують Э. Роуз (1971); М. Goodfellow та D.F. Minnikin (1977).

Згідно з даними Б.Н. Бондаренка (1973), Е.Р. Рубан (1977), Т.В. Коронелли (1984), фосфоліпіди характеризуються високою швидкістю синтезу, як надзвичайно лабільні, можуть взаємозамінюватися при синтезі і є пусковою точкою в розвитку патологічних процесів у макроорганізмі та за дії шкідливих факторів навколишнього середовища. Їх вміст і склад доводять L.F. Zamoga, A. Vojalil, Е.Р. Рубан (1977), може змінюватися залежно від віку культури і умов культивування, що функції фосфоліпідів у мікробній клітині далеко ще не з'ясовані.

Водночас повідомлено, що конверсія мікобактерій в овоїдні форми відбувається в середовищі з кислим рН (табл. 50).

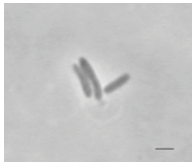
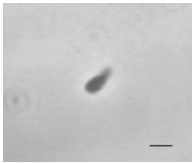
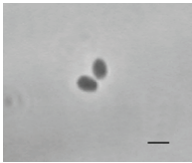
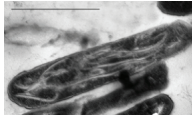
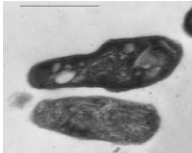
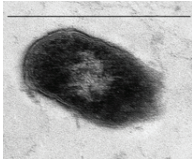
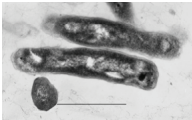
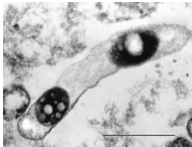
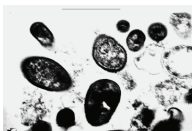
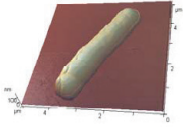
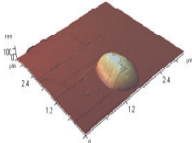
Атипові мікобактерії, зокрема III групи за класифікацією Раніона, є поліморфними: часто спостерігаються кокоподібні палички і, навпаки, *M. xenopi* – довгі палички з тенденцією філаментациї. *M. avium* мають вигляд довгих тонких прямих, інколи злегка зігнутих, зернистих паличок.

Отже, фосфоліпіди відіграють важливу роль в житті клітини, бо є основними компонентами цитоплазматичної мембрани, беруть участь в утворенні клітинної стінки, в різних механізмах транспорту речовин, відіграють захисну роль, регулюють ензиматичні реакції і метаболічні процеси.

До складу клітинних стінок мікобактерій входять *нейтральні ліпіди*, до яких відносять вуглеводи, гліцероли, воски, кетони, нафтохінони (менахінони), стерини, каротиноїди.

Як стверджує Е.М. Губарев (1961), вуглеводи та стерини присутні в клітинах мікобактерій, як і в інших мікроорганізмах, у невеликих кількостях, але при роботі з неполярними ліпідами є небезпека внесення вуглеводів та стеринів ззовні – із деяких розчинників, вакуумних змазок, живильних середовищ та ін. Роль вуглеводів і стеринів у клітині остаточно невідома, хоча Б.Д. Івасик зі співавт. (2001) повідомляють, що стерини виконують захисну функцію в умовах дії зовнішніх несприятливих факторів.

50. Мікроскопія клітин мікобактерій. Культур, вирощені на середовищі Сотона зі стартовим значенням рН 6,0, за Ю.К. Кудикиною (2011 р.)

Мікроскопія	Вегетативні клітини	Перехідні форми клітин	Контрастні овоїдні клітини
Фазовоконтрастна мікроскопія Довжина масштабної мітки 2 мкм <i>M. smegmatis</i>			
Електронна мікроскопія тонких зрізів <i>M. smegmatis</i> <i>M. tuberculosis</i> Довжина масштабної мітки 2 мкм			
			
Атомносилова мікроскопія клітин <i>M. smegmatis</i>			

Гліцероли, залежно від кількості складноєфірних груп, можуть бути моно-, ді- та триацилгліцерами, наголошують М.М. Грачёва й співавтори (1980).

Моно- і діацилгліцероли, які були виділені з клітин *M. tuberculosis*, мали вміст фтієнових, мікоцерозинових та міколових кислот, повідомляють Л.М. Пінчук та А.Л. Лазовская (1989).

Триацилгліцероли – найбільша фракція нейтральних ліпідів мікобактерій. Це – ефіри гліцеролу і жирних кислот, які етерифікують всі три його гідроксильні групи. Вони вміщують тверді насичені жирні кислоти (пальмітинову, стеаринову, гексакозанову), рідкі ненасичені жирні кислоти (олеїнову, лінолеву, ліноленову, кротонову, ізокротонову) і розгалужені жирні кислоти

– туберкулостеаринову і фтіонову (Ленинджер А., 1976; Коронелли Т.В. та Фадеева Р.И., 1986; Пинчук Л.М. та Лазовская А.Л., 1989).

У бактерій відсутня здатність до підвищеного накопичення запасних ліпідів. Тому бактеріальна клітина використовує триацилгліцероли як проміжні метаболіти із широким спектром біологічних властивостей, повідомляють В. О'Лири (1977); Е.Р. Рубан (1977); М.М. Грачёва (1980); И.Л. Дикий й співавт. (2004). За даними Н. et al. Nakagawa (1976), у клітинах *M. smegmatis* триацилгліцероли накопичуються в пізні стадії росту і споживаються в разі вичерпання поживних ресурсів у середовищі.

И.Л. Диким й співавт. (2004) доведено, що триацилгліцероли здатні спричиняти на шкірі здорових тварин утворення специфічних гранулом, які складаються з моноцитів та епітеліоїдних клітин, за повторного введення – появу туберкул. Триацилгліцероли послаблюють резистентність організму щодо туберкульозу, при цьому фтіонова кислота активно гальмує міграцію лейкоцитів.

Воски – це складні ефіри вищих спиртів і жирних кислот. У їх складі виявляють гексадеканол, довголанцюгові двоатомні спирти, які мають в ланцюзі метильні та метоксильні групи – фтіоцерол і фенолфтіоцерол, пальмітинову і стеаринову кислоти, а також мікоцерозинову кислоту, яка вміщає 3 або 4 метильні групи (Noll H., 1957; Koul A.K., 1977).

Відповідно до даних Т.В. Коронелли (1984), істинні воски патогенних мікобактерій вміщуються в клітинній стінці, взаємодіючи з пептидоліпідами і міколовими кислотами, створюють бішарову оболонку, яка підвищує стабільність та гідрофобність клітин. Крім того, воски, як і гліцероли, виконують роль запасних речовин і використовуються клітинами за відсутності екзогенних джерел живлення.

Із *M. kansasii*, *M. bovis* та *M. marinum* виділені відповідно мікозид А, мікозид В та мікозид G, які є гліколіпідами глікозинової природи. Мікозиди А, В, G є видоспецифічними гліколіпідами, молекули яких складаються з довголанцюгового спирту фенолфтіоцеролу, до аліфатичної частини якого приєднані вищі жирні кислоти або мікоцерозинова кислота, а до фенольної частини – метильовані сахариди або олігосахариди (Пинчук Л.М. та Лазовская А.Л., 1989).

З аналізу літератури відомо (Goodfellow M. та Minnikin D.E., 1977), що мікозиди знаходяться в поверхневих шарах клітинних стінок мікобактерій в асоціації з міколіл-арабіногалактановим комплексом, захищають клітини патогенних мікробів від перетравлювання ензимами організму господаря, а також відіграють роль в біосинтезі полісахаридів і в їх транспортуванні. Транспортна функція гліколіпідів залежить від особливостей будови їх молекул, а завдяки специфічній будові мікозидів створюється бішарова мембрана, яка різко підвищує стабільність клітинних оболонок мікобактерій.

Bloch (1950) виділив із вірулентних штамів *M. tuberculosis* токсичний гліколіпід, так званий корд-фактор. Він являє собою 6,6-диміколат трегалози. Мікобактерії, що вміщують цю речовину, утворюють на щільному середови-

щі джгутоподібні колонії. Корд-фактор, за даними деяких авторів (Батраков С.Г., 1978,1985; Minnikin D.E., 1980), виділено із клітин *M. bovis*, *M. avium*, *M. smegmatis*, *M. phlei* та *M. lepraemurium*.

У свою чергу, Т.В. Коронелли (1987), М. Kato (1974) стверджують, що корд-фактор утворюється клітинами мікобактерій не тільки за їхнього культивуванні на експериментальних середовищах, але і в тканинах макроорганізму.

За даними Г.И. Тарасовой (1967), відомо, що зразки корд-фактору, виділені з різних видів бактерій, відрізняються будовою міколових кислот. Корд-фактор і його аналоги локалізовані в зовнішніх шарах клітинної стінки, а механізм дії корд-фактору на перебіг туберкульозної інфекції полягає, можливо, в охороні мікобактерій від руйнування фагоцитами господаря через пригнічення міграції лейкоцитів. При його введенні в тканинах ссавців знижується активність дегідрогеназ і з'являються дефекти в окисних процесах обміну, що пов'язано, ймовірно, з порушеннями синтезу активатора дегідрогеназ – дезамінокоензиму А.

Різновидністю гліколіпідів є сульфоліпіди, в яких трегалоза з'єднана зі залишком сірчаної кислоти.

Сульфоліпіди розташовані в зовнішньому прошарку клітинної оболонки і в комбінації з фтіоцеролдимікоцерозатом розглядаються як фактор вірулентності мікобактерій. Л.М. Пинчук і А.Л. Лазовская (1989) припускають, що сульфоліпіди відіграють важливу роль у виживанні мікобактерій всередині макрофагів господаря і у їх захисті від дії лізосомальних ферментів.

У мікобактерій виявлено ряд жирних кислот, які є набагато складнішими, ніж в інших бактерій. Жирним кислотам мікобактерій відводяться самостійні функції, бо їхня складна структура обумовлює і специфічні властивості цих мікроорганізмів.

Як повідомляє Н.Е. Кучеренко зі співавт. (1985), склад жирних кислот ліпідів має значення для поняття особливостей участі ліпідів у функціонуванні ліпідбілкових комплексів, у специфічній активації ряду ліпідзалежних ферментів.

Н.М. Гизатулина (1996), Н.І. О'Neill та L.L. Gershbein (1976) вважають, що у мікобактерій жирні кислоти представлені вищими карбоновими кислотами, які в основному зустрічаються в етерифікованій формі як складові частини восків, фосфатидів, гліцеролів, і незначна частина їх знаходиться у вільному стані. На думку авторів, підвищена кількість ненасичених кислот у фосфоліпідах мікобактерій пов'язана з їхньою вірулентністю.

У складі жирних кислот мікобактерій виділяють кислоти з числом атомів вуглецю від 8 до 26 (переважно 15–19). Крім того, їх спектр складають кислоти насичені та ненасичені, з парною та непарною кількістю атомів вуглецю, кислоти з нормальним та розгалуженим ланцюгом: монорозгалуджені насичені (туберкулостеаринова, тетракозанова), полірозгалуджені – фтіонові, що мають 12 гомологічних кислот, 2 з яких фтієнові, мікоцерозинова (Зеленський Н.Д. та Бондарь Л.С., 1951; Hunq J.G. та Walker R.W., 1970; Лебеде-

ва Ж.Д. й співавт, 1976; Larsson L. та Mardh P.A., 1976; Рубан Е.Р., 1977). Циклопропанові кислоти жирного ряду в більшості видів не відмічаються, крім *M. tuberculosis*, де виявлено декілька гомологічних серій довголанцюгових кислот (C_{34} – C_{56}), які вміщують 1–2 циклопропанових кільця (Пинчук Л.М. та Лазовская А.Л., 1978).

У мікобактерій основним компонентом суміші жирних кислот, певно, є пальмітинова кислота. Існують дані, що вона переважає у *M. phlei*, у *M. avium*, *M. tuberculosis*, *Mycobacterium sp.* 607 у всі періоди росту, у *M. smegmatis* – на початку росту. Але у *M. album* вона присутня в невеликій кількості, а переважають ейкозанова ($C_{14:2}$) і декозанова ($C_{16:2}$) кислоти, як повідомляє Е.Р. Рубан (1977).

Т.П. Ефимова зі співавт. (1977) стверджують, що у мікобактерій в спектрі жирних кислот переважають пальмітинова, пальмітолеїнова, стеаринова, олеїнова та туберкулостеаринова. У сумі вони складають 70–90 % від загальної кількості жирних кислот.

В.О'Лири (1977) повідомляє, що ненасичені жирні кислоти і такі з розгалудженими ланцюгами мають більш низьку температуру плавлення, ніж насичені, тому вони необхідні для збереження плинності ліпідів мембран у різних умовах росту бактерій.

За даними Л.М. Моделя (1952), ненасичені жирні кислоти, які входять до складу ліпідів мікобактерій, гальмують дію лейкопротеаз. Ця їхня властивість допомагає зрозуміти хімізм казеозу при туберкульозі. У казеозному матеріалі ненасичені жирні кислоти паралізують дію тканинних протеаз і відповідно гальмують аутоліз казеозних мас. Розгалуджені жирні кислоти, які входять до складу ліпідних фракцій туберкульозних мікобактерій, беруть участь у гістогенезі специфічних туберкульозних уражень.

Мікобактерії, коринебактерії та нокардії поряд зі звичайними жирними кислотами містять також характерні тільки для цих родів міколові кислоти, які є високомолекулярними β -оксикислотами з довгим аліфатичним ланцюгом в α -положенні.

Э. Ледерер (1971), характерними для мікобактерій вважає міколові кислоти, які варіюють від C_{60} до C_{80} , бічні радикали їх мають 20, 22, 24 атоми вуглецю, а головні ланцюги є складними, надзвичайно варіабельними структурами, нормальними або метилрозгалудженими, з різними функціональними групами ($-\text{OH}$, $=\text{O}$, $-\text{CH}_3$, $-\text{COOH}$), ненасиченими зв'язками (0–2) і циклопропановими кільцями в цис- і трансформі. У молекулах міколових кислот спостерігаються всі форми ізомерії: ізомерія ланцюга, ізомерія положення, а також, можливо, оптична ізомерія.

Міколові кислоти утворюють у клітинних стінках мікобактерій і нокардій арабіногалактан-мукопептидний комплекс і визначають їхню кислотостійкість. Тому порушення синтезу міколових кислот призводить до змін в оболонці мікобактерій туберкульозу та втрати нею кислотостійкості, наголошує G.M. Pearson (1963). Вони знаходяться в стінках у вільному стані, в складі воску D і корд-фактору (Ледерер Э., 1971).

Ж. Яано (1988) встановлено, що міколові кислоти з вуглецевим ланцюгом більше C40 беруть участь у формуванні гранульом.

Склад жирних кислот мікобактерій може слугувати диференціальною ознакою роду *Mycobacterium*, хоча на нього в значній мірі можуть впливати зовнішні фактори.

Склад середовища, його рН, аерація, температура культивування, вік культури суттєво впливають на утворення ліпідів мікобактеріями (Драбкина Р.О., 1963; Милько Е.С. та співавт., 1974; 1977; Имшеницкая А.Л. й співавт., 1976; Рубан Е.Р., 1977; Грачёва М.М. й співавт., 1980; Пинчук Л.М. та Ворона Е.А., 1982; Васюренко З.П. й співавт., 1992; Гизатулина Н.М., 1996; Нуратинов Р.А. й співавт., 2001; Пикас О.Б., 2002). Заслужують на увагу й дані щодо дії цих факторів на спектри жирних кислот, які входять до складу ліпідів (О'лири В., 1977; Стейниер й співавт., 1979).

Г.К. Khuller й співавт. (1982) довели, що зниження температури культивування від 37 до 30 °С спричиняє підвищення вмісту загальних ліпідів і зниження концентрації фосфоліпідів у *M. tuberculosis* H37Rv.

Т. В. Коронелли 1984 року повідомив, що в разі додавання до середовища етанолу, а також зниження температури культивування від 37 до 27° С спостерігається зниження вмісту загальних ліпідів у клітинах *M. smegmatis*.

М. Kates у 1964 році виявив, що зниження температури призводить до збільшення кількості ненасичених кислот і кислот з більш коротким вуглецевим ланцюгом, з підвищенням же температури їх кількість зменшується. Автор пов'язує це явище з адаптацією мікроорганізмів і здатністю мікробних клітин змінювати склад мембранних ліпідів у відповідь на змінення температури культивування.

В. О'Лири (1977), Р. Стейниер й співавт. (1979), Т.В. Коронелли (1984) поділяють думку попереднього автора, що біосинтез ненасичених кислот за більш низьких температур сприяє збереженню проникності і плинності мембран в широкому діапазоні росту.

Відомо також, що зниження температури культивування з 37 до 20° С приводить до різкого зменшення біосинтезу міколових кислот, втрати кислотостійкості і життєздатності *M. tuberculosis* H37Ra. Але з підвищенням її з 20 до 50° С у *M. phlei* відбувається швидке збільшення частки кислот з більшою довжиною ланцюга. Т.В. Коронелли й співавт. (1977) повідомляють і про те, що високий вміст ненасичених міколових кислот у клітинних стінках *M. micosum* AP-25 можна розглядати як здатність їх пристосовуватися до засвоєння вуглеводів в умовах холодного клімату Арктики.

С.О. Thoen й співавт. (1972) звертають увагу на те, що варіювання температури в невеликих межах не викликає помітних змін. Так, кількість жирних кислот трьох штамів *M. kansasii*, що зазвичай ростуть за температури 30° С, не відрізнялася від таких у 35 штамів цього ж виду, які ростуть за 37° С.

Як стверджує L.D. Vaczi (1984), важливу роль у регуляції процесу ліпогенезу мікрорганізмів відіграє аерація, яка особливо впливає на синтез жирних

кислот. Учений відмічає, що з підвищенням ступеня аерації підвищується вміст ненасичених жирних кислот.

И.М. Грачева й співавт. (1980) повідомляють, що, за незначного доступу кисню ліпіди мікроорганізмів уміщують майже вдвічі більше фосфоацилгліцеролів, у вісім разів більше вільних жирних кислот та в чотири рази менше триацилгліцеролів, ніж ліпіди мікроорганізмів, культивованих в умовах оптимального забезпечення їх киснем. Автори пояснюють ці зміни тим, що саме нестача кисню призводить до різкого зниження процесу синтезу триацилгліцеролів, а високий вміст фосфоацилгліцеролів при цьому пов'язаний з функціональними властивостями тих компонентів, які відповідають за дихання.

Значення рН середовища, яке найбільш сприятливе для росту більшості бактерій, коливається в дуже вузьких межах і з підвищенням чи зниженням його відбуваються зміни жирнокислотного складу мікробних клітин.

За даними Б.Д. Івасика й співавт., які вони повідомили у 2001 році, культури *M. phlei*, *M. kansasii*, *M. fortuitum* та *M. smegmatis*, які культивувалися на середовищі Сотона з рН 7,0–7,2, відрізнялися інтенсивністю росту, кількістю загальних ліпідів (від 14,6 до 27,4 % відповідно) та їхніх фракцій, а також умістом жирних кислот. Загальна сума ненасичених жирних кислот була найвищою у *M. phlei* (38,23 %).

Л.М. Пинчук й співавт. (1980; 1982) зафіксували, що свіжовиділені штами *M. tuberculosis* та *M. bovis* мають подібні профілі вищих жирних кислот і практично не відрізняються між собою за вмістом основних компонентів, музейні культури цих видів достовірно відмінні за вмістом довголанцюгових насичених жирних кислот з непарною кількістю атомів вуглецю.

А.А. Воробьев й співавт. (1990) стверджують, що мікобактерії клінічних та лабораторних штамів, культивовані на середовищі Фінн-П (рН 6,3–6,5), мають однаковий набір насичених та ненасичених кислот. Деякі відмінності їхньої кількості спостерігалися за вмісту пальмітолеїнової кислоти (C_{16:1}).

На синтез ліпідного комплексу мікобактерій впливає склад живильного середовища.

За даними Т.В. Коронелли (1968), гексадекан та глюкоза впливають на біосинтез ліпідів та їхніх складових у парафінокисних мікобактерій. Штами мікобактерій на середовищі з Н-гексадеканом утворювали до 25,5 % ліпідів, а при використанні глюкози – 13–14 %.

А.Т. Донець й співавт. у своїй роботі (1970) повідомляють, що в сапрофітних мікобактерій спостерігався найменший вихід біомаси на середовищі з амонієм азотнокислим, при цьому відмічався максимальний вихід ліпідів.

К.Р. Dhariwal й співавт. (1976) вказують на те, що збільшення рівня аспарагіну в живильному середовищі призводить до зменшення кількості ліпідів у *M. phlei* ATCC 354, а збільшення концентрації вуглеводів у вигляді гліцеролу або глюкози збільшує вміст ліпідів. За обмеженого вмісту вуглеводів клітини мікобактерій синтезують більше ненасичених жирних кислот, а за обмеженого рівня азоту – більше насичених.

Л.М. Пинчук й співавт. (1977) вважають, що у *M. tuberculosis* та *M. bovis* на картопляно-гліцериновому середовищі кількість гексакозанової кислоти становила близько 20 % від загальної кількості, а у *M. avium* – 3–5 %, у *M. tuberculosis* кількість олеїнової кислоти дорівнювала 10–15 %. На ячменному середовищі Левенштейна-Йенсена у *M. tuberculosis* було виявлено 5–10 % гексакозанової кислоти, при цьому кількість олеїнової кислоти становила 35–40 %. О.А. Нестеренко зі співавт. (1980), підтверджуючи дані попередніх авторів, також стверджують, що використання картопляно-гліцеринового середовища робить склад жирних кислот мікобактерій більш стабільним.

Як повідомляють Б.Д. Івасик й співавт. (2011), *M. fortuitum* при культивуванні на середовищі Сотона за кількістю жирних кислот були найбільш обмеженими. Авторами знайдено лише вісім видів жирних кислот. Серед них стеаринова займала 50 %, а пальмітинова – 19,57 %. Із полієнових кислот виявлено тільки лінолеву кислоту (3,09 %) і не знайдено кислот із довжиною вуглецевого ланцюга більше C₁₈ атомів.

Закономірність зниження вмісту окремих фракцій ліпідів та ненасичених жирних кислот спостерігається зі старінням клітин мікобактерій.

Підтвердженням цього є дослідження L. Larsson й співавт. (1985), які наголошують, що клітини, зняті в більш ранню фазу росту, відрізняються вмістом ненасичених кислот і кислот з розгалуженими ланцюгами.

W.J. Lennarz й співавт. у 1962 році виявили в клітинах *M. phlei* і *M. smegmatis* зниження з віком вмісту олеїнової кислоти і підвищення 10-метилстеаринової.

Але існують суперечливі дані. А.Т. Донец й співавт. у 1970 році зазначили, що у *M. rubrum* вміст фосфоліпідів до кінця стаціонарної фази росту підвищився від 15,5 до 19,2 %, а у *M. album* від 9,3 до 15 %.

Р.О. Драбкина (1963) повідомляє, що слід визначати ліпідний склад мікобактерій туберкульозу чотиритижневого віку, коли культура містить мало мертвих мікобактерій, ліпіди яких можуть піддатися ензимним змінам.

У свою чергу Л.М. Пинчук зі співавт. (1989) стверджують, що вік культури мікобактерій в межах 3–6 тижнів суттєво не впливає на склад жирних кислот.

За даними деяких авторів, зокрема С.О. Thoen й співавт. (1972), відомо, що зберігання культур мікобактерій в лабораторних умовах протягом двох років не змінює склад жирних кислот клітин.

Л.К. Dunnick та О'Leary в 1970 році та Л.В. Андреев й А.Н. Склифас в 1977 році виявили зв'язок між стійкістю до ліків та змінами ліпополісахаридного складу клітинної стінки мікобактерій.

Як стверджують С.Г. Батраков (1985), Н. Quereshi й співавт. (1980), ізоніозид у малих концентраціях інгібує синтез жирнокислотних складових міколових кислот у штаму *M. tuberculosis* H37Ra.

R.G. McDonald-Gibson та M. Young (1974) вважають, що ізоніозид перешкоджає синтезу загальних ліпідів у *M. takco*, що супроводжується їх зниженням.

За повідомленнями F.G. Winder та P.B. Collins в 1970 році, ізоніазид, або 3,3-ди-О-метилеллагова кислота, пригнічує біосинтез міколових кислот у *M. tuberculosis*, *M. avium* і *M. bovis*. Передбачається, що бактеріостатична дія ізоніазиду відносно туберкульозних мікобактерій пов'язана з порушенням формування клітинної стінки, яке викликане недостатністю міколових кислот.

Дані Е.К. Алімова та А.Т. Аставацитурян (1970) свідчать про те, що резистентні до антибіотиків штами мікобактерій містять більшу кількість загальних ліпідів та фосфоліпідів (ФЛ). У штамів, стійких до стрептоміцину, виявляється збільшення загальної кількості ліпідів, вищих жирних кислот, особливо α - та β -ненасичених. Це явище пов'язують з тим, що стрептоміцин стримує дихання бактерій і сприяє утворенню ацетату, який необхідний для синтезу жирних кислот, також зменшує окиснення останніх.

Стверджується (Кудикіна Ю.К., 2011), що ліпіди, і зокрема фосфоліпіди різного складу впливають на реактивацію мікобактерій (рис. 131). Внесення в середовище фосфатидилхоніну (лецитин), кардіоліпіну й ізофосфатидилхоніну веде до стимуляції реактивації подібно дії “активуючий оживлення фактор (grf)”.

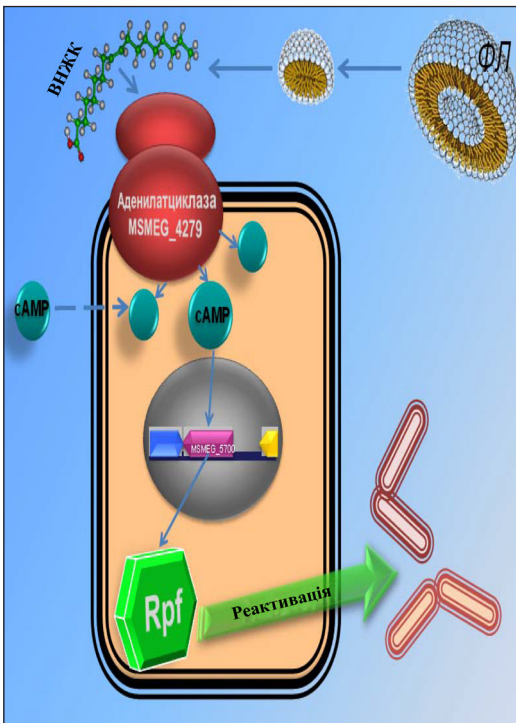


Рис. 131. Передбачувана схема реактивації ПФ *M. smegmatis* в рідкому середовищі за присутності індикаторів ФЛ, ВНЖК чи цАМФ.

На першому етапі ВНЖК, які можуть звільнятися також унаслідок гідролізу ФЛ, активують мембранозв'язуючу аденілатциклазу MSMEG_4279, що підвищує рівень цАМФ в клітині. цАМФ, добавлений в середовище реактивації в більших концентраціях, може проникати всередину клітини і виступати стимулятором реактивації ПФ подібно дії ВНЖК. На другому етапі реактивації відбувається підвищення рівня експресії гена *grfA*, можливо, через цАМФ-залежний транскрипційний чинник, і, отже, синтез білка *grf*. Кінцевим етапом є поділ клітини *M. smegmatis* за Ю.К. Кудикіною (2011).

Далі повідомляється, що саме вільні ненасичені жирні кислоти (ВНЖК) є відповідальними за реактивуючий ефект, а фосфоліпіди виступа-

ють в ролі їх джерел (можливо, за рахунок дії бактеріальних фосфоліпаз і естераз).

Наголошується, що одним із регуляційних білків мікобактерій, який “відчуває” жирні кислоти в довкіллі, є мембранозв’язуюча аденілатциклаза. Гени, які кодують цей білок, відомі (у МТБ Rv 2212, а у *M. smegmatis* – MSMEG-4279).

Напевно, стверджує Ю.К. Кудикіна, олеїнова ненасичена вільна жирна кислота активує цей фермент (аденілатциклаза), що може призводити до підвищення концентрації цАМФ у клітині. Це супроводжується реверсією (активацією) мікобактерій у вихідні вірулентні форми.

Таким чином, зміни в кількісному вмісті та якісному складі ліпідів, що відбуваються за дії факторів зовнішнього середовища, носять адаптаційний характер для мікобактерій, що забезпечує зберігання їх у природі як виду.

6.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Висновки досліджень, викладені в попередніх підрозділах, засвідчили персистенцію в організмі великої рогатої худоби мікобактерій, різного видового складу та ступеня вірулентності. Ідентифіковані комплексними лабораторними дослідженнями особливі швидкорослі та дисоціативні форми мікобактерій бичачого виду визначили наші подальші дослідження ліпідного складу виділених мікобактерій як в цілому, так і в порівняльному варіанті з референтними штамми та в умовах впливу різних факторів. Оскільки штам швидкорослих *M. bovis* у процесі пересівів змінив біологічну властивість (активність) та розщепився на дисоціативні форми то для подовження дослідів ліпідного складу було взято весь спектр його варіантів. Це суттєво збагатить розуміння мінливості мікобактерій. Дослідження особливо важливі, оскільки в усіх дослідках, результати яких наведені в роботі нижче, використано один штам *M. bovis*, який пасажувався протягом 10 років на різних середовищах та за різних температур. Це суттєво підвищує об’єктивність результатів та зроблених висновків. Разові дослідження окремих штамів одного виду мікобактерій, про результати яких повідомляють дослідники, можуть носити певну суб’єктивність, оскільки досліджені ними мікобактерії звичайно піддавалися впливу різних чинників, володіли різною вірулентністю (патогенністю) й т. ін. У наших дослідках це виключено.

Вивчали в порівняльному аспекті ліпідний склад еталонного штаму *Vallee* та вакцинного *BCG*, епізоотичних повільнорослого та швидкорослого штамів *M. bovis* їх дисоціативних форм і атипичних мікобактерій, виділених від тварин та об’єктів довкілля.

Виділення загальних ліпідів із досліджуваних зразків проводили за методикою Фолча в модифікації Блайя-Дайера для мікробіологічних проб (Кейтс М., 1975). 0,5 г біомаси зразків розводили дистильованою водою до 1 см³, доливали 3,5 см³ суміші хлороформ: етанол (1:2) і залишали на 2 год, періодично струшуючи. Потім центрифугували 5 хв на швидкості 3500 об./хв, зливали

надосадову рідину, а до осаду додавали 4,75 см³ суміші хлороформ: метанол: дистильована вода (1 : 2 : 0,8). Суміш струшували і центрифугували (5 хв – 3500 об./хв). Надосадову рідину зливали до попередньої, сюди ж додавали по 2,5 см³ хлороформу та дистильованої води, добре струшували і залишали для розділення. Нижній шар (хлороформний з ліпідами) збирали і висушували бензолом (30–35 °С). Кількість загальних ліпідів обчислювали у відсотках на наважку та на суху речовину (за загальноприйнятим методом).

Фракційний склад ліпідів вивчали методом тонкошарової хроматографії (ТШХ) на силікагелієвих пластинах Silufol (Чехія), попередньо знежирених перегоненим ацетоном і активованих за температури 100 °С протягом 1 год, у системі розчинників – гексан : діетиловий ефір : метанол : льодяна оцтова кислота (9 : 2 : 0,2 : 0,3). Суміш заливали в скляну камеру на висоту 1,5 см, накривали склом і залишали для насичення паром розчинників на 1 год.

На пластини наносили мікрошприцом пробу на відстані 2,5 см від нижнього краю і боків пластини і дещо вище рівня розчинників. Опускали пластину в камеру і чекали доти, доки розчинник не підійметься до рівня на 1 см від верхнього краю пластини; відмічали цей рівень. Пластину висушували під витяжкою і поміщали в іншу камеру з кристалічним йодом для проявлення.

Одержані плями обводили олівцем, підраховували відстань плям від точки нанесення і знаходили фронт розчинників – величину R_f ($R_f = L$ компоненти / L фронту). Інтенсивність забарвлення плям (ліпідних фракцій) виміряли за величиною поглинання на денситометрі ДО-1М у видимій ділянці (Ахрем А.А. та Кузнецова А.И., 1964). Розраховували відсотковий склад кожного класу ліпідів від суми їхніх величин поглинання.

Визначення компонентного складу фракцій вільних жирних кислот (ВЖК) у зразках проводили методом газорідинної хроматографії (ГРХ) на газовому хроматографі Chrom-5 („Laboratorni Pristroje”, Чехія), після попереднього метилювання, бо тільки у вигляді ефірів ВЖК можна визначати ГРХ-аналізом. За температури 200–300 °С метилові ефіри жирних кислот розділяються на колонці зі сорбентом Хроматон N-Super, 5 % SP 2100 відповідно до величини коефіцієнтів їхнього газорідинного розподілу. Розділені в газовій фазі метилові ефіри проявляються по зміні току іонізації на полуменево-іонізаційному детекторі (ПІД), в результаті одержують набір окремих піків на хроматограмі, кожен з яких відповідає конкретній жирній кислоті, а площа кожного піку відповідає їхнім концентраціям.

Метилювання ВЖК: до зразків загальних ліпідів додавали по 3 см³ 5%-вого диметилсульфату в метанолі, підігрівали 15 хв при 65 °С, потім охолоджували до кімнатної температури, додавали по 7 см³ дистильованої води і 1 см³ чотирихлористого вуглецю, суміш струшували і залишали для розподілення шарів. Нижній шар відбирали шприцом в гідролізні пробірки, випаровували насухо. У випаренні проби додавали по 20–50 мкл гексану і 5–10 мкл вводили у випаровувач хроматографа.

Аналіз зразків метилових ефірів жирних кислот проводили за таких умов: колонка $L = 1 \text{ м} \times 4 \text{ мм}$, на сорбенті Хроматон N-Super з 5 % SP 2100 (0,16–

0,20 мм). Температуру колонки програмували від 180 до 270 °С зі швидкістю нагрівання 5 °С/хв; температура випаровувача становила 200 °С, детектора – 230 °С, газносії – азот (осч), полуменево-іонізаційний детектор (ПД) (Кейтс М., 1975).

Якісний аналіз метилових ефірів жирних кислот проводили, порівнюючи, з час утримання стандартів, а кількісний – розрахуванням площі піків та визначенням їх відсотка від загальної площі піків, яку приймали за 100 %. Така робота проведена за участі співробітників кафедри М.В. Зеленської, О.М. Куліщенко, Л.О. Ковальової, П.О. Давиденка, В.В. Глебенюка, А.В. Ковальова.

6.2.1. Ліпідний склад мікобактерій еталонного штаму *Vallee* та вакцинного *BCG*

Культивування й накопичення мікобактерій штамів *Vallee* (зразок 1) та *BCG* (зразок 2) проводили на ячному живильному середовищі з рН 6,5.

У результаті досліджень виявили (табл. 51), що мікобактерії штаму *Vallee* синтезують приблизно в 5 разів більше загальних ліпідів, ніж *BCG* (8,82 проти 1,74 %, а на суху речовину відповідно 12,6 проти 2,49 %).

51. Вміст загальних ліпідів у досліджуваних штамів, % на наважку

Показник	Зразок	
	1	2
Вміст загальних ліпідів, % на наважку	8,82±0,79	1,74±0,28**
** $P \leq 0,01$.		

У мікобактерій штаму *Vallee* відмічали більший вміст стеринів, вільних жирних кислот (ВЖК – $P \leq 0,05$) та триацилгліцеролів ($P \leq 0,01$), а у *BCG* – дещо підвищену кількість фосфоліпідів, діацилгліцеролів та ефірів стеринів.

ТШХ-аналіз загальних ліпідів показав наявність шести фракцій, серед яких переважали фосфоліпіди: у штаму мікобактерій *Vallee* їх кількість становила 23,17 %, а у штаму *BCG* – 24,8 % (табл. 52).

52. Склад ліпідів мікобактерій, % від суми

Фракція загальних ліпідів	Зразок	
	1	2
Фосфоліпіди	23,17±0,94	24,80±0,51
Діацилгліцероли	17,08±0,60	17,60±0,33
Стерини	17,68±0,65	16,80±0,41
Вільні жирні кислоти	16,46±0,54	14,40±0,21*
Триацилгліцероли	13,41±0,52	10,46±0,18**
Ефіри стеринів	12,20±0,45	16,00±0,25**
∑ ліпідів	100	100
* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$.		

Фракції вільних жирних кислот мікобактерій наведено в *табл. 53* та на *рис. 132*.

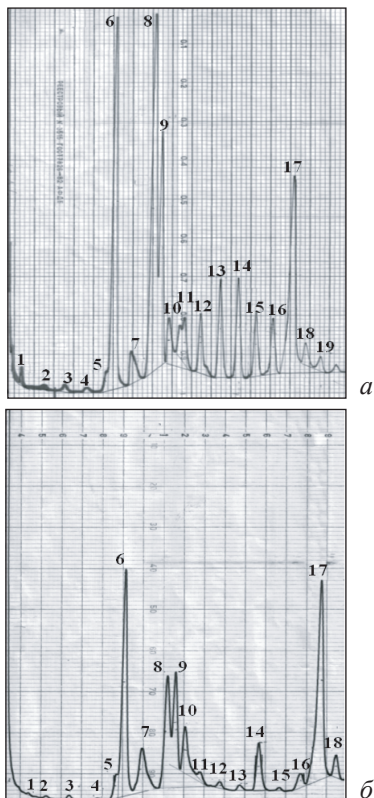
53. Вміст вільних жирних кислот у мікобактеріях, % від суми

Вільна жирна кислота	Код	Зразок	
		1	2
Лауринова	C _{12:0}	0,41±0,15	0,04±0,03
Тридеканова	C _{13:0}	0,25±0,12	0,11±0,002
Міристинова	C _{14:0}	0,41±0,10	0,46±0,01
Пентадеканова	C _{15:0}	0,36±0,13	0,08±0,002
Пальмітолеїнова	C _{16:1}	0,99±0,32	2,30±0,01*
Пальмітинова	C _{16:0}	18,87±0,98	21,12±0,07
Маргарінова	C _{17:0}	1,27±0,20	5,97±0,18***
Олеїнова	C _{18:1}	27,18±1,43	14,57±0,40**
Стеаринова	C _{18:0}	11,75±0,59	11,48±0,23
Лінолева + ліноленова	C _{18,2} +C _{18,3}	2,79±0,85	5,36±0,20*
Нонадеканова	C _{19:0}	2,31±0,50	0,55±0,02*
Арахінова	C _{20:0}	2,68±0,37	0,61±0,01**
Генейкозанова	C _{21:0}	5,13±0,43	0,61±0,01***
Бегенова	C _{22:0}	5,21±0,49	4,29±0,08
Трикозанова	C _{23:0}	3,31±0,57	0,23±0,03**
Тетракозанова	C _{24:0}	2,90±0,81	1,84±0,02
Пентакозанова	C _{25:0}	12,72±1,05	27,78±1,16***
Гексакозанова	C _{26:0}	1,46±0,46	1,99±0,06
Гептакозанова	C _{27:0}	сліди	0,61±0,01
∑ ненасичених		30,96±1,39	22,33±0,90**
∑ насичених		69,04±1,40	77,77±2,90

* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$; *** $P \leq 0,001$.
Тут і надалі за текстом:
C_{A:0} – насичена жирна кислота (A – кількість атомів вуглецю);
C_{A:H} – ненасичена жирна кислота (H – кількість подвійних зв'язків);
Сліди – наявність кислоти менше 0,01 %.

Як бачимо, високий вміст насичених жирних кислот мікобактерій відмічається в обох варіантах, але порівняно більший – у штаму *BCG* (зразок 1). Із насичених жирних кислот переважали пальмітинова, стеаринова та пентакозанова кислоти в обох досліджуваних зразках. Стеаринова кислота вміщувалася практично однаково в обох зразках.

Пальмітинова та пентакозанова кислоти домінували у штаму *BCG* (зразок 2), у якого також через значну перевагу пентакозанової кислоти, майже у 2,2 раза, відмічено більший вміст довголанцюгових (C_{21:0}–C_{27:0}) жирних кислот, ніж у штаму *Vallee* (зразок 1).



Позначення кислот:

- 1 – $C_{12:0}$ – лауринова;
- 2 – $C_{13:0}$ – тридеканова;
- 3 – $C_{14:0}$ – міристинова;
- 4 – $C_{15:0}$ – пентадеканова;
- 5 – $C_{16:1}$ – пальмітолеїнова;
- 6 – $C_{16:0}$ – пальмітинова;
- 7 – $C_{17:0}$ – маргарінова;
- 8 – $C_{18:1}$ – олеїнова;
- 9 – $C_{18:0}$ – стеаринова;
- 10 – $C_{18:2} + C_{18:3}$ – лінолева з ліноленою;
- 11 – $C_{19:0}$ – нонадеканова;
- 12 – $C_{20:0}$ – арахінова;
- 13 – $C_{21:0}$ – генейкозанова;
- 14 – $C_{22:0}$ – бегенова;
- 15 – $C_{23:0}$ – трикозанова;
- 16 – $C_{24:0}$ – тетракозанова;
- 17 – $C_{25:0}$ – пентакозанова;
- 18 – $C_{26:0}$ – гексакозанова;
- 19 – $C_{27:0}$ – гептакозанова

Рис. 132. Хроматограма ВЖК: а – штаму *Vallee*; б – штаму *BCG*

Але загальна сума коротколанцюгових кислот (C_{12} – C_{20}) переважала над довголанцюговими (C_{21} – C_{27}) в обох досліджуваних зразках, і особливо у штаму *Vallee*. Одержані дані значною мірою суперечать повідомленням авторів, які стверджують, що перевага довголанцюгових кислот над коротколанцюговими свідчить про зниження ступеня вірулентності мікобактерій.

Із ненасичених жирних кислот виявлено найбільшу кількість олеїнової кислоти, особливо в мікобактерій штаму *Vallee* (27,18 проти 14,57 %). Пальмітолеїнова та лінолева з ліноленою кислоти переважали ($P \leq 0,05$) у штаму *BCG* (зразок 2) у 2,32 та 1,92 раза порівняно з мікобактеріями штаму *Vallee* (зразок 1).

Отже, за вирощування на яєчному живильному середовищі з рН 6,5 досліджувані штами відрізнялися вмістом загальних ліпідів, фракційним складом, а також умістом окремих насичених та ненасичених жирних кислот, що зумовлено ступенем вірулентності еталонного та вакцинного штаму мікобактерій. У той же час співвідношення довго- та коротколанцюгових вільних жирних кислот мікобактерій суттєво відрізняється від раніше опублікованих даних численних авторів.

6.2.2. Ліпідний склад епізоотичного повільнорослого штаму *M. bovis* та атипових мікобактерій

Одержавши такі результати ліпідного складу мікобактерій штамів *Vallee* та BCG, необхідно було провести аналогічні дослідження з епізоотичним повільнорослим штамом вірулентних *M. bovis* та атипових мікобактерій, виділених з молока (АТ-1) та лімфатичних вузлів (АТ-2) великої рогатої худоби, реагуючої на ППД-туберкулін для ссавців.

У мікроорганізмів, культивованих на яєчному живильному середовищі з рН 6,5, встановили (табл. 54), що *M. bovis* містять значно вищу кількість загальних ліпідів, ніж атипові мікобактерії (АТ-1, АТ-2), де їх кількість була меншою в 1,74 та 2,26 раза відповідно (загальних ліпідів на суху речовину в *M. bovis* – 16,86 %; АТ-1 – 9,71 %; АТ-2 – 7,43 %).

54. Вміст загальних ліпідів у досліджуваних мікобактерій

Показник	Зразок		
	<i>M. bovis</i>	АТ-1	АТ-2
Вміст загальних ліпідів, % на наважку	11,80±1,60	6,80±0,68*	5,20±0,51*

У складі загальних ліпідів всіх мікобактерій (зразків) визначили шість основних фракцій. Серед них переважали фосфоліпіди (полярні ліпіди): 22,70–24,24 % (табл. 55).

55. Склад ліпідів у мікобактерій (ТШХ-аналіз), % від суми

Фракція загальних ліпідів	Зразок		
	<i>M. bovis</i>	АТ-№ 1	АТ-№ 2
Фосфоліпіди	22,70±0,41	24,17±0,43	24,24±0,39
Діацилгліцероли	17,18±0,26	17,58±0,29	19,26±0,31**
Стерини	19,02±0,41	18,13±0,28	17,13±0,37*
Вільні жирні кислоти	15,95±0,36	14,83±0,23	12,59±0,26**
Триацилгліцероли	10,43±0,28	11,53±0,18*	13,33±0,28**
Ефіри стеринів	14,72±0,36	13,73±0,22	13,45±0,32
∑ ліпідів	100	100	100

Підвищений вміст ді- і триацилгліцеролів виявлено в атипових мікобактерій. Натомість фракції стеринів та ефіри стеринів у цього виду мікобактерій характеризувалися нижчим рівнем вмісту, ніж у *M. bovis*.

Кількість фракцій вільних жирних кислот становила 12,6–14,8 %. Максимальну кількість ВЖК виявили в *M. bovis*, дещо меншу – в атипових мікобактерій, особливо в АТ-2. Водночас в останніх виявлена арахідонова жирна кислота, яка в *M. bovis* не ідентифікована, що свідчить про особливість хімічного складу клітинної оболонки атипових мікобактерій.

У жирнокислотному складі фракції ВЖК досліджуваних зразків біологічної маси мікроорганізмів було встановлено перевагу суми насичених жирних

кислот (табл. 56) за рахунок великої кількості пальмітинової кислоти, яка, за повідомленнями Э. Роуз (1971), Т.П. Ефімової та В.А. Циганова (1977), Т.В. Коронелли (1984), є основним компонентом суміші цієї фракції у мікобактерій. Найбільший її вміст відмічався у *M. bovis*.

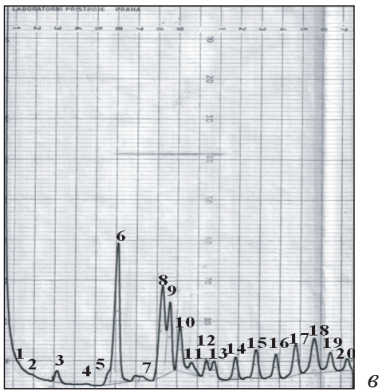
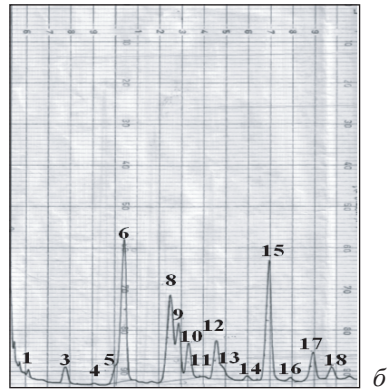
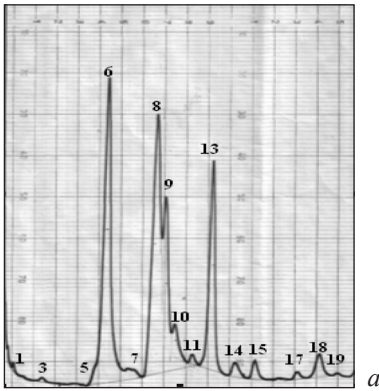
56. Вміст вільних жирних кислот у досліджуваних зразках, % від суми

Вільна жирна кислота	Код	Зразок		
		<i>M. bovis</i>	АТ-1	АТ-2
Лауринова	C _{12:0}	0,15±0,01	0,32±0,01***	сліди
Тридеканова	C _{13:0}	сліди	сліди	сліди
Міристинова	C _{14:0}	0,26±0,02	2,67±0,10***	1,76±0,03***
Пентадеканова	C _{15:0}	сліди	сліди	сліди
Пальмітолеїнова	C _{16:1}	1,54±0,03	2,35±0,04***	1,85±0,06**
Пальмітинова	C _{16:0}	28,49±1,43	22,67±0,80*	23,16±0,86*
Маргарінова	C _{17:0}	сліди	сліди	0,86±0,02
Олеїнова	C _{18:1}	28,39±1,34	20,80±0,50**	19,56±0,67**
Стеаринова	C _{18:0}	15,09±0,56	9,07±0,20***	12,30±0,36*
Лінолева + ліноленова	C _{18:2+C18:3}	2,44±0,06	5,88±0,18***	5,95±0,09***
Нонадеканова	C _{19:0}	0,39±0,02	сліди	0,97±0,04***
Арахідонова	C _{20:4}	сліди	7,67±0,23	1,94±0,04
Арахінова	C _{20:0}	17,47±0,54	сліди	2,29±0,08***
Генейкозанова	C _{21:0}	1,29±0,03	0,64±0,01***	3,27±0,07***
Бегенова	C _{22:0}	1,54±0,05	19,21±0,66***	4,86±0,17***
Трикозанова	C _{23:0}	сліди	0,50±0,02	3,60±0,07
Тетракозанова	C _{24:0}	0,65±0,03	5,34±0,20***	5,43±0,16***
Пентакозанова	C _{25:0}	2,30±0,09	2,88±0,10*	7,22±0,18***
Гексакозанова	C _{26:0}	сліди	сліди	3,15±0,11
Гептакозанова	C _{27:0}	сліди	сліди	1,83±0,06
∑ ненасичених		32,37±0,90	36,70±1,37	29,30±1,14
∑ насичених		67,63±1,78	63,30±1,83	70,70±1,78

Суттєвий вміст ненасичених жирних кислот (29,3–36,7 %) відмічався в атипових мікобактеріях, в основному за рахунок великої кількості олеїнової кислоти (19,56–28,39 %).

Крім того, в атипових мікобактерій двох штамів серед спектрів ненасичених жирних кислот відмічали наявність арахідонової кислоти, яка практично не виявлялась у штаму *M. bovis* (рис. 133).

Високий рівень умісту пальмітинової, олеїнової, стеаринової кислот у всіх зразках, арахідонової у атипових мікобактерій та арахінової у *M. bovis*, сприяв домінуванню коротколанцюгових кислот над довголанцюговими жирними кислотами і особливо у *M. bovis* (94,22 проти 5,78 %) – рис. 133,а.



Позначення кислот:

- 1 – C_{12:0} – лауринова;
- 2 – C_{13:0} – тридеканова;
- 3 – C_{14:0} – міристинова;
- 4 – C_{15:0} – пентадеканова;
- 5 – C_{16:1} – пальмітолеїнова;
- 6 – C_{16:0} – пальмітинова;
- 7 – C_{17:0} – маргаринова;
- 8 – C_{18:1} – олеїнова;
- 9 – C_{18:0} – стеаринова;
- 10 – C_{18:2}+C_{18:3} – лінолева з ліноленовою;
- 11 – C_{19:0} – нонадеканова;
- 12 – C_{20:4} – арахідонова;
- 13 – C_{20:0} – арахінова;
- 14 – C_{21:0} – генейкозанова;
- 15 – C_{22:0} – бегенова;
- 16 – C_{23:0} – трикозанова;
- 17 – C_{24:0} – тетракозанова;
- 18 – C_{25:0} – пентакозанова;
- 19 – C_{26:0} – гексакозанова;
- 20 – C_{27:0} – гептакозанова.

Рис. 133. Хроматограма ВЖК:
 а – *M. bovis* повільнорослого штаму;
 б – атипівих мікобактерій, виділених з молока (AT-1);
 в – мікобактерій, виділених з лімфатичних вузлів (AT-2)

У атипівих мікобактерій, виділених з молока (рис. 133,б), серед кислот з непарним числом атомів вуглецю відмічені тільки довголанцюгові жирні кислоти, серед яких переважала бегенова кислота (19,21 % проти 1,54 % у *M. bovis* та 4,86 % у атипівих мікобактерій (рис. 133,в), виділених з лімфатичних вузлів).

Отже, досліджені мікобактерії, виділені від тварин та довкілля, значно відрізнялися за вмістом загальних ліпідів та фракційним складом, що, напевно, пов'язано з різними вірулентними властивостями досліджених мікроорганізмів.

6.2.3. Ліпідний склад *M. bovis* епізоотичних штамів – повільно- та швидкорослих

Звичайно швидкість розмноження мікроорганізму, й відповідно формування колоній (культури) на живильному середовищі, безпосередньо пов'язано з активністю синтетазних систем (метаболізмом), до яких можуть відноситися й ліпіди. Показовими можуть виявитися дослідження останніх у мікобактерій, які систематично (постійно) за пересівів росли на 2–3 добу та на 15–30 добу культивування. Швидкорослий штам *M. bovis* культивували на щільному яєчному живильному середовищі з рН 6,5, яке приготовлене за існуючим прописом, що використано раніше для культивування та накопичення повільнорослих мікроорганізмів.

У результаті встановлено (табл. 57), що повільнорослий штам *M. bovis* синтезував більшу кількість загальних ліпідів, ніж швидкорослий, майже в 1,5 раза (на суху речовину відповідно 16,86 проти 11,5 %).

57. Вміст загальних ліпідів у *M. bovis* повільно- та швидкорослого штамів

Показник	Мікобактерії	
	повільнорослі	швидкорослі
Вміст загальних ліпідів, % на наважку	11,80±1,60	8,05±0,20

Мікобактерії штамів достовірно відрізнялися між собою за вмістом основних фракцій ліпідів, у тому числі і полярних – фосфоліпідів (табл. 58). У швидкорослого штаму *M. bovis* кількість останніх переважала в 1,23 раза порівняно з повільнорослим.

58. Склад ліпідів у мікобактерій, % від суми

Фракція загальних ліпідів	Мікобактерії	
	повільнорослі	швидкорослі
Фосфоліпіди	22,70±0,41	27,97±0,26***
Діацилгліцероли	17,18±0,26	12,54±0,27***
Стерини	19,02±0,41	12,23±0,20***
Вільні жирні кислоти	15,95±0,36	14,47±0,23*
Триацилгліцероли	10,43±0,28	18,32±0,16***
Ефіри стеринів	14,72±0,36	14,47±0,24
∑ ліпідів	100	100

У *M. bovis* швидкорослого штаму встановлено підвищений вміст триацилгліцеролів, на відміну від повільнорослого, у якого переважали діацилгліцероли, стерини, ефіри стеринів та вільні жирні кислоти.

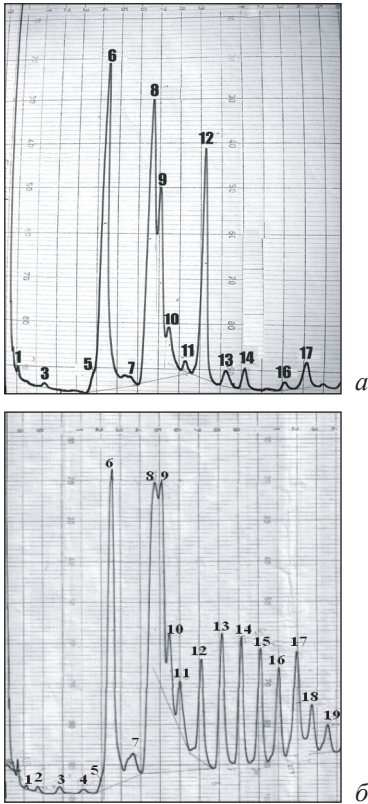
Досліджувані штами *M. bovis* відрізнялися за вмістом насичених жирних кислот. Сума насичених жирних кислот у *M. bovis* швидкорослого штаму виявилася більшою (табл. 59), що зумовлено суттєвим вмістом довголанцюгових кислот (C_{21:0}–C_{27:0} – 35,56 проти 5,78 %).

59. Вміст вільних жирних кислот у *M. bovis* повільнорослого та швидкорослого штамів, % від суми

Вільна жирна кислота	Код	Мікобактерії	
		повільнорослі	швидкорослі
Лауринова	C _{12:0}	0,15±0,01	0,04±0,02**
Тридеканова	C _{13:0}	сліди	0,10±0,02**
Міристинова	C _{14:0}	0,26±0,02	0,27±0,04**
Пентадеканова	C _{15:0}	сліди	0,22±0,02***
Пальмітолеїнова	C _{16:1}	1,54±0,03	0,55±0,07***
Пальмітинова	C _{16:0}	28,49±1,43	19,62±0,53**
Маргарінова	C _{17:0}	сліди	0,81±0,07***
Олеїнова	C _{18:1}	28,39±1,34	23,87±0,60*
Стеаринова	C _{18:0}	15,09±0,56	7,42±0,11***
Лінолева + ліноленова	C _{18:2} +C _{18:3}	2,44±0,06	2,97±0,16*
Нонадеканова	C _{19:0}	0,39±0,02	3,34±0,06***
Арахінова	C _{20:0}	17,47±0,54	5,23±0,14***
Генейкозанова	C _{21:0}	1,29±0,03	6,74±0,23***
Бегенова	C _{22:0}	1,54±0,05	5,78±0,18***
Трикозанова	C _{23:0}	сліди	5,89±0,35***
Тетракозанова	C _{24:0}	0,65±0,03	5,57±0,19***
Пентакозанова	C _{25:0}	2,30±0,09	7,43±0,26***
Гексакозанова	C _{26:0}	сліди	2,53±0,30**
Гептакозанова	C _{27:0}	сліди	1,62±0,19**
∑ ненасичених		32,37±0,90	27,39±0,44**
∑ насичених		67,63±1,78	72,61±0,50

Поряд з цим у мікобактерій штамів виявлена велика кількість пальмітинової кислоти, особливо у *M. bovis* повільнорослого штаму, у якого також відмічали перевагу стеаринової та арахінової кислот (у 2,03 та 3,34 раза відповідно) на відміну від *M. bovis* швидкорослого штаму. Проте у швидкорослого штаму мікобактерій майже в десять разів більше синтезувалося нонадеканової (C_{19:0}) кислоти. Крім того, у *M. bovis* повільнорослого штаму виявлено дещо вищу суму ненасичених жирних кислот, в основному за рахунок виділення більшої кількості пальмітолеїнової (P<0,001) та олеїнової (P<0,05) кислот. Лінолева та ліноленова кислоти переважали у швидкорослого штаму *M. bovis* (рис. 134).

Отже, *M. bovis* епізоотичного повільнорослого та швидкорослого штамів відрізняються за кількістю загальних ліпідів, фракційним складом та спектром жирних кислот, що може характеризувати різний рівень їх метаболізму, сформованого внаслідок впливу різних факторів як макроорганізму, так і зовнішнього середовища, де збудники тимчасово знаходяться, переміщуючись від хворої на туберкульоз тварини до сприйнятливої здорової.



Позначення кислот:

- 1 – C_{12:0} – лауринова;
- 2 – C_{13:0} – тридеканова;
- 3 – C_{14:0} – міристинова;
- 4 – C_{15:0} – пентадеканова;
- 5 – C_{16:1} – пальмітолеїнова;
- 6 – C_{16:0} – пальмітинова;
- 7 – C_{17:0} – маргарінова;
- 8 – C_{18:1} – олеїнова;
- 9 – C_{18:0} – стеаринова;
- 10 – C_{18:2}+C_{18:3} – лінолева
з ліноленою;
- 11 – C_{19:0} – нонадеканова;
- 12 – C_{20:0} – арахінова;
- 13 – C_{21:0} – генейкозанова;
- 14 – C_{22:0} – бегенова;
- 15 – C_{23:0} – трикозанова;
- 16 – C_{24:0} – тетракозанова;
- 17 – C_{25:0} – пентакозанова;
- 18 – C_{26:0} – гексакозанова;
- 19 – C_{27:0} – гептакозанова

Рис. 134. Хроматограма ВЖК *M. bovis*:
а – повільнорослого штаму; *б* – швидкорослого штаму

Безперечно, швидкий поділ мікобактерій супроводжується синтезом достатньо високого рівня шести вільних жирних кислот: трьох коротколанцюгових (тридеканова, пентадеканова, маргарінова) та трьох довголанцюгових (трикозанова, гексакозанова, гептакозанова).

6.2.4. Вплив окремих факторів на ліпідний склад мікобактерій

Звичайно, найбільш оптимальним живильним середовищем для мікроорганізмів у цілому, і мікобактерій зокрема, є внутрішнє середовище тварини чи людини. Але і в ньому збудник піддається суттєвій протидії захисних факторів макроорганізму, які приводять, без сумніву, до певних змін у мікроорганізмі на рівні гено- чи фенотипу, залежно від інтенсивності та тривалості їх дії. Проте й дотепер багато питань цього напрямку лишаються невідомими, неуроченими, а саме: які ж із факторів можуть викликати ті чи інші зміни в

мікроорганізми на рівні спектра ліпідів мікобактерій. З цією метою були проведені дослідження, зокрема, зі залежності ліпідного складу мікобактерій та їх вірулентних властивостей від складу штучного живильного середовища в різних варіаціях. На початку дослідів використали мікобактерії штаму *Vallee*, хоча його деякі біологічні властивості за багаторічного збереження та численні пасажі через штучні живильні середовища значно змінилися.

Вплив живильного середовища на ліпідний склад мікобактерій еталонного штаму Vallee. Для проведення такого дослідів з вивчення впливу складових середовища на ліпідний склад мікобактерій еталонного штаму *Vallee* культивували на двох живильних середовищах з рН 7,1: рідкому синтетичному середовищі Сотона (зразок 1) та щільному яєчному (зразок 2). У результаті досліджень вмісту загальних ліпідів виявилось, що інтенсивність біосинтезу ліпідів у мікобактерій штаму *Vallee* на середовищах не є однаковою (табл. 60). На яєчному середовищі (зразок 2) мікобактерії синтезували загальних ліпідів більше в 1,45 раза (на суху речовину відповідно 10,13 проти 6,94 %), ніж на синтетичному середовищі. У мікобактерій штаму *Vallee*, культивованих на яєчному середовищі, фракція фосфоліпідів переважала (22,95 проти 18,40 %). Проте на синтетичному середовищі в мікобактерій спостерігали достовірно більший вміст фракцій триацилгліцеролів та ефірів стеринів (табл. 61).

**60. Загальні ліпіди мікобактерій штаму *Vallee*
залежно від складу середовища**

Показник	Зразок	
	1	2
Вміст загальних ліпідів, % на наважку	4,86±0,67	7,09±0,56

61. Фракційний склад ліпідів мікобактерій штаму *Vallee*, % від суми

Фракція загальних ліпідів	Зразок	
	1	2
Фосфоліпіди	18,40±0,72	22,95±0,89*
Діацилгліцероли	17,18±0,48	17,86±0,68
Стерини	19,03±0,59	18,88±0,71
Вільні жирні кислоти	16,56±0,74	16,84±0,62
Триацилгліцероли	15,95±0,54	12,76±0,48*
Ефіри стеринів	12,88±0,59	10,71±0,43*
∑ ліпідів	100	100

У кількісному вмісті інших фракцій ліпідів (діацилгліцеролів, стеринів, вільних жирних кислот) та їх співвідношенні суттєвої різниці не відмічалось.

Поділ фракції вільних жирних кислот мікобактерій штаму *Vallee* методом ГРХ виявив їх ідентичність, але вони відрізнялися за кількістю, залежно від складу середовища (табл. 62).

62. Вільні жирні кислоти в мікобактерій штаму *Vallee*, % від суми

Вільна жирна кислота	Код	Зразок	
		1	2
Лауринова	C _{12:0}	сліди	сліди
Тридеканова	C _{13:0}	сліди	0,46±0,16
Міристинова	C _{14:0}	1,41±0,42	1,28±0,25
Пентадеканова	C _{15:0}	0,53±0,30	0,82±0,24
Пальмітолеїнова	C _{16:1}	1,52±0,51	2,01±0,33
Пальмітинова	C _{16:0}	36,23±1,13	30,12±1,64*
Маргаринова	C _{17:0}	2,15±0,59	1,46±0,24
Олеїнова	C _{18:1}	14,98±0,91	23,96±1,31***
Стеаринова	C _{18:0}	15,84±0,61	8,76±0,34***
Лінолева + ліноленова	C _{18:2+} C _{18:3}	12,57±0,60	15,29±0,39*
Нонадеканова	C _{19:0}	0,07±0,04	1,31±0,35*
Арахінова	C _{20:0}	2,11±0,24	0,30±0,21**
Генейкозанова	C _{21:0}	сліди	0,91±0,26
Бегенова	C _{22:0}	5,92±0,47	6,16±0,46
Трикозанова	C _{23:0}	сліди	0,48±0,17
Тетракозанова	C _{24:0}	2,46±0,48	1,09±0,50
Пентакозанова	C _{25:0}	0,32±0,09	3,93±0,81**
Гексакозанова	C _{26:0}	3,89±0,55	1,64±0,36**
Гептакозанова	C _{27:0}	сліди	сліди
∑ ненасичених		29,07±1,34	41,27±1,34**
∑ насичених		70,93±1,18	58,73±1,63**

За цього встановлена велика кількість насичених жирних кислот (58,73–70,93 %) у мікобактеріях, культивованих на обох середовищах. Із окремих насичених жирних кислот домінуючою виявилася пальмітинова, особливо в мікобактеріях, культивованих на синтетичному живильному середовищі. На такому ж середовищі мікобактерії синтезували більше міристинової, маргаринової, стеаринової, арахінової, тетракозанової та гексакозанової кислот.

Водночас таких кислот, як тридеканова, нонадеканова, генейкозанова, трикозанова та гептакозанова практично не відмічалось у мікобактерій, культивованих на синтетичному варіанті середовища. Того ж часу в мікобактерій, культивованих на щільному середовищі, не виявлялося тільки двох кислот: лауринової та гептоказанової, які не ідентифікувалися й у мікобактеріях, культивованих на синтетичному середовищі.

За культивування мікобактерій штаму *Vallee* на яєчному живильному середовищі спостерігався досить суттєвий вміст ненасичених жирних кислот (41,27 %), серед яких велика частота припадає на олеїнову кислоту мікобактерій, культивованих на обох живильних середовищах, хоча на яєчному середовищі переважають всі інші виділені ненасичені жирні кислоти (рис. 135).

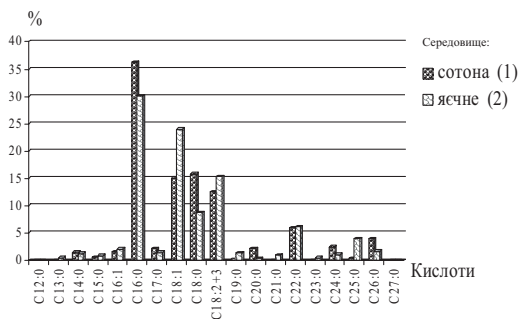


Рис. 135. Вільні жирні кислоти мікобактерій штаму *Vallee*, % від суми

У біомасі мікобактерій, накопичених на обох середовищах, зареєстровано невелику сумарну кількість кислот з непарним числом атомів вуглецю (C_{13:0}, C_{15:0} й ін.), хоча на ячному середовищі таких кислот було майже в 3,1 раза більше, ніж за накопичення мікобактерій штаму *Vallee* на синтетичному живильному середовищі (9,37 проти 3,07 % відповідно). Цей

факт пов'язаний, можливо, з порушенням їх синтезу в клітинах мікобактерій штаму на синтетичному середовищі.

Водночас коротколанцюгові кислоти (C_{12:0}–C_{20:0}) значно переважали над довголанцюговими (C_{21:0}–C_{27:0}) у мікобактерій, культивованих на обох середовищах: на синтетичному – 87,41 проти 12,59 %, на ячному – 85,77 проти 14,23 %.

Отже, залежно від складу живильного середовища характер біосинтеза загальних ліпідів, фракцій фосfolіпідів, триацилгліцеролів та ефірів стеринів і окремих жирних кислот у клітинах мікобактерій штаму *Vallee* змінюється. Утім більш широкий спектр вільних жирних кислот синтезується мікобактеріями, які культивуються на щільному живильному середовищі.

Ліпідний склад M. bovis швидкорослого штаму, культивованих на різних живильних середовищах. Для дослідження в порівняльній аспекті *M. bovis* швидкорослого штаму культивували на рідкому синтетичному середовищі Сотона та на щільному ячному живильному середовищі.

Виявили (табл. 63), що швидкорослий штам *M. bovis* на обох середовищах синтезував значну кількість загальних ліпідів (11,56 та 15,13 %, а на суху речовину 16,51 та 21,61 %), проте їх вміст був на ячному середовищі в 1,3 раза вищим. Мікобактерії штаму *Vallee* більше їх синтезували на цьому ж середовищі.

63. Загальні ліпіди *M. bovis* у швидкорослого штаму залежно від складу середовища

Показник	Зразок	
	1	2
Вміст загальних ліпідів, % на наважку	11,56±0,86	15,13±0,30*

Синтетичне живильне середовище (зразок 1) виявилося більш сприятливим для біосинтезу фракцій діацилгліцеролів, стеринів, вільних жирних кислот, триацилгліцеролів та ефірів стеринів, а ячне живильне середовище

(зразок 2) – для синтезу полярних ліпідів, тобто фосфоліпідів, яких було в 1,63 раза більше в мікобактеріях, культивованих на цьому середовищі (26,18 проти 16,07 %), ніж у мікобактеріях, культивованих на синтетичному середовищі (табл. 64).

64. Ліпіди мікобактерій, % від суми

Фракція загальних ліпідів	Зразок	
	1	2
Фосфоліпіди	16,07±0,47	26,18±0,25***
Діацилгліцероли	19,18±0,81	15,14±0,22**
Стерини	17,09±0,80	13,56±0,31*
Вільні жирні кислоти	15,54±0,67	14,20±0,25
Триацилгліцероли	17,09±0,73	16,72±0,32
Ефіри стеринів	15,03±0,84	14,20±0,25
∑ ліпідів	100	100

Оцінюючи кількісний та якісний склад вільних жирних кислот мікобактерій, встановили, що на синтетичному середовищі не виявлено шість кислот у мікобактеріях, культивованих на яєчному живильному середовищі – тільки три. Практично ідентичні результати одержані за дослідження мікобактерій штаму *Vallee*, де на синтетичному живильному середовищі мікроорганізми не синтезували шість вільних жирних кислот.

До того ж з неідентифікованих кислот 50 % належать до коротколанцюгових у першому і 66,6 % – у другому випадках.

Аналізом фракції вільних жирних кислот у *M. bovis* швидкорослого штаму, культивованих на синтетичному середовищі, встановлено значну перевагу (у 4,75 раза) загальної кількості насичених жирних кислот над ненасиченими (82,62 проти 17,38%) – табл. 65.

За культивування *M. bovis* швидкорослого штаму на яєчному середовищі, хоча і не суттєво – всього в 1,37 раза, переважали ненасичені жирні кислоти (57,98 проти 42,02 %). Це, можливо, пов'язано з великою кількістю олеїнової кислоти, вміст якої був у 3,4 раза більшим на яєчному середовищі, ніж у разі культивування мікобактерій на синтетичному середовищі.

Яєчне живильне середовище виявилось більш сприятливим для синтезу мікобактеріями низки насичених жирних кислот: пальмітинової, нонадеканової, арахінової, генейкозаної, пентакозаної, гексакозаної, а також ненасичених – олеїнової, лінолевої з ліноленою кислот, а синтетичне – тридеканової, пентадеканової, маргаринової, стеаринової, бегенової та тетракозаної кислот.

Крім того, на яєчному середовищі *M. bovis* швидкорослого штаму синтезували більшу кількість коротколанцюгових (C_{12:0}–C_{20:0}) жирних кислот (93,01 %), ніж на синтетичному середовищі (4,57 %). Тут у мікобактеріях відмічено перевагу довголанцюгових (C_{21:0}–C_{27:0}) жирних кислот (54,3 %), над такими в

65. Вільні жирні кислоти мікобактерій, % від суми

Вільна жирна кислота	Код	Зразок	
		1	2
Лауринова	C _{12:0}	сліди	0,01±0,004
Тридеканова	C _{13:0}	1,54±0,61	0,07±0,01
Міристинова	C _{14:0}	0,87±0,53	0,16±0,02
Пентадеканова	C _{15:0}	1,05±0,59	0,16±0,04
Пальмітолеїнова	C _{16:1}	0,78±0,51	0,87±0,04
Пальмітинова	C _{16:0}	16,72±0,69	30,52±0,45***
Маргарінова	C _{17:0}	1,16±0,51	сліди
Олеїнова	C _{18:1}	16,57±0,58	56,57±0,51***
Стеаринова	C _{18:0}	6,98±0,98	сліди
Лінолева + ліноленова	C _{18:2} +C _{18:3}	0,03±0,02	0,54±0,08**
Нонадеканова	C _{19:0}	сліди	0,73±0,05
Арахінова	C _{20:0}	сліди	3,38±0,27
Генейкозанова	C _{21:0}	сліди	1,16±0,23
Бегенова	C _{22:0}	38,46±1,16	0,18±0,05***
Трикозанова	C _{23:0}	0,15±0,07	сліди
Тетракозанова	C _{24:0}	13,08±0,70	0,60±0,20***
Пентакозанова	C _{25:0}	2,61±0,69	4,84±0,29*
Гексакозанова	C _{26:0}	сліди	0,12±0,05
Гептакозанова	C _{27:0}	сліди	0,09±0,03
∑ ненасичених		17,38±0,84	57,98±0,43***
∑ насичених		82,62±1,07	42,02±0,23***

мікобактеріях, накопичених на яєчному середовищі (6,99 %). Вкладене можна пояснити великим умістом бегенової (38,46 проти 0,18 %) та тетракозанової (13,08 проти 0,6 %) кислот.

Відзначимо, що і на синтетичному, і на яєчному живильних середовищах виявили однакову невелику кількість кислот з непарним числом атомів вуглецю (6,51 та 7,05 % відповідно). Практично аналогічні дані одержані раніше під час дослідження мікобактерій штаму *Vallee* за тих же умов, але явної стимуляції їхнього синтезу на яєчному середовищі у швидкорослого штаму не спостерігається.

Отже, хоча *M. bovis* швидкорослого штаму здатні синтезувати суттєву кількість загальних ліпідів при культивуванні на двох досліджуваних середовищах, проте їх уміст переважав у мікобактерій, культивованих на яєчному середовищі за рахунок фракції фосфоліпідів. В аналізі ВЖК *M. bovis* швидкорослого штаму, культивованого на синтетичному живильному середовищі, подібно до штаму *Vallee*, суттєво переважають насичені жирні кислоти над ненасиченими. На яєчному середовищі в біомасі мікобактерій обох штамів значний відсоток складають ненасичені жирні кислоти. Ці дані вказують на те, що син-

тетичне середовище, можливо, більш сприятливе для росту та розмноження як мікобактерій штаму *Vallee*, так і швидкорослого, ніж ячне середовище.

Такі динамічні зміни ліпідного складу мікобактерій можуть бути зумовлені різноманітними чинниками, серед яких знаходяться і вміст у середовищі кислотного-лужних грам-еквівалентів та кількість пасажів мікобактерій. Тому подальші дослідження були спрямовані саме на з'ясування цього питання.

6.2.5. Залежність ліпідного складу мікобактерій від рН штучного живильного середовища

Із цією метою досліджували ліпідний склад мікобактерій бичачого виду, еталонного штаму *Vallee*, епізоотичного швидкорослого штаму, які культивували на середовищах одного складу, але з різним рН та з різною кількістю пересівів досліджуваних мікобактерій.

Ліпідний склад мікобактерій штаму Vallee, накопичених на яєчному живильному середовищі з рН 7,1 та 6,5. За культивування мікобактерій штаму *Vallee* на яєчному живильному середовищі з рН 7,1 – 7,2 та 6,5 виявили незначну перевагу загальних ліпідів у біомасі мікобактерій за підкисненого рН середовища (8,82 % та 7,09 %, на суху речовину 12,6 проти 10,13 % відповідно) – *табл. 66.*

66. Загальні ліпіди мікобактерій штаму *Vallee*

Показник	рН середовища	
	7,1	6,5
Вміст загальних ліпідів, % на наважку	7,09±0,56	8,82±0,79

Аналіз даних по кількісному вмісту окремих фракцій ліпідів та їх співвідношення у мікобактерій штаму *Vallee*, культивованого на яєчному середовищі з різним рН, суттєвих відмінностей не виявив (*табл. 67*).

У біомасі штаму *Vallee*, який накопичували на середовищі з рН 7,1, було виявлено дещо більше діацилгліцеролів, стеринів та вільних жирних кислот. За культивування цього штаму мікобактерій на середовищі з рН 6,5 спостерігали незначну перевагу ефірів стеринів, триацилгліцеролів та фосфоліпідів.

67. Ліпіди в мікобактерій штаму *Vallee*, % від суми

Фракція загальних ліпідів	рН середовища	
	7,1–7,2	6,5
Фосфоліпіди	22,95±0,89	23,17±0,94
Діацилгліцероли	17,86±0,68	17,08±0,60
Стерини	18,88±0,71	17,68±0,65
Вільні жирні кислоти	16,84±0,62	16,46±0,54
Триацилгліцероли	12,76±0,48	13,41±0,52
Ефіри стеринів	10,71±0,43	12,20±0,45
∑ ліпідів	100	100

Розділенням фракцій вільних жирних кислот методом ГРХ встановлені ідентичні, але з різним кількісним умістом жирні кислоти. Деякі з них суттєво переважали вміст, що залежало від кислотних грам-еквівалентів. Очевидна перевага встановлена пальмітинової (1,6 раза), пальмітолеїнової (2 раза), пентадеканової (2,3 раза), міристинової (3,1 раза), лінолева + ліноленої (3,5 раза) кислот мікобактерій, що культивувалися на середовищі з рН 7,1, над такими на середовищі з рН 6,5.

У мікобактеріях, які культивувалися на середовищі з рН 6,5, суттєво домінували нонадеканова (1,8 раза), тетракозанова (2,7 раза), пентакозанова (3,2 раза), генейкозанова (5,6 раза), трикозанова (6,9 раза), арахінова (8,9 раза) кислоти.

Звертає на себе увагу той факт, що домінували тільки ті коротколанцюгові вільні жирні кислоти мікобактерій, які культивувалися на середовищі з рН 7,1, на середовищі з рН 6,5 – в основному довголанцюгові.

Водночас виявлено високий вміст насичених жирних кислот, який становив 58,73–69,04 %, хоча при культивуванні мікобактерій на середовищі з рН 7,1 спостерігався досить суттєвий вміст ненасичених жирних кислот (табл. 68).

68. Вільні жирні кислоти мікобактерій штаму *Vallee*, % від суми

Вільна жирна кислота	Код	рН середовища	
		7,1–7,2	6,5
Лауринова	C _{12:0}	сліди	0,41±0,15
Тридеканова	C _{13:0}	0,46±0,16	0,25±0,12
Міристинова	C _{14:0}	1,28±0,25	0,41±0,10*
Пентадеканова	C _{15:0}	0,82±0,24	0,36±0,13
Пальмітолеїнова	C _{16:1}	2,01±0,33	0,99±0,32
Пальмітинова	C _{16:0}	30,12±1,64	18,87±0,98**
Маргарінова	C _{17:0}	1,46±0,24	1,27±0,20
Олеїнова	C _{18:1}	23,96±1,31	27,18±1,43
Стеаринова	C _{18:0}	9,76±0,34	11,75±0,59*
Лінолева + ліноленова	C _{18:2} +C _{18:3}	15,29±0,39	2,79±0,85***
Нонадеканова	C _{19:0}	1,31±0,35	2,31±0,50
Арахінова	C _{20:0}	0,30±0,21	2,68±0,37**
Генейкозанова	C _{21:0}	0,91±0,26	5,13±0,43**
Бегенова	C _{22:0}	6,16±0,46	5,21±0,49
Трикозанова	C _{23:0}	0,48±0,17	3,31±0,57**
Тetraкозанова	C _{24:0}	1,09±0,50	2,90±0,81
Пентакозанова	C _{25:0}	3,93±0,81	12,72±1,05**
Гексакозанова	C _{26:0}	1,64±0,36	1,46±0,46
Гептакозанова	C _{27:0}	сліди	сліди
∑ ненасичених		41,27±1,34	30,96±1,39**
∑ насичених		58,73±1,63	69,04±1,40**

Із окремих насичених жирних кислот у мікобактерій штаму *Vallee* домінуючими були пальмітинова кислота (30,12–18,87 %) та бегенова (6,16–5,21 %), які переважали в мікобактерій, накопичених на середовищі з рН 7,1, а також стеаринова (11,75–8,76 %) і пентакозанова кислоти (12,72–3,93 %), які переважали в таких, накопичених на середовищі з рН 6,5. У біомасі мікобактерій, накопичених на середовищі з рН 6,5, відмічено більше генейкозанової (5,13%), трикозанової (3,31 %), тетракозанової (2,9 %), арахінової (2,68 %) і наонадеканової (2,31 %) кислот.

Серед ненасичених жирних кислот виявлено більше олеїнової кислоти (27,18–23,96 %) в обох досліджуваних зразках, але вона переважала в мікобактерій, накопичених на середовищі з рН 6,5, а вміст лінолевої з ліноленою ($P \leq 0,001$) і пальмітолеїнової кислот був вищим у мікобактерій, культивованих на середовищі з рН 7,1.

Коротколанцюгові кислоти ($C_{12:0}$ – $C_{20:0}$) переважали над довголанцюговими ($C_{21:0}$ – $C_{27:0}$) також в обох досліджуваних зразках, але більш суттєво в мікобактерій штаму *Vallee*, які культивувалися на середовищі з рН 7,1 (85,77 проти 14,23 %). Кислот з непарним числом атомів вуглецю ($C_{13:0}$, $C_{15:0}$ й ін.) у мікобактеріях, культивованих на середовищі з рН 7,1, було значно менше, ніж у таких, культивованих на середовищі з рН 6,5 (9,37 проти 25,35 %).

Отже, ячне живильне середовище з рН 6,5 виявилось кращим для росту та розмноження мікобактерій штаму *Vallee*, умови якого були більш сприятливими для адаптації мікроорганізму та синтезу загальних ліпідів, фракції фосфоліпідів і вільних жирних кислот, зокрема таких, як наонадеканова, арахінова, генейкозанова, трикозанова, тетракозанова, і особливо пентакозанова. Середовище з рН 7,1 було менш сприятливим, що визначило скорочення довжини ланцюга кислот і зниження синтезу кислот з непарним числом атомів вуглецю.

Без сумніву, ліпідний склад мікобактерій штаму *Vallee* виділений з макроорганізму (велика рогата худоба) близько ста років потому, відрізняється від таких, що персистують в організмі тварин в теперішніх індустріалізованих умовах, коли суттєво змінився весь технологічний процес отримання сільськогосподарської сировини, в тому числі й підхід до лікування тварин (антибіотики та й інші хімічні препарати) та специфічної профілактики інфекційних захворювань. Це звичайно супроводжувалося появою мікобактерій з особливими властивостями, деякі з них розглянуті вище, та визначило подальші дослідження їх ліпідного складу (колонії мікобактерій після висіву на щільне середовище утворюються на 2–3 добу культивування).

Використано попередній методичний підхід досліджень.

Ліпідний склад M. bovis швидкорослого штаму, накопичених на ячному живильному середовищі з рН 7,1 та 6,5. Культивування швидкорослого штаму *M. bovis* на ячному живильному середовищі з рН 7,1 та 6,5 приводить до різної інтенсивності синтезу загальних ліпідів ($P \leq 0,001$) – табл. 69. Більше загальних ліпідів (майже у 2 рази) спостерігається у мікобактерій, культивованих на середовищі з рН 7,1 (кількість загальних ліпідів на суху речовину в зразках 21,61 проти 11,50 %).

69. Загальні ліпіди мікобактерій

Показник	рН середовища	
	7,1	6,5
Вміст загальних ліпідів, % на наважку	15,13±0,30	8,05±0,20***

Водночас розділення загальних ліпідів на фракції виявило велику кількість фосфоліпідів в обох зразках і перевагу їх в мікобактеріях, культивованих на середовищі з рН 6,5, яке також було сприятливим для синтезу більшої кількості триацилгліцеролів, вільних жирних кислот, а також ефірів стеринів (табл. 70).

70. Ліпіди мікобактерій, % від суми

Фракція загальних ліпідів	рН середовища	
	7,1	6,5
Фосфоліпіди	26,18±0,25	27,97±0,26**
Діацилгліцероли	15,14±0,22	12,54±0,27**
Стерини	13,56±0,31	12,23±0,20*
Вільні жирні кислоти	14,20±0,25	14,47±0,23
Триацилгліцероли	16,72±0,32	18,32±0,16*
Ефіри стеринів	14,20±0,25	14,47±0,24
∑ ліпідів	100	100

У дослідних мікроорганізмів, накопичених на середовищі з рН 7,1, переважали фракції діацилгліцеролів та стеринів.

Разом з цим у мікобактеріях, які були накопичені на середовищі з різним рН, інтенсивність біосинтезу деяких жирних кислот відрізнялася з невірогідним показником ($P > 0,01$) – табл. 71.

71. Вільні жирні кислоти мікобактерій, % від суми

Вільна жирна кислота	Код	рН середовища	
		7,1	6,5
1	2	3	4
Лауринова	C _{12:0}	0,01±0,004	0,04±0,02**
Тридеканова	C _{13:0}	0,07±0,01	0,10±0,02
Міристинова	C _{14:0}	0,16±0,02	0,27±0,04
Пентадеканова	C _{15:0}	0,16±0,04	0,22±0,02
Пальмітолеїнова	C _{16:1}	0,87±0,04	0,55±0,07*
Пальмітинова	C _{16:0}	30,52±0,45	19,62±0,53***
Маргарінова	C _{17:0}	сліди	0,81±0,07
Олеїнова	C _{18:1}	56,57±0,51	23,87±0,60***
Стеаринова	C _{18:0}	сліди	7,42±0,11
Лінолева + ліноленова	C _{18:2} +C _{18:3}	0,54±0,08	2,97±0,16***

1	2	3	4
Нонадеканова	C _{19:0}	0,73±0,05	3,34±0,06***
Арахінова	C _{20:0}	3,38±0,27	5,23±0,14**
Генейкозанова	C _{21:0}	1,16±0,23	6,74±0,23***
Бегенова	C _{22:0}	0,18±0,05	5,78±0,18***
Трикозанова	C _{23:0}	сліди	5,89±0,35
Тетракозанова	C _{24:0}	0,60±0,20	5,57±0,19***
Пентакозанова	C _{25:0}	4,84±0,29	7,43±0,26**
Гексакозанова	C _{26:0}	0,12±0,05	2,53±0,30**
Гептакозанова	C _{27:0}	0,09±0,03	1,62±0,19**
∑ ненасичених		57,98±0,43	27,39±0,44***
∑ насичених		42,02±0,23	72,61±0,50***

У разі культивування мікобактерій на середовищі з рН 6,5 спостерігали велику кількість насичених жирних кислот, сума яких становила 72,61 % проти 42,02 % на середовищі з рН 7,1.

Серед окремих насичених жирних кислот домінуючою була пальмітинова кислота, але переважала вона в мікобактерій, які культивувалися на середовищі з рН 7,1 (30,52 проти 19,62 %). У мікобактерій, які були накопичені на середовищі з рН 7,1, такі кислоти, як стеаринова, маргарінова та трикозанова виявлялись у вигляді слідів, тоді як на середовищі з рН 6,5 – у значній кількості.

У мікобактерій швидкорослого штаму *M. bovis*, культивованих на середовищі з рН 7,1, сума ненасичених жирних кислот переважала суму насичених, через значний вміст олеїнової кислоти, якої було майже в 2,37 раза більше, ніж у мікобактерій, накопичених на середовищі з рН 6,5.

У мікобактерій, які культивувалися на середовищі з рН 7,1, коротколанцюгових жирних кислот (C_{12:0}–C_{20:0} – 93,01 %) відмічено у 13,3 раза більше, ніж довголанцюгових (C_{21:0}–C_{27:0} – 6,99 %).

На середовищі з рН 6,5 мікобактерії також більше синтезували коротколанцюгових жирних кислот, проте тільки в 1,8 раза (64,44 проти 35,56 %). Це середовище виявилось сприятливим і для синтезу кислот з непарним числом атомів вуглецю (C_{13:0}, C_{15:0} й ін.), кількість яких становила 26,15 %, у той час як на середовищі з рН 7,1 тільки 7,05 %.

Отже, ячне живильне середовище з рН 7,1 виявилось сприятливим для синтезу *M. bovis* швидкорослого штаму загальних ліпідів, діацилгліцеролів та стеринів. Але перевага ненасичених жирних кислот над насиченими, а також коротколанцюгових кислот над довголанцюговими вказує, можливо, на посилення процесів метаболізму, спрямованих на адаптацію мікобактерій до середовища з таким вмістом іонів водню.

Вочевидь, ячне живильне середовище принципово відрізняється за своїм хімічним складом від синтетичного, яке ми передбачали використати в на-

ступних, аналогічних попереднім, дослідженнях. Проте культивування *M. bovis* за такою ж методикою (синтетичне середовище з різним рН) дозволить підтвердити чи спростувати висновок, викладений у попередньому підрозділі.

Ліпідний склад M. bovis швидкорослого штаму, накопичених на синтетичному живильному середовищі з різним рН. Одержані результати хроматографічних досліджень показали, що *M. bovis* швидкорослого штаму, культивованих у синтетичному живильному середовищі Сотона з різним рН, за кількістю загальних ліпідів вірогідно відрізнялася ($P \leq 0,05$) – табл. 72.

72. Загальні ліпіди *M. bovis* залежно від рН синтетичного середовища

Показник	рН середовища	
	7,1	6,5
Загальні ліпіди, % на наважку	11,56±0,86	7,73±0,57*

У *M. bovis*, культивованих у середовищі з рН 7,1, вихід загальних ліпідів був у 1,5 раза вищим (на суху речовину 16,51 проти 11,04 %), ніж у середовищі з рН 6,5.

Серед виділених ТШХ-аналізом основних фракцій ліпідів мікобактерій, які культивувалися в середовищі з рН 7,1, дещо переважали стерини, вільні жирні кислоти та ефіри стеринів. У середовищі з рН 6,5 відмічали більше триацилгліцеролів та фосфоліпідів (табл. 73).

73. Ліпіди мікобактерій, % від суми

Фракція загальних ліпідів	рН середовища	
	7,1–7,2	6,5
Фосфоліпіди	16,07±0,47	16,67±0,55
Діацилгліцероли	19,18±0,81	19,29±0,92
Стерини	17,09±0,80	15,79±0,83
Вільні жирні кислоти	15,54±0,67	14,91±0,78
Триацилгліцероли	17,09±0,73	20,18±0,73*
Ефіри стеринів	15,03±0,84	13,16±0,61
∑ ліпідів	100	100

За розділення фракції вільних жирних кислот мікобактерій, накопичених в обох середовищах, сума насичених жирних кислот переважала суму ненасичених (табл. 74). Але в мікобактерій, культивованих на середовищі з рН 7,1, вміст насичених жирних кислот був більшим в 1,1 раза, ніж у мікобактерій, культивованих на середовищі з рН 6,5.

Серед окремих жирних кислот мікобактерій відмічено суттєвий вміст пальмітинової кислоти (21,71 та 16,72 %), особливо в мікобактерій, культивованих у середовищі з рН 6,5, бегенової (38,46 та 32,41 %) – у мікобактерій, культивованих в обох досліджуваних середовищах, а також тетракозанової (13,08 та 4,01 %) – у середовищі з рН 7,1.

74. Вільні жирні кислоти мікобактерій, % від суми

Вільна жирна кислота	Код	рН середовища	
		7,1	6,5
Лауринова	C _{12:0}	сліди	2,00±0,21
Тридеканова	C _{13:0}	1,54±0,61	1,80±0,58
Міристинова	C _{14:0}	0,87±0,53	1,34±0,54
Пентадеканова	C _{15:0}	1,05±0,59	0,98±0,48
Пальмітолеїнова	C _{16:1}	0,78±0,51	0,67±0,35
Пальмітинова	C _{16:0}	16,72±0,69	21,71±1,11*
Маргаринова	C _{17:0}	1,16±0,51	0,67±0,50
Олеїнова	C _{18:1}	16,57±0,58	24,72±1,15**
Стеаринова	C _{18:0}	6,98±0,98	6,68±0,76
Лінолева + ліноленова	C _{18:2} +C _{18:3}	0,03±0,02	0,89±0,27*
Генейкозанова	C _{21:0}	сліди	сліди
Нонадеканова	C _{19:0}	сліди	сліди
Арахінова	C _{20:0}	сліди	сліди
Бегенова	C _{22:0}	38,46±1,16	32,41±1,05*
Трикозанова	C _{23:0}	0,15±0,07	сліди
Тетракозанова	C _{24:0}	13,08±0,70	4,01±0,58***
Пентакозанова	C _{25:0}	2,61±0,69	1,34±0,63
Гексакозанова	C _{26:0}	сліди	0,78±0,53
Гептакозанова	C _{27:0}	сліди	сліди
∑ ненасичених		17,38±0,84	26,28±1,37**
∑ насичених		82,62±1,07	73,72±1,11**

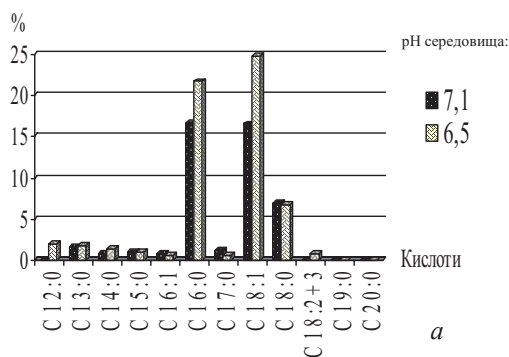
Такі кислоти, як нонадеканова, арахінова, генейкозанова та гептакозанова були виявлені в мікобактеріях, культивованих в обох середовищах у вигляді слідів.

Ненасичених жирних кислот відмічено в 1,5 раза більше в біомасі мікобактерій, які одержані в середовищі з рН 6,5, за рахунок значної переваги олеїнової кислоти (24,72 проти 16,57 %) і порівняно підвищеної кількості лінолевої з ліноленовою кислот (0,89 проти 0,03 %).

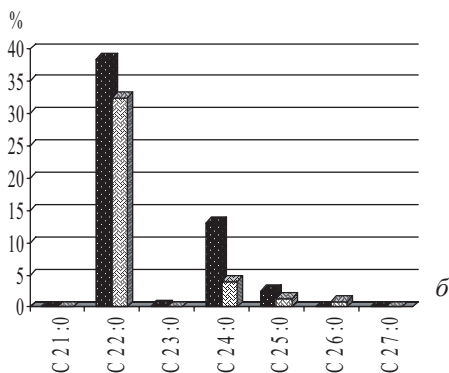
Водночас *M. bovis* у синтетичному середовищі, незалежно від його рН, швидкорослого штаму синтезували малу кількість кислот з непарним числом атомів вуглецю (C_{13:0}, C_{15:0} й ін.).

Коротколанцюгові жирні кислоти (рис. 136,а) переважали над довголанцюговими (рис. 136,б) при вирощуванні мікобактерій в середовищі з рН 6,5 (61,46 проти 38,54 %), а в мікобактеріях, накопичених в середовищі з рН 7,1, домінували над коротколанцюговими довголанцюгові вільні жирні кислоти (54,3 проти 45,7 %) за рахунок великої кількості бегенової та тетракозанової кислот.

Отже, результати досліджень засвідчили, що мікобактерії на синтетичному середовищі з рН 7,1 синтезують більше загальних ліпідів, фракцій



a



б

Рис. 136. Жирні кислоти *M. bovis* швидкорослого штаму, % від суми:

а – коротколанцюгові; *б* – довголанцюгові

стеринів, ефірів стеринів та вільних жирних кислот, особливо насичених та довголанцюгових жирних кислот, тоді як на середовищі з рН 6,5 у мікобактерій домінують триацилгліцероли та фосфоліпіди, а також ненасичені та коротколанцюгові жирні кислоти.

Зіставляючи одержані результати, відзначимо, що на яєчному середовищі з рН 7,1 мікобактерії в 1,3 раза більше синтезують загальних ліпідів з рН 6,5 – тільки в 1,04 раза порівняно зі синтетичним середовищем.

Значні відмінності виявлені і у відношенні фракцій ліпідів.

На яєчному середовищі з рН 7,1 мікобактеріями синтезується фосфоліпідів в 1,6 раза більше, ніж на синтетичному середовищі з рН 7,1, з рН 6,5 – в 1,8 раза. Інші фракції мікобактерій на щільному середовищі з рН 7,1 синтезуються в меншій кількості відносно синтетичного середовища;

на синтетичному середовищі з рН 6,5, крім фракції ефіри стеринів (як і фосфоліпідів), мікобактерії переважно інтенсивніше синтезують (порівняно з яєчним середовищем) діацилгліцероли, стерини, вільні жирні кислоти та триацилгліцероли (у 1,5; 1,3; 1,03; 1,1 раза відповідно).

Водночас усі діагностовані вільні жирні кислоти синтезуються мікобактеріями, які культивувалися на яєчному середовищі як з рН 7,1, так і 6,5, за винятком стеаринової та трикозанової (середовище з рН 7,1). Мікобактерії, культивовані в синтетичному середовищі (рН 7,1 та 6,5) значно менше синтезують аналізованих кислот: 13 та 14 із 19 відповідно. Ці дані свідчать про те, щоклад середовища, в тому числі й вміст кислотних грам-еквівалентів, впливає на якість вільних жирних кислот мікобактерій.

Аналіз кількісного складу кислот доводить, що й в цьому аспекті простежуються досить суттєві відмінності, а високий вміст ненасичених кислот у мікобактеріях, культивованих на яєчному середовищі як з рН 7,1, так і 6,5, свідчить про більш інтенсивніші перебудовчі процеси метаболізму, ніж на синтетичному середовищі, де в мікобактерій переважають насичені кислоти.

Залежність ліпідного складу мікобактерій від багаторазового пасажування через штучні живильні середовища. Важливість такого напрямку полягає в тому, що в літературі практично відсутні дані з вивчення ліпідів мікобактерій, які багаторазово пасажувалися. Адже намічені досліди можуть встановити деякі особливості та закономірності в тенденції ліпідів мікобактерій залежно від ступеня вірулентності.

Ліпідний склад, сенсibilізувальні та вірулентні властивості мікобактерій еталонного штаму *Vallee*, пасажованих 21 раз. Вивчення впливу кількості пасажів на ліпідний склад та вірулентність мікобактерій еталонного штаму *Vallee* проводили після культивування на яєчному живильному середовищі з рН 6,5.

Для порівняння ліпідного складу мікобактерій штаму *Vallee* після багаторазового пасажування було взято вихідну материнську культуру, накопичену протягом 30 діб за температури 37 °С.

У результаті встановлено, що в мікобактерій штаму *Vallee* зі збільшенням кількості пасажів знижувався вміст загальних ліпідів (табл. 75), на другому пасажі 8,82 %, на 21-му – 5,83 %, на суху речовину відповідно 12,6 проти 8,33 %.

75. Загальні ліпіди мікобактерій

Показник	Пасаж	
	2-й	21-й
Загальні ліпіди, % на наважку	8,82±0,79	5,83±0,65*

Тенденція до зниження характерна й для таких фракцій ліпідів, як фосфоліпіди (23,17 та 21,74 %) та ефіри стеринів (12,20 та 10,14 %) – табл. 76.

76. Ліпіди мікобактерій, % від суми

Фракція загальних ліпідів	Пасаж	
	2-й	21-й
Фосфоліпіди	23,17±0,94	21,74±0,78
Діацилгліцероли	17,08±0,60	18,36±0,56
Стерини	17,68±0,65	18,36±0,66
Вільні жирні кислоти	16,46±0,54	16,91±0,61
Триацилгліцероли	13,41±0,52	14,49±0,55
Ефіри стеринів	12,20±0,45	10,14±0,56*
∑ ліпідів	100	100

Водночас багаторазові пасажі сприяли підвищенню вмісту діацилгліцеролів, стеринів, вільних жирних кислот та триацилгліцеролів.

У жирнокислотному спектрі ліпідів штаму *Vallee* на 21-му пасажі спостерігалось збільшення ненасичених жирних кислот порівняно з другим пасажем (табл. 77, рис. 137). Якісний склад та кількісний вміст вільних жирних кислот суттєво змінився, особливо кількісний. Звертає на себе увагу те, що на

77. Вільні жирні кислоти мікобактерій, % від суми

Вільна жирна кислота	Код	Пасаж	
		2-й	21-й
Лауринова	C _{12:0}	0,41±0,15	0,23±0,05
Тридеканова	C _{13:0}	0,25±0,12	0,15±0,09
Міристинова	C _{14:0}	0,41±0,10	0,15±0,10
Пентадеканова	C _{15:0}	0,36±0,13	0,18±0,05
Пальмітолеїнова	C _{16:1}	0,99±0,32	0,55±0,10
Пальмітинова	C _{16:0}	18,87±0,98	32,75±1,42**
Маргарінова	C _{17:0}	1,27±0,20	0,71±0,33
Олеїнова	C _{18:1}	27,18±1,43	33,88±1,18**
Стеаринова	C _{18:0}	11,75±0,59	17,90±0,90**
Лінолева + ліноленова	C _{18:2+} C _{18:3}	2,79±0,85	2,62±0,89
Нонадеканова	C _{19:0}	2,31±0,50	3,65±0,69
Арахінова	C _{20:0}	2,68±0,37	сліди
Генейкозанова	C _{21:0}	5,13±0,43	2,57±0,84
Бегенова	C _{22:0}	5,21±0,49	1,52±0,74*
Трикозанова	C _{23:0}	3,31±0,57	0,18±0,09**
Тетракозанова	C _{24:0}	2,90±0,81	0,50±0,33
Пентакозанова	C _{25:0}	12,72±1,05	2,02±0,77**
Гексакозанова	C _{26:0}	1,46±0,46	0,44±0,28
Гептакозанова	C _{27:0}	сліди	сліди
Σ ненасичених		30,96±1,39	37,05±1,29**
Σ насичених		69,04±1,40	62,95±1,38**

тлі значного зниження вільних жирних кислот мікобактерій, які багаторазово пересівалися, вміст таких кислот, як пальмітинова, олеїнова, стеариннова суттєво підвищився.

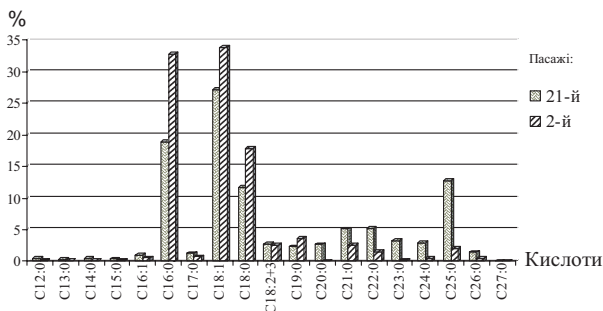


Рис. 137. Вільні жирні кислоти мікобактерій штаму *Vallee*, % від суми

Виявлені динамічні зміни ліпідного складу мікобактерій еталонного штаму *Vallee* могли певною мірою вплинути на ступінь вірулентності пасажованих мікобактерій. Для перевірки цієї думки провели біологічну пробу на морських свинках з використанням міко-

бактерій культури штаму *Vallee* другого пасажу. Встановлено, що мікобактерії стимулювали підвищену чутливість сповільненого типу у тварин, розвиток туберкульозних уражень та загибель на 46–51 добу дослідження (табл. 78).

78. Сенсibiliзувальні та вірулентні властивості мікобактерій штаму *Vallee* 2 та 21-го пасажів

Пасаж штаму <i>Vallee</i>	№ морської свинки	Алергічне дослідження, доба ¹			Тривалість досліду, днів	Специфічні ураження ²				Індекс ураження
		20	30	60		лімфатичні вузли	селезінка	печінка	легені	
2	33	+	+	-	46	++	++	-	++	14
	34	+	+	-	51	++	++	-	++	14
21	35	+	+	+	65	+	++	-	++	13
	36	+	+	+	62	++	++	-	++	14

¹Результат: (+) – позитивний; (-) – негативний.
²Для специфічних уражень: (+) – поодинокі вогнища; (++) – декілька вогнищ; (+++) – численні, рідко розташовані вогнища.

Після зараження морських свинок мікобактеріями штаму *Vallee* 21 пасажу розвивалися подібні процеси, але загибель відмічена на 65–62 добу дослідження.

Протягом досліду в морських свинок спостерігали схуднення, виразку на місці введення завису мікобактерій, яка не загоювалася.

На розтині загиблих піддослідних тварин виявили ураження внутрішніх органів, характерні для туберкульозу. У всіх морських свинок реєстрували збільшення лімфатичних вузлів, селезінки, печінки, легень. Крім того, легені та селезінка містили різну кількість вогнищ. У регіонарних лімфатичних вузлах морських свинок, заражених вихідною культурою (№ 33, 34), виявили казеоз.

Отже, багаторазове пасажування штаму *Vallee* призвело до статистично вірогідного зниження синтезу загальних ліпідів, ефірів стеринів та невірогідного – фракції фосфоліпідів і до статистично вірогідного збільшення кількості коротколанцюгових (C_{12:0}–C_{20:0}) та ненасичених жирних кислот. Суттєво знизився вміст довголанцюгових (C_{21:0}–C_{27:0}) вільних жирних кислот до одноразового підвищення базових – пальмітинової, олеїнової та стеаринової кислот. Останнє свідчить про адаптивні метаболічні процеси мікобактерій.

Проте біологічні дослідження мікобактерій на морських свинках не виявили суттєвої зміни вірулентності багаторазово пасажованих мікобактерій штаму *Vallee*, хоча й відмічено більш віддалені строки загибелі морських свинок, заражених мікобактеріями 21 пасажу.

Одержані результати з дослідження впливу тривалості пасажування мікобактерій штаму *Vallee* на ліпідний склад, вірулентні й сенсibiliзувальні властивості обґрунтували наступні дослідження, за таким самим методичним підходом, *M. bovis* швидкорослого штаму, накопичених на такому ж середовищі.

Вплив багаторазового пасажування *M. bovis* епізоотичного швидкорослого штаму через щільне живильне середовище з рН 6,5 на ліпідний склад, сенсibiliзувальні та вірулентні властивості. З метою вивчення впливу багаторазового пасажування на ліпідний склад *M. bovis* швидкорослого музейного штаму використали культуру, пасажовану 2, 40 та 80 разів і накопичену на середовищі з рН 6,5.

Дослідженнями встановлено, що на 80 пасажі кількість загальних ліпідів зменшилася в 1,26 та 1,37 раза порівняно з 2 та 40-м пасажами відповідно (табл. 79).

79. Загальні ліпіди мікобактерій

Показник	Пасаж		
	2-й	40-й	80-й
Загальні ліпіди, % на наважку	8,05±0,20	8,75±0,84	6,40±0,83

Після розподілу загальних ліпідів на фракції методом ТШХ у динаміці пасажів встановили послідовне збільшення вмісту діацилгліцеролів, стеринів, вільних жирних кислот (табл. 80).

80. Склад ліпідів мікобактерій, % від суми

Фракція загальних ліпідів	Пасаж		
	2-й	40-й	80-й
Фосфоліпіди	27,97±0,26	23,93±0,95*	24,34±0,85*
Діацилгліцероли	12,54±0,27	15,34±0,45**	19,05±0,37***
Стерини	12,23±0,20	18,40±0,39***	16,93±0,78**
Вільні жирні кислоти	14,47±0,23	17,18±0,51**	16,40±0,46*
Триацилгліцероли	18,32±0,16	12,88±0,82**	12,17±0,59***
Ефіри стеринів	14,47±0,24	12,27±0,39**	11,11±0,67**
Σ ліпідів	100	100	100

Того ж часу відмічено тенденцію до поступового зниження кількості фракцій триацилгліцеролів, ефірів стеринів та фосфоліпідів.

ГРХ-аналізом фракції вільних жирних кислот у досліджуваних мікобактерій виявлено велику кількість насичених жирних кислот, поступове зростання яких спостерігалось зі збільшенням кількості пасажів, і в основному за рахунок пальмітинової кислоти (табл. 81, рис. 138), чого не відмічалось в дослідженні мікобактерій штаму *Vallee*, хоча вміст пальмітинової кислоти так само підвищувався.

Отримані дані можливо свідчать про те, що, по-перше, досліджувані мікобактерії відрізняються за біологічними властивостями, по-друге – рН сере-

81. Вільні жирні кислоти мікобактерій, % від суми

Вільна жирна кислота	Код	Пасаж		
		1-й	40-й	80-й
Лауринова	C _{12:0}	0,04±0,02	0,10±0,03	0,05±0,03
Тридеканова	C _{13:0}	0,10±0,02	0,05±0,02	0,22±0,05
Міристинова	C _{14:0}	0,27±0,04	0,28±0,09	0,22±0,08
Пентадеканова	C _{15:0}	0,22±0,02	0,28±0,13	0,17±0,08
Пальмітолеїнова	C _{16:1}	0,55±0,07	0,65±0,29	0,26±0,10
Пальмітинова	C _{16:0}	19,62±0,53	21,82±0,89	30,35±0,95***
Маргарінова	C _{17:0}	0,81±0,07	0,47±0,33	0,70±0,19
Олеїнова	C _{18:1}	23,87±0,60	24,76±1,16	23,37±0,70
Стеаринова	C _{18:0}	7,42±0,11	28,72±1,57***	25,72±1,79***
Лінолева + ліноленова	C _{18:2} + C _{18:3}	2,97±0,16	1,49±0,57	1,86±0,68
Нонадеканова	C _{19:0}	3,34±0,06	2,52±1,02**	1,60±0,74**
Арахінова	C _{20:0}	5,23±0,14	1,18±0,58**	0,63±0,32***
Генейкозанова	C _{21:0}	6,74±0,23	2,59±0,82**	1,74±0,77**
Бегенова	C _{22:0}	5,78±0,18	1,98±0,81**	2,11±0,64**
Трикозанова	C _{23:0}	5,89±0,35	0,99±0,60**	1,09±0,66**
Тетракозанова	C _{24:0}	5,57±0,19	2,33±0,83*	1,28±0,62**
Пентакозанова	C _{25:0}	7,43±0,26	8,98±1,18	7,93±1,13
Гексакозанова	C _{26:0}	2,53±0,30	0,81±0,48*	0,70±0,44*
Гептакозанова	C _{27:0}	1,62±0,19	сліди	сліди
∑ ненасичених		27,39±0,44	26,90±1,94	25,49±2,16
∑ насичених		72,61±0,50	73,10±1,05	74,51±1,50

довище визначає (впливає) адаптивну спроможність мікобактерій. Звичайно, штами мікобактерій, що вивчаються, принципово відрізняються між собою: *Vallee* – значно давні та повільнорослі порівняно з традиційними, описаними

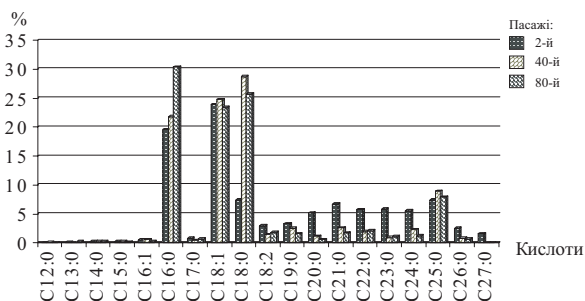


Рис. 138. Вільні жирні кислоти у швидкорослого штаму *M. bovis*, % від суми

ми в цій роботі раніше властивостями; швидкорослі – представники нової сучасної раси мікроорганізмів досліджуваного виду.

Саме тому, напевно, відмічаються досить різні показники ліпідів клітинної стінки мікобактерій.

Можливо, зниження вмісту ненасичених

вільних жирних кислот у динаміці пересівів підтверджує про оптимальність живильного середовища для метаболічних процесів мікроорганізму швидко-рослого штаму. На цьому тлі знижувався вміст ненасичених жирних кислот. Мінімальну їх кількість виявлено на 80 пасажі. Відзначається переважання олеїнової кислоти серед ненасичених жирних кислот у всіх досліджуваних мікобактеріях.

Багаторазове пасажування суттєво впливало на співвідношення коротколанцюгових (C_{12} – C_{20}) та довголанцюгових кислот (C_{21} – C_{27}) (рис. 139). Коротколанцюгові кислоти переважали над довголанцюговими зі збільшенням кількості пасажів мікроорганізмів.

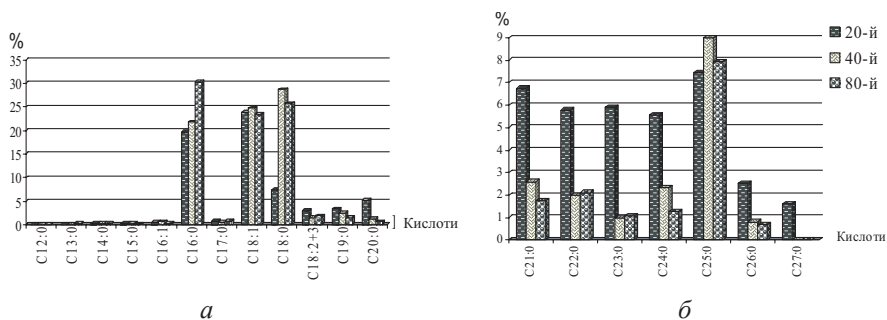


Рис. 139. Жирні кислоти у *M. bovis* швидко-рослого штаму, % від суми: а – коротколанцюгові; б - довголанцюгові

На 2-му пасажі в *M. bovis* швидко-рослого штаму сумарна кількість довголанцюгових кислот з непарним числом атомів вуглецю дорівнювала 21,68 %, а на 40 та 80 пасажах (зразки 2, 3) цей показник зменшився в 1,73 та 2,01 раза відповідно, що може свідчити про деякі зміни біологічних властивостей збудника під впливом складу живильного середовища та тривалого пасажування.

Відзначимо, що основну частину пулу ВЖК становила довголанцюгова пентакозанова кислота у всіх досліджуваних зразках.

Отже, зниження кількості загальних ліпідів, фракцій фосфоліпідів, триацилгліцеролів та ефірів стеринів, яке спостерігалось у швидко-рослого штаму *M. bovis*, подібне змінам їх кількості в мікобактерій штаму *Vallee* за багаторазового пасажування. Відмічено й тенденцію до зниження кількості ненасичених жирних кислот на користь насичених.

З літературних даних відомо (Бондаренко Б.Н., 1973), що фосфоліпіди є пусковою точкою при розвитку патологічних процесів, а триацилгліцероли послаблюють резистентність макроорганізму до дії збудника туберкульозу (Дикий І.Л. й співавт., 2004). Виходячи з цього, можна зробити припущення, що зменшення згаданих фракцій (довголанцюгових вільних жирних кислот) у разі збільшення кількості пасажів призводить до зниження вірулентності даного штаму.

З метою перевірки цього припущення паралельно були проведені біологічні дослідження на морських свинках, кожна з яких заражали пасажованими мікобактеріями (2, 40, 80 разів) у дозі 1 мг/см³ фізіологічного розчину.

У всіх піддослідних тварин спостерігали виразку, яка не загоювалася протягом досліду, а також схуднення в середньому на 10–15 % щодоби з часу появи виразки.

Туберкулізацією, яку провели на 20 добу, виявлено одну реагуючу морську свинку, заражену мікобактеріями 40 пасажу (№ 37). Проте на 30 добу після зараження у всіх піддослідних тварин спостерігали специфічну реакцію на введення туберкуліну. Дослідження на 60 добу також виявили в морських свинок за номерами 37, 38, 40 алергічну реакцію, на відміну від тварини № 39, яка була заражена культурою мікобактерій 80 пасажу й не реагувала на діагностикум (табл. 82).

82. Сенсibiliзувальні та вірулентні властивості пасажованих мікобактерій

рН живильного середовища	№ пасажу	№ морської свинки	Алергічне дослідження, доба ¹			Тривалість досліду, дб	Специфічні ураження ²				Індекс ураження
			20	30	60		лімфатичні вузли	селезінка	печінка	легені	
6,5	2	23	–	+	–	36	++	+++	–	+++	20
		24	–	+	–	38	++	++	–	+++	18
	40	37	+	+	+	58	++	++	–	+++	18
		38	–	+	+	47	++	+++	–	+++	20
	80	39	–	+	–	85	++	+++	–	++	16
		40	–	+	+	90	++	++	–	++	14

Тут і в табл. 90:
¹Результат: (+) – позитивний; (–) – негативний.
²Для специфічних уражень: (+) – поодинокі вузлики; (++) – декілька вузликів; (+++) – численні, рідко розташовані вузлики.

Мікобактерії 40 пасажу викликали загибель морських свинок № 37, 38 на 27–38 добу відповідно раніше, ніж мікобактерії 80 пасажу, при цьому одна з останніх тварин (№ 39) загинула, а іншу (№ 40) було евтаназовано наприкінці досліду. Підкреслимо, що мікобактерії вихідної субкультури зумовили загибель піддослідних тварин у 1,5–2,0 рази швидше, ніж такі 40 та 80 пасажів відповідно.

За патолого-анатомічного дослідження внутрішніх органів у всіх тварин виявили характерні для туберкульозу зміни, які найінтенсивніше були виражені у морських свинок, заражених мікобактеріями 2–40-го пасажів.

У всіх тварин виявили ущільнені регіональні лімфатичні вузли, які містили казеоз. Легені та селезінка піддослідних тварин були збільшеними, містили ту чи іншу кількість різних за розмірами вузликів.

Дослід стверджує, що збільшення кількості пасажів мікобактерій, культивованих на живильному середовищі з рН 6,5, призводить до зниження вірулентності, що, певно, обумовлено зниженням умісту загальних ліпідів, фосфоліпідів, триацилгліцеролів, ефірів стеринів та підвищенням діацилгліцеролів, стеринів та вільних жирних кислот. Проте більш ймовірним, що впливає на вірулентність мікроорганізму, є зниження довголанцюгових вільних жирних кислот. Повідомляється, що зниження їх умісту на тлі зростання коротколанцюгових ВЖК свідчить про перебудовні процеси метаболізму, які, безумовно, спрямовані на збереження, в певних умовах перебування, мікобактерій як виду.

Отже, багаторазове пасажування на яєчному живильному середовищі з рН 6,5 призводить до змін ліпідного складу і, як наслідок, зниження вірулентності мікобактерій досліджуваного штаму.

Вплив наступних багаторазових пасажів на ліпідний склад M. bovis. Без сумніву фенотипові зміни мікобактерій, структури й форми колоній, про які повідомлялося в попередньому матеріалі, зумовлені адаптивними процесами фізіологічних властивостей, які визначаються хімічною будовою, зокрема ліпідами. Кількісний вміст та якісний склад останніх, під впливом різних чинників, як наголошують дослідники, суттєво змінюється, визначаючи ступінь адаптивної здатності до виживання в навколишньому середовищі, а звідси й антигенні, сенсibiliзувальні та вірулентні властивості, тобто біологічну активність мікобактерій того чи іншого штаму.

У зв'язку з цим, одержавши досить цікаві, але неоднозначні результати пасажування через щільне живильне середовище мікобактерій швидкорослого штаму, необхідними виявилися подальші досліді з вивчення можливих змін їх ліпідного складу.

Ліпідний склад M. bovis швидкорослого штаму в динаміці багаторазового пасажування через щільне живильне середовище з рН 6,5. Це дослідження є послідовним продовженням попередньої роботи з дослідження ліпідного складу цього штаму мікобактерій від 2 до 80-го пасажу. Звичайно, що для більшої аргументації та переконливості результатів досліджень того чи іншого явища в часі необхідна якомога більша тривалість досліді, урахування вихідного рівня тих чи інших показників, у нашому випадку показників ліпідного складу мікобактерій перших пасажів через таке ж саме штучне живильне середовище (рН 6,5).

Тому для порівняння змін ліпідного складу пасажованих мікобактерій 130 та 150 разів нами використані тільки відповідні вихідні дані попередніх досліджень ліпідів (другий пересів) мікроорганізмів материнської субкультури.

Результати досліджень засвідчили тенденцію загальних ліпідів мікобактерій до подальшого зниження в динаміці пасажів. Як видно з *табл. 83*, у міко-

бактерій другого пасажу рівень вмісту загальних ліпідів виявився достовірно вищим, ніж у пасажованих 130 та 150 разів, або в 2,0 та 2,2 раза відповідно нижчим, ніж у вихідного рівня. *Рис. 140* наочно демонструє отримані дані.

83. Загальні ліпіди в *M. bovis*, % на наважку

Показник	Пасаж		
	2-й	130-й	150-й
Загальні ліпіди	8,05±0,20	3,90±0,55**	3,66±0,42***

Розподіл загальних ліпідів на фракції у *M. bovis*, пасажованих 130 та 150 разів, порівняно з другим пересівом, виявив динамічні зміни (*табл. 84*). Значимо, що це стосується усіх досліджень шести фракцій. Динаміка зрушень виявилася неоднозначною: вміст одних фракцій підвищувався, інших знижувався.

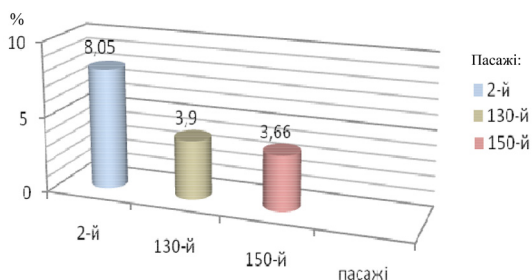


Рис. 140. Загальні ліпіди M. bovis, % на наважку

Так, рівень фосфоліпідів, триацилгліцеролів, ефірів стеринів достовірно знизився порівняно з вихідними даними, відповідно в 1,2; 1,3 та 1,2 раза, а діацилгліцеролів, стеринів, вільних жирних кислот достовірно підвищився – відповідно в 1,5; 1,4 та 1,1 раза.

Для переконливості ці дані наведені на *рис. 141*. Хоча в цілому фракція вільних жирних кислот у динаміці пасажів *M. bovis* мала тенденцію до підвищення їх рівня, проте якісний склад і кількісний вміст суттєво достовірно змінилися (*табл. 85*).

Так, якщо *M. bovis* вихідного варіанта вміщували на діагностичному рівні 19 вільних жирних кислот, то на 130 пасажі їх зменшилося до 14, а на 150 – до 10.

84. Фракційний склад ліпідів у пасажованих *M. bovis*, % від суми

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

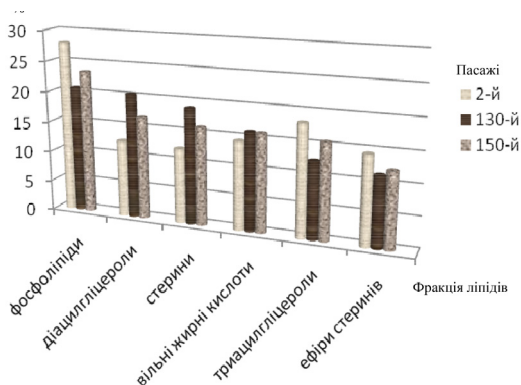


Рис.141. Динаміка вмісту фракцій ліпідів *M. bovis*

тево підвищився на 130–150 пасажах порівняно з вихідним другим пасажем у 1,4; 1,5 та 1,6 раза відповідно.

Одержані дані свідчать про те, що пасажі *M. bovis* через штучне живильне середовище з рН 6,5 суттєво впливають на кількісний вміст і якісний склад вільних жирних кислот та змінюють біологічну активність мікроорганізму.

85. Вільні жирні кислоти в мікобактерії, % від суми

Вільна жирна кислота	Код	Пасаж		
		2-й	130-й	150-й
1	2	3	4	5
Лауринова	C _{12:0}	0,04±0,02	0,10±0,06	сліди
Тридеканова	C _{13:0}	0,10±0,02	0,15±0,08	-
Міристинова	C _{14:0}	0,27±0,04	0,51±0,30	сліди
Пентадеканова	C _{15:0}	0,22±0,02	0,33±0,23	сліди
Пальмітолеїнова	C _{16:1}	0,55±0,07	1,63±0,21*	0,08±0,05**
Пальмітинова	C _{16:0}	19,62±0,53	26,43±1,01**	28,97±0,91***
Маргаринаова	C _{17:0}	0,81±0,07	3,05±0,4**	0,91±0,07
Олеїнова	C _{18:1}	23,87±0,60	44,72±1,55***	27,16±0,55*
Стеаринова	C _{18:0}	7,42±0,11	10,57±0,64**	13,58±0,52***
Лінолева + ліноленава	C _{18:2 + C_{18:3}}	2,97±0,16	3,86±0,02**	8,96±0,57*
Нонадеканова	C _{19:0}	3,34±0,06	1,22±0,07***	1,13±0,36**
Арахінова	C _{20:0}	5,23±0,14	сліди	сліди
Генейкозанова	C _{21:0}	6,74±0,23	2,14±0,03***	3,39±0,38**
Бегенова	C _{22:0}	5,78±0,18	3,17±0,01***	10,17±0,54**

1	2	3	4	5
Трикозанова	C _{23:0}	5,89±0,35	-	сліди
Тетракозанова	C _{24:0}	5,57±0,19	-	сліди
Пентакозанова	C _{25:0}	7,43±0,26	2,12±0,02***	5,65±0,65
Гексакозанова	C _{26:0}	2,53±0,30	-	-
Гептакозанова	C _{27:0}	1,62±0,19	-	-
∑ ненасичених		27,39±0,44	50,21±1,80***	36,20±0,70***
∑ насичених		72,61±0,50	49,79±1,70***	63,80±0,75***
∑ коротколанцюгових		64,44±0,61	92,57±0,53	80,79±0,50
∑ довголанцюгових		35,56±0,47	7,43±0,40	19,21±0,32
<ol style="list-style-type: none"> 1. C_{A:0} – насичена жирна кислота (A – кількість атомів вуглецю). 2. C_{A:H} – ненасичена жирна кислота (H – кількість подвійних зв'язків). 3. Сліди – наявність кислоти менше 0,01 %. 				

Адаптивні фізіологічні процеси мікробної клітини зумовлюють зміни у співвідношенні суми насичених та ненасичених вільних жирних кислот (рис. 142).

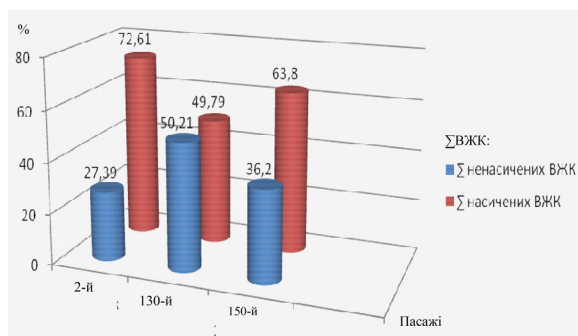


Рис. 142. Співвідношення ненасичених та насичених вільних жирних кислот

Переконуємося, що численні пасажі суттєво вплинули на збільшення вмісту ненасичених та зменшення насичених кислот. Якщо перших на початку досліджень вміщувалося 27,39 %, то на 130–150 пасажах – 43,2 %, що в 1,6 раза більше, ніж у мікобактерій вихідного варіанта.

Підвищення вмісту ненасичених вільних жирних кислот може свідчити про посилення адаптивних фізіологічних процесів мікробної клітини в несприятливих умовах, зокрема постійних багаторазових пересівів. Хоча, зазначимо, це досить умовний висновок оскільки вивчення в попередньому підрозділі характеру колоній та швидкості розмноження на середовищах з різним значенням рН свідчить про досить оптимальні умови середовища з рН 6,5 для розмноження мікобактерій. Однак, напевно, такий факт обмежений потенціальною здатністю, так як зі 120 пересіву мікобактерій втратили вихідну властивість – швидко розмножуватися.

Вочевидь, відмічені та аналізовані показники ліпідного складу мікобактерій в динаміці численних пересівів взаємопов'язані і спрямовані на пристосування до тих чи інших умов, тобто на виживання в біологічному світі як виду.

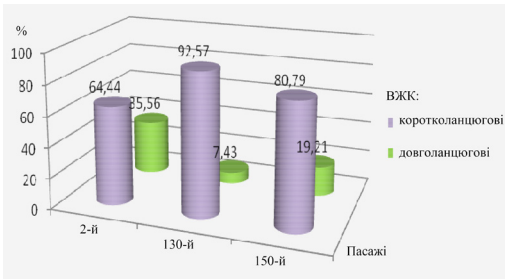


Рис. 143. Співвідношення коротко- та довголанцюгових вільних жирних кислот

цих кислот у вихідному зразку мікобактерій становило 1:0,55, то в пасажованих 130 та 150 разів – 1:0,15. Без сумніву, зниження вмісту довголанцюгових вільних жирних кислот на тлі підвищення вмісту коротколанцюгових не тільки підтверджує наявність перебудовчих адаптивних фізіологічних процесів у мікробній клітині, але й зниження ступеня вірулентності досліджуваних мікобактерій.

Дослідження темпу зниження (підвищення) вмісту вільних жирних кислот. Водночас динамічні зміни вмісту вільних жирних кислот протягом тривалих багаторазових пасажів через штучне живильне середовище значною мірою залежать від інтенсивності перебудовчих адаптивних процесів мікобактерій. Зокрема, що стосується швидкості розмноження мікобактерій на штучному живильному середовищі. До 123 пересіву *M. bovis* досліджуваного штаму формували колонії на другу–третю добу з часу висіву завису мікобактерій з наступним сповільненням характеризованої властивості, тобто на 8–15 добу культивування. У зв'язку з цим доцільним виявився аналіз даних тенденції до підвищення або ж зниження вмісту вільних жирних кислот.

Результати засвідчили (табл. 86), що швидкість розмноження мікобактерій тісно пов'язана з темпом зміни вмісту вільних жирних кислот. Так, до 130 пасажу практично всі (крім $C_{19:0}$, $C_{20:0}$) коротколанцюгові кислоти ($C_{12:0}$ – $C_{18:2}$ + $C_{18:3}$) мали тенденцію до підвищення з темпом за кожного пасажу 0,026; довголанцюгові, навпаки, характеризувалися тенденцією до зниження зі середнім темпом – 0,14, тобто темп зниження останніх виявився інтенсивнішим у 5,38 раза, порівняно з темпом підвищення вмісту коротколанцюгових вільних жирних кислот.

На стадії сповільнення процесу розмноження мікобактерій від 131 до 150 пересіву, на відміну від попередньої (2–130) відмічено, порушення виявленої закономірності щодо підвищення та зниження вмісту вільних жирних кислот. Так, вміст коротколанцюгових кислот у переважній більшості (8 із 12) почав знижуватися з темпом за кожного пасажу 0,139, інших трьох ($C_{16:0}$; $C_{18:0}$; $C_{18:2}+C_{18:3}$) продовжував підвищуватися з темпом 0,177, а вміст тільки арахінової жирної кислоти стабільно лишався на мінімальному, у вигляді слі-

У цьому пересвідчують аналітичні дані про співвідношення коротко- та довголанцюгових вільних жирних кислот у пасажованих *M. bovis* (рис. 143). Зі збільшенням кількості пересівів у мікобактерій суттєво знижується вміст довголанцюгових і підвищується вміст коротколанцюгових вільних жирних кислот. Так, якщо співвідношення

86. Темп зниження (підвищення) вмісту вільних жирних кислот мікобактерій тривалопасажованого штаму

Вільна жирна кислота	Код	Темп, %	
		від 2 до 130	від 131–150
Лауринова	C _{12:0}	0,00046	0,00495
Тридеканова	C _{13:0}	0,0003	0,007
Міристинова	C _{14:0}	0,001	0,025
Пентадеканова	C _{15:0}	0,0008	0,016
Пальмітолеїнова	C _{16:1}	0,008	0,077
Пальмітинова	C _{16:0}	0,052	0,127
Маргарінова	C _{17:0}	0,017	0,107
Олеїнова	C _{18:1}	0,160	0,878
Стеаринова	C _{18:0}	0,024	0,150
Лінолева + ліноленова	C _{18:2} + C _{18:3}	0,006	0,255
Нонадеканова	C _{19:0}	0,016	0,004
Арахінова	C _{20:0}	0,040	-
Генейкозанова	C _{21:0}	0,035	0,062
Бегенова	C _{22:0}	0,020	0,35
Трикозанова	C _{23:0}	0,45	-
Тетракозанова	C _{24:0}	0,42	-
Пентакозанова	C _{25:0}	0,040	0,176
Гексакозанова	C _{26:0}	0,019	-
Гептакозанова	C _{27:0}	0,012	-
Середнє		0,069	0,159
∑ ненасичених		0,175	0,700
∑ насичених		0,175	0,700
∑ коротколанцюгових	C _{12:0} + C _{20:0}	0,216	0,589
∑ довголанцюгових	C _{21:0} + C _{27:0}	0,216	0,589

1. C_{A:0} – насичена жирна кислота (A – кількість атомів вуглецю);
 2. C_{A:H} – ненасичена жирна кислота (H – кількість подвійних зв'язків);
 3. Сліди – наявність кислоти менше 0,01 %.

дів, рівні (менше 0,01 %). При цьому темп зниження виявився в 5,35 разів інтенсивнішим, ніж підвищення (0,026), у період між другим і 130 пересівами мікобактерій.

Між довголанцюговими жирними кислотами також відмічена зміна тенденції: із семи, вміст яких протягом 130 пасажів поступово знижувався, із зникненням деяких кислот взагалі, три (42,85 %) зі 131 по 150 пасажів почали порушувати свій вміст у бік підвищення зі середнім темпом 0,196, рівень вмісту інших продовжував зберігатися на мінімальному недіагностичному рівні.

Отже, в процесі пасажування швидкорослого штаму *M. bovis* на ячному живильному середовищі з рН 6,5 було виявлено зміни як у загальному, так і у фракційному складі ліпідів та вільних жирних кислот.

Зі зміною швидкості розмноження мікобактерій суттєво змінюються напрям тенденції та темп зниження чи підвищення вмісту вільних жирних кислот.

Відмічені та аналізовані показники ліпідного складу в динаміці численних пересівів взаємопов'язані і спрямовані на пристосування до тих чи інших умов, тобто на виживання в біологічному світі мікобактерій як виду.

Таким чином, численні пасажі призвели до вірогідного зниження вмісту загальних ліпідів, фракцій фосфоліпідів, триацилгліцеролів та ефірів стеринів. Проте збільшилася кількість діацилгліцеролів, стеринів та вільних жирних кислот. За такого сповільнення розмноження мікобактерій супроводжувалося суттєвою зміною напряму тенденції та темпом зниження чи підвищення вмісту вільних жирних кислот як коротко-, так і довголанцюгових.

Безумовно, щоб зрозуміти ці процеси, необхідними виявилися дослідження мікобактерій цього ж швидкорослого штаму з таким самим методологічним підходом, але культивованих та накопичених на середовищі, як і в попередньому досліді, тільки з рН 7,1–7,2.

Вплив багаторазового пасажування M. bovis епізоотичного швидкорослого штаму через щільне живильне середовище з рН 7,1 на ліпідний склад, сенсibiliзувальні та вірулентні властивості. Оскільки мікобактерії досліджуваного швидкорослого штаму з 20-го пасажу через середовище з рН 7,1–7,2 втратили здатність швидкого розмноження і почали формувати колонії на 8–14 добу після посіву, кількість пасажів зменшилася практично у два рази порівняно з кількістю пасажів мікобактерій швидкорослого штаму, які проводилися через середовище з рН 6,5.

У результаті проведених досліджень виявили зниження кількості загальних ліпідів швидкорослого штаму *M. bovis* на 40 та 59-му пасажах в 1,35 та 1,16 рази, ніж з мікобактеріями другого пасажу (табл. 87).

87. Загальні ліпіди мікобактерій

Показник	Пасаж		
	2-й	40-й	59-й
Загальні ліпіди, % на наважку	15,13±0,30	11,25±0,37**	13,10±0,67

Зі збільшенням кількості пасажів зареєстровано поступове зменшення полярних ліпідів, а саме, фракції фосфоліпідів; із нейтральних ліпідів також зменшився вміст фракцій триацилгліцеролів та ефірів стеринів. Того часу кількість інших фракцій нейтральних ліпідів (діацилгліцероли, стерини та вільні жирні кислоти) збільшилась (табл. 88).

Під час аналізу якісного складу вільних жирних кислот мікобактерій 2-го пасажу відмічено (табл. 89) відсутність трьох кислот ($C_{17:0}$; $C_{18:0}$; $C_{23:0}$), 40-го пересіву – трьох ($C_{12:0}$; $C_{20:0}$; $C_{27:0}$), 59-го пересіву – теж трьох ($C_{20:0}$; $C_{23:0}$; $C_{27:0}$) з 19 досліджених. Показовим цих досліджень є й те, що зі збільшенням кількості

88. Склад ліпідів мікобактерій (ТШХ-аналіз), % від суми

Фракція загальних ліпідів	Пасаж		
	2-й	40-й	59-й
Фосфоліпіди	26,18±0,25	21,38±0,84**	20,59±1,49*
Діацилгліцероли	15,14±0,22	16,98±0,58*	17,60±1,67
Стерини	13,56±0,31	17,61±1,10*	19,85±1,03**
Вільні жирні кислоти	14,20±0,25	16,98±0,60*	16,86±1,18
Триацилгліцероли	16,72±0,32	14,47±0,57*	14,23±0,61*
Ефіри стеринів	14,20±0,25	12,58±0,48*	10,87±1,00*
Σ ліпідів	100	100	100

кості пересівів мікобактерій тенденційно зникають довголанцюгові вільні жирні кислоти. Утім уміст окремих довголанцюгових вільних жирних кислот на такому тлі динамічно підвищується. Це, зокрема, стосується бегенової (C_{22:0}) та пентакозанової (C_{25:0}) кислот.

89. Вільні жирні кислоти мікобактерій, % від суми

Вільна жирна кислота	Код	Зразок		
		2-й	40-й	59-й
Лауринова	C _{12:0}	0,01±0,004	сліди	0,16±0,10
Тридеканова	C _{13:0}	0,07±0,01	0,07±0,03	0,69±0,07***
Міристинова	C _{14:0}	0,16±0,02	0,52±0,38	0,41±0,17
Пентадеканова	C _{15:0}	0,16±0,04	0,28±0,12	0,46±0,17
Пальмітинова	C _{16:0}	30,52±0,45	24,71±0,65**	29,19±1,78
Маргарінова	C _{17:0}	сліди	0,69±0,14	0,92±0,24
Стеаринова	C _{18:0}	сліди	8,77±0,64	10,10±0,84
Нонадеканова	C _{19:0}	0,73±0,05	0,60±0,11	0,73±0,23
Арахінова	C _{20:0}	3,38±0,27	сліди	сліди
Генейкозанова	C _{21:0}	1,16±0,23	0,56±0,18	0,55±0,32
Бегенова	C _{22:0}	0,18±0,05	3,97±0,28***	7,11±0,70***
Трикозанова	C _{23:0}	сліди	0,38±0,11	сліди
Тетракозанова	C _{24:0}	0,60±0,20	2,26±0,24**	1,28±0,52
Пентакозанова	C _{25:0}	4,84±0,29	6,47±0,53	7,43±0,62*
Гексакозанова	C _{26:0}	0,12±0,05	1,46±0,22**	0,59±0,32
Гептакозанова	C _{27:0}	0,09±0,03	сліди	сліди
Σ ненасичених		42,02±0,23	50,74±1,76**	59,62±1,32***
Пальмітолеїнова	C _{16:1}	0,87±0,04	1,38±0,24	1,28±0,28
Олеїнова	C _{18:1}	56,57±0,51	44,68±1,15***	34,97±1,61***
Лінолева + ліноленова	C _{18:2+} C _{18:3}	0,54±0,08	3,20±0,19***	4,13±0,96*
Σ ненасичених		57,98±0,43	49,26±1,47*	40,38±1,08***

Дослідженнями виявлено високий вміст насичених жирних кислот у мікобактерій усіх зразків, так само як і ненасичених.

Серед насичених жирних кислот мікобактерій відмічено суттєвий вміст пальмітинової, арахінової, генейкозанової на 2-му пасажі, тетракозанової, гексакозанової кислот на 40-му, маргаринової, стеаринової, бегенової, пентакозанової кислот на 59-му пасажах.

Серед ненасичених жирних кислот домінувала олеїнова кислота, особливо в мікобактерій 2-го пересіву.

Зі збільшенням кількості пасажів зростала кількість пентадеканової, маргаринової, стеаринової, бегенової, пентакозанової, лінолевої та ліноленої кислот, однак, на такому тлі поступово зменшувалася кількість арахінової, генейкозанової, гептакозанової та олеїнової кислот (рис. 144).

Загальна сума коротколанцюгових кислот (C_{12} – C_{20}) переважала над довголанцюговими (C_{21} – C_{27}), але їх співвідношення зменшувалось зі збільшенням кількості пасажів на користь довголанцюгових (рис. 145).

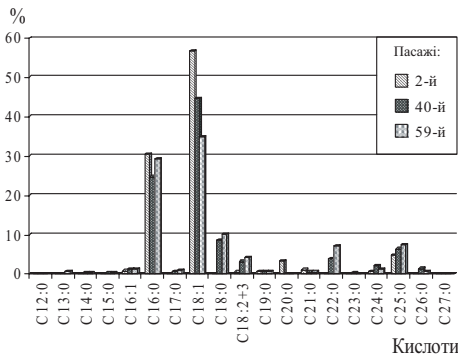


Рис. 144. Вільні жирні кислоти *M. bovis* швидкорослого штаму, % від суми

На 2-му пасажі *M. bovis* швидкорослого штаму сумарна кількість довголанцюгових кислот з непарним числом атомів вуглецю дорівнювала 6,09 %, а на 40 та 59 пасажах збільшилася в 1,2 та 1,3 раза, відповідно. Відзначимо, що основну частину пулу ВЖК становила довголанцюгова пентакозанова кислота в усіх досліджуваних мікобактерій, а в мікобактерій пасажів 40 та 59 – ще й бегенова.

Отже, яєчне живильне середовище з рН 7,1 сприяло накопичен-

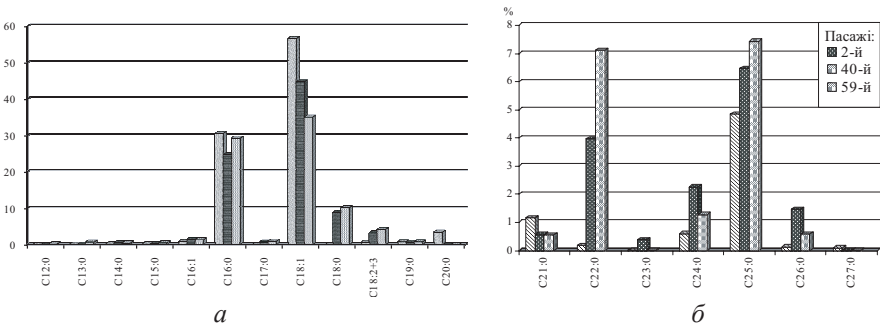


Рис. 145. Кількість жирних кислот у мікобактерій, % від суми: а – коротколанцюгових; б – довголанцюгових

ню загальних ліпідів у *M. bovis* швидкорослого штаму, але їх кількість за пасажування знижувалася.

Така ж тенденція характерна й для фосфоліпідів, триацилгліцеролів та ефірів стеринів, як і за багаторазового пасажування мікобактерій цього штаму на середовищі з рН 6,5. Про інтенсивність метаболічних процесів свідчить достатньо висока кількість вільних жирних кислот у всіх зразків мікобактерій.

За повідомленнями Т.В. Коронелли (1968), Л.Н. Пинчук, А.Л. Лазовской (1978), для мікобактерій характерно переважання насичених ВЖК. Підвищення рівня ненасичених жирних кислот має адаптивний характер і, можливо, є результатом механізму регуляції жирнокислотного складу і активації синтетазних систем у разі порушення рівня метаболізму. Досить суттєвий вміст ненасичених жирних кислот підкреслює, що показник рН 7,1–7,2 є несприятливим для росту та розмноження *M. bovis*. Проте зі збільшенням кількості пересівів мікобактерій досліджуваного штаму сума ненасичених вільних жирних кислот, лишаючись досить великою, все ж таки тенденційно знижується, що свідчить про вирівнювання метаболізму на користь нормалізації фізіологічних процесів мікробної клітини. Водночас зниження вмісту загальних ліпідів, фракцій фосфоліпідів та триацилгліцеролів указує, можливо, на те, що культура швидкорослого штаму *M. bovis* за пасажування через середовище з рН 7,1–7,2 поступово втрачає вірулентність.

З метою вивчення біологічної активності *M. bovis* швидкорослого штаму після багаторазового пасажування провели зараження морських свинок за загальноприйнятим методом.

У результаті встановлено, що алергічні реакції на діагностикум, на 20 добу після зараження, виявлені у морських свинок за винятком 41, 43, які були заражені культурами мікобактерій 40 та 59-го пасажів. У подальшому (друге дослідження) всі піддослідні тварини реагували на діагностикум, але під час третього дослідження в однієї морської свинки (№ 43), яка реагувала на два попередні введення алергену, не зафіксовано алергічної реакції (табл. 90). Звертає на себе увагу в цих дослідженнях те, що заражені *M. bovis* морські свинки то реагують на ППД-туберкулін для свавців, то не реагують. Це може свідчити про незвичайні біологічні властивості досліджуваних мікобактерій. Зазначимо, що таке явище відмічається незалежно від кількості пересівів, і може бути пов'язано з генетичними змінами, які відбулися за тривалої циркуляції збудника туберкульозу. У цьому випадку мікобактерії піддаються значному впливу захисних сил макроорганізму – різні ферменти, імуноглобуліни, що, без сумніву, змінює біологічну активність мікроорганізму та призводить до адаптації, яка супроводжується появою нових властивостей.

Водночас морські свинки, заражені мікобактеріями 59 пасажу загинули на 59–68 добу досліду, морська свинка № 41, заражена мікобактеріями 40 субкультури, загинула на 83 добу, а № 42, яка заражена цією ж субкультурою, була еванізована наприкінці досліду. У всіх тварин спостерігалось схуднення. Тривалість життя морських свинок, заражених мікобактеріями 40 та 59 пасажів, була довшою, ніж тварин, заражених вихідною субкультурою (2-й пасаж).

90. Сенсibiliзувальні та вірулентні властивості пасажованих мікобактерій

рН живильного середовища	№ пасажу	№ морської свинки	Алергічне дослідження, доба ¹			Тривалість досліду, діб	Специфічні ураження ²				Індекс ураження
			20	30	60		лімфатичні вузли	селезінка	печінка	легені	
7,1–7,2	2	9	+	+	–	49	++	+++	–	++	16
		10	+	+	–	57	++	+++	–	+++	20
	40	41	+	+	+	83	++	+++	–	++	16
		42	–	+	+	90	++	++	–	++	14
	59	43	+	+	–	59	++	+++	–	+++	18
		44	–	+	+	68	++	+++	–	++	16

За патолого-анатомічного дослідження у піддослідних тварин виявили зміни, характерні для туберкульозу. Спостерігали гіпертрофію печінки, селезінки, лімфатичних вузлів. Крім того, в легенях та селезінці було виявлено туберкульозні вогнища.

Отже, хоча живильне середовище з рН 7,1–7,2 й було сприятливим для біосинтезу суттєвої кількості загальних ліпідів мікобактерій, та все ж таки збільшення кількості їх пасажів призвело до зниження вмісту ліпідів; така сама тенденція характерна й для фракцій фосфоліпідів, триацилгліцеролів та ефіри стеринів. Зміни ліпідного складу спонукали до зниження вірулентності мікобактерій, що й підтверджують результати біологічних досліджень. У той же час зменшення вмісту ненасичених та коротколанцюгових жирних кислот у разі збільшення кількості пасажів указує на те, що культура швидкорослого штаму *M. bovis* згодом певною мірою пристосовується до умов культивування. Ці взаємопов'язані в мікробній клітині механізми за таких обставин можуть, імовірно, урівноважити метаболізм цієї морфологічної форми мікроорганізму або ж, змінюючись фено- й генотипово, дотримуючись попередньої тенденції, формувати расу нової популяції мікобактерій з відмінними біологічними властивостями.

Безумовно, чим триваліші досліди, тим об'єктивніші результати. Тому в продовження цих досліджень провели визначення ліпідів у мікобактерій 100–124 субкультур з використанням попередньо одержаних даних (59 пасаж).

Ліпідний склад *M. bovis*, сенсibiliзувальні та вірулентні властивості багаторазово (59, 100 та 124 рази) пасажованих через живильне середовище з рН 7,1–7,2. Вивчення ліпідного складу *M. bovis* різних пасажів проводили в порівняльному аспекті зразків (контроль – *M. bovis* 59 пасажу та дослід–100 і 124 пасажі культивували на щільному яєчному живильному середовищі з рН 7,1–7,2).

Встановлено (табл. 91), що *M. bovis* 100 пасажу містять невелику кількість загальних ліпідів, по відношенню до 59 пасажу (в 2,34 раза менше), а 124 пасажу – 4,1 % від суми, що в 3,2 раза менше.

91. Сумарні ліпіди *M. bovis*, % на наважку

Показник	Пасаж		
	59-й	100-й	124-й
Загальні ліпіди	13,10±0,67	5,60±0,77**	4,10±0,64***

Отже, суттєва кількість загальних ліпідів у вихідного повільнорослого штаму *M. bovis* може свідчити про більш високу вірулентність епізоотичного штаму, оскільки відомо, що вміст ліпідів обумовлює вірулентність мікобактерій. Однак це тільки попередні теоретичні дані, які (викладено нижче) легко спростовуються проведеною біологічною пробою.

Фракційний склад загальних ліпідів *M. bovis* характеризувався наявністю фосфоліпідів, діацилгліцеролів, стеринів, вільних жирних кислот, триацилгліцеролів та ефіри стеринів (табл. 92). Полярні ліпіди (фосфоліпіди) вміщуються на рівні від 20,59 % у культурі мікобактерій 59 пасажу, до 22,09 % – у такій 124 пасажу. Тобто зі збільшенням кількості пасажів вміст аналізованої фракції ліпідів має тенденцію збільшуватися. Подібне спостерігалось і з фракцією ефіри стеринів: з 10,87 % у вихідної культури до 15,68 % у пасажованої 124 рази, або в 0,69 раза більше, ніж у 59 пасажі.

92. Фракції загальних ліпідів *M. bovis*, % від суми

Фракція	Пасаж		
	59-й	100-й	124-й
Фосфоліпіди	20,59±1,49	21,29±0,41	22,09±0,57
Діацилгліцероли	17,60±1,67	15,55±0,28	14,96±0,23
Стерини	19,85±1,03	14,59±0,23**	14,96±0,23**
Вільні жирні кислоти	16,86±1,18	15,55±0,28	15,92±0,17
Триацилгліцероли	14,23±0,61	16,99±0,11*	16,39±0,40*
Ефіри стеринів	10,87±1,00	16,03±0,67*	15,68±0,41*
∑ ліпідів	100	100	100

Вміст діацилгліцеролів, стеринів та вільних жирних кислот, навпаки, мав тенденцію до поступового зменшення, а саме:

– діацилгліцероли у 100 пасажі становили 15,55 %, у 124 пасажі – 14,96 %, що в 1,13 та 1,17 раза менше, ніж у 59 пасажі (17,60 %) відповідно;

– стерини – у 100 пасажі – 14,59 %, у 124 пасажі – 14,96 %, що в 1,36 та 1,32 раза менше, ніж у 59 пасажі (19,85 %) відповідно;

– ВЖК – у 100 пасажі – 15,55 %, у 124 – 15,92 %, що в 1,08 та 1,06 раза менше, ніж у 59 пасажі (16,86 %) відповідно.

Стовсно триацилгліцеролів, то відмічалось їх збільшення у мікобактерій 124 пасажу – (16,39 %) у 0,86 раза.

Зіставляючи наведені результати цих і попередніх досліджень *M. bovis*, зареєстровано відмінність змін ліпідного складу клітинної оболонки за пасажування на середовищі з рН 6,5 до 150 пасажу, де спостерігалися тенденції до зниження фракцій фосфоліпідів, триацилгліцеролів й ефірів стеринів та збільшення фракцій діацилгліцеролів, стеринів та вільних жирних кислот.

Визначення жирнокислотного складу фракції вільних жирних кислот досліджуваних субкультур мікобактерій показало (табл. 93) високий вміст суми ненасичених жирних кислот (пальмітолеїнова, олеїнова, сума лінолева з ліноленою).

**93. Вільні жирні кислоти *M. bovis*
за багаторазового пасажування, % від суми**

Кислота	Код	Пасаж		
		59-й	100-й	124-й
Лауринова	C _{12:0}	0,16±0,10	0,10±0,05	0,03±0,006
Тридеканова	C _{13:0}	0,69±0,07	0,48±0,06	0,28±0,08**
Міристинова	C _{14:0}	0,41±0,17	0,36±0,09	0,25±0,06
Пентадеканова	C _{15:0}	0,46±0,17	0,24±0,06	1,04±0,12*
Пальмітолеїнова	C _{16:1}	1,28±0,28	0,84±0,23	1,41±0,54
Пальмітинова	C _{16:0}	29,19±1,78	26,98±0,56	28,41±0,59
Маргарінова	C _{17:0}	0,92±0,24	1,78±0,13*	0,17±0,06*
Олеїнова	C _{18:1}	34,97±1,61	40,64±0,41*	38,98±0,60
Стеаринова	m _{18:0}	10,10±0,84	14,06±0,25*	16,77±0,31**
Лінолева + ліноленова	C _{18:2+C_{18:3}}	4,13±0,96	1,19±0,32*	1,56±0,59*
Нонадеканова	C _{19:0}	0,73±0,23	3,68±0,32**	2,25±0,63
Арахінова	C _{20:0}	сліди	0,24±0,06*	0,02±0,006
Генейкозанова	C _{21:0}	0,55±0,32	0,72±0,39	0,83±0,46
Бегенова	C _{22:0}	7,11±0,70	2,63±0,43**	3,08±0,37**
Трикозанова	C _{23:0}	сліди	0,30±0,29	0,03±0,006
Тетракозанова	C _{24:0}	1,28±0,52	0,09±0,05	0,03±0,006
Пентакозанова	C _{25:0}	7,43±0,62	5,67±0,77	4,86±0,66*
Гексакозанова	C _{26:0}	0,59±0,32	-	-
∑ ненасичених		40,38±1,08	42,67±1,13	41,95±1,21
∑ насичених		59,62±1,32	57,33±1,23	58,05±1,31

Хоча велику частку у складі ВЖК у мікобактерій усіх субкультур складають насичені (лауринова, тридеканова, міристинова, пентадеканова, пальмітинова, маргарінова, стеаринова, нонадеканова, арахінова, генейкозанова,

бегенова, трикозанова, тетракозанова, пентакозанова, гексакозанова) жирні кислоти. Відмічено високий вміст таких насичених жирних кислот, як $C_{16:0}$, $C_{18:0}$, $C_{22:0}$, $C_{25:0}$ у мікобактерій всіх субкультур, на 100 пасажі мікобактерій перевищувала кількість маргаринової ($C_{17:0}$), нонадеканової ($C_{19:0}$), арахінової ($C_{20:0}$) кислот; а на 124 пасажі – пентадеканової ($C_{15:0}$), стеаринової ($C_{18:0}$), гейкозанової ($C_{21:0}$) – *рис. 146*.

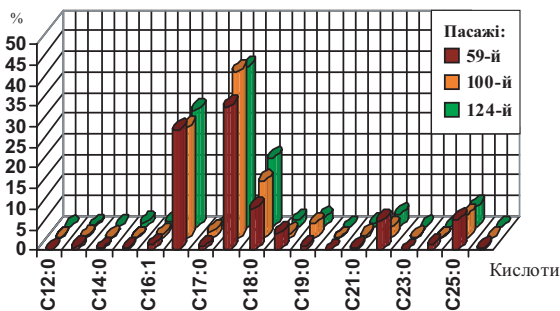


Рис. 146. Вільні жирні кислоти у M. bovis за багаторазового пасажування, % від суми

Результати засвідчили *табл. 93 та рис. 146*, що зі збільшенням кількості пересівів мікобактерій суттєво знижується вміст довголанцюгових і підвищується вміст коротколанцюгових жирних кислот. Співвідношення цих кислот у мікобактерій контролю становило 1:4,89, а у пасажованих 100 та 124 рази 1:9,62 та 1:10,33 відповідно, оскільки взагалі зникли такі довголанцюгові кислоти, як C_{26} , C_{27} та виявлено у дуже малій кількості кислоти C_{23} , C_{24} . За даними М.В. Зеленської 2006 року, при пасажуванні мікобактерій на такому ж середовищі з рН 7,1 до 40 пасажу, навпаки, відмічалась і велика кількість коротколанцюгових жирних кислот, і довголанцюгових (1:5,62) у *M. bovis*.

Вочевидь, рН середовища визначає інтенсивність ступеня адаптивності та особливості біологічних властивостей *M. bovis* взагалі за численних пересівів. Дослідження мікроорганізму згаданого штаму, пасажованого 150 разів на такому ж середовищі, але з рН 6,5, засвідчило подібну тенденцію: зниження вмісту довголанцюгових і підвищення коротколанцюгових вільних жирних кислот, проте сумарне їх співвідношення значно відрізнялося – на середовищі з рН 7,1 (100 та 124 пересів) 1 : 10; з рН 6,5 (130 та 150 пересів) – 1 : 6,5. Ці дані свідчать про те, що більш інтенсивно адаптивно змінюється ліпідний склад мікобактерій (у 1,5 раза), які пасажувалися через щільне живильне середовище з рН 7,1, ніж мікобактерій, які пасажувалися на середовищі з рН 6,5. Це підтверджує і якісний склад мікобактерій одного штаму, досліджених на середовищі з різним рН. Якщо на середовищі з рН 6,5 до 130 пересіву мікобактерії вміщували на діагностичному рівні довголанцюгові жирні кислоти тільки три (C_{21} ;

Необхідно зазначити, що кількість ненасичених жирних кислот була досить великою протягом 124 пасажів, на відміу від пасажування *M. bovis* через щільне середовище з рН 6,5. Це вказує на посилені адаптивні фізіологічні процеси мікробної клітини до рН живильного середовища та несприятливих умов, зокрема – постійних тривалих пересівів.

C₂₂; C₂₅) із семи наявних у вихідного варіанта збудника, то у мікобактерій 124 пересіву на середовищі з рН 7,1 їх вміщувалося в 1,66 раза більше (тобто п'ять із семи).

Більш широкий якісний набір довголанцюгових жирних кислот у мікобактерій переконливо свідчить, що вони володіють більш вираженою вірулентністю, яка у мікобактерій, що пасажувалися через штучне живильне середовище з рН 6,5, не виявлялася вже на 100 пересіві. Це показали й результати дослідів на морських свинках, яких заражали мікобактеріями 124 пересіву, накопичених на середовищі з рН 7,1. Відмічено загибель дослідних тварин з типовими патолого-анатомічними ознаками на 45 (одна) та на 52 (одна) добу дослідження. Алергічної реакції у морських свинок на ППД-туберкулін для ссавців на 30 добу досліду не виявлено.

Отже, зі збільшенням кількості пасажів *M. bovis* через середовище з рН 7,1–7,2 змінюється ліпідний склад, який супроводжується тенденційним зниженням вмісту загальних ліпідів, фракцій діацилгліцеролів, стеринів та вільних жирних кислот. У мікобактерій 124 пересіву знизився вміст довголанцюгових та підвищився вміст коротколанцюгових вільних жирних кислот; не діагностувалася гексакозанова (C₂₆), яка вміщувалася в клітинній стінці мікобактерій високої вірулентності 59 пасажу.

Очевидним виявилось і те, що вірулентність *M. bovis*, багаторазово пасажованих через середовище з рН 7,1, практично не змінилася, але на такому тлі втрачена сенсibiliзувальна здатність.

Проведені різноманітні дослідження ліпідного складу *M. bovis* швидкорослого багаторазово пасажованого штаму з'ясували, що вони досить лабільні, змінюються, інколи досить суттєво, залежно від умов культивування мікроорганізму. Незвичайною особливістю досліджуваного штаму *M. bovis* є втрата сенсibiliзувальної здатності зі збереженням високого ступеня вірулентності: таке явище у *M. bovis*, культивованих на середовищі з рН 7,1–7,2, має надзвичайне значення в діагностиці туберкульозу, оскільки тварини, які не реагують на ППД-туберкулін для ссавців, але заражені такими мікроорганізмами, невизначено тривалий період можуть бути джерелом збудника інфекції для сприйнятливих здорових відносно туберкульозу тварин. Вочевидь мікобактерії, в тому числі й бичачого виду, генетично наділені високою здатністю змінюватися, набуваючи різних морфологічних форм за різних стадій циклу розвитку. Водночас повідомлення спеціальної літератури і наші дослідження, результати яких наведені в попередніх розділах, підтверджують явище дисоціації в популяції вірулентних мікобактерій. Однак у літературі відсутні дані стосовно культивування мікобактерій дисоціативних форм за низьких плюсових температур та їх ліпідного складу. Тому в цій роботі вперше викладені результати таких досліджень. Про культуральні, тинкторіальні, сенсibiliзувальні, патогенні властивості й морфологічні ознаки повідомлено в попередніх розділах книги.

6.2.6. Дослідження ліпідного складу *M. bovis* дисоціативних L- та інших форм перших генерацій, культивованих за 3, 20 та 37 °C

Дисоціативні форми мікобактерій, їх культуральні властивості та морфологічні ознаки, вивчені й обговорені в попередніх розділах, потребують подальших досліджень ліпідного складу, оскільки цей рівень пізнання біології збудника може наблизити нас до розуміння механізмів фенотипових змін. Такого напрямку досліджень в доступній літературі нами не знайдено, що й обґрунтувало їх проведення.

Досліджували склад ліпідів *M. bovis* дисоціативних форм 117а, б, в та 118 пасажів, які культивували на щільному живильному середовищі з рН 7,1–7,2. Накопичували культури *M. bovis* усіх пасажів досліді на середовищі з рН 7,1–7,2 в термостаті за температури 3, 20 та 37 °C протягом 30 діб від початку росту колоній.

Для порівняння якісних і кількісних показників ліпідів дисоціативних форм *M. bovis* використали попередні усереднені дані досліджень материнської культури (пасажі 100–124) кислотостійких, вірулентних, типових морфологічних ознак паличок.

У результаті досліджень (табл. 94) встановлено, що *M. bovis* дисоціативних форм містять невелику кількість (практично в 1,3–3,7 раза менше) загальних ліпідів, ніж контрольний варіант мікобактерій (100+124 пасаж/ 2), який культивований за температури 37 °C.

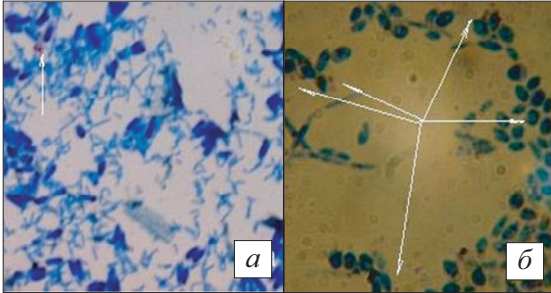
94. Загальні ліпіди *M. bovis* дисоціативних форм, культивованих за різних температур, % на наважку

Контроль (100+124 пасаж/2); Температура культивування 37 °C	Температура культивування, °C	117 варіант			118 пересів
		а	б	в	
4,85±0,45	3	2,31±0,11**	2,96±0,37*	2,38±0,14**	1,20±0,50**
	20	1,30±0,27**	1,53±0,48**	2,37±0,44*	1,49±0,51**
	37	2,40±0,26**	2,2±0,31**	2,6±0,32*	3,63±0,55

Дисоціативні форми *M. bovis* трьох варіантів із чотирьох з підвищенням температури культивування тенденційно підвищували вміст загальних ліпідів. *M. bovis* 117б пасажу мали зворотну закономірність: при культивуванні мікобактерій за температури 3 °C вміст загальних ліпідів становив 2,96±0,37 %, а за 37 °C – 2,2±0,31 %. Якщо в мікобактерій 117а та в відмічалось незначне збільшення вмісту загальних ліпідів з підвищенням температури культивування, то в мікобактерій 118 пересіву така тенденція була досить суттєвою (1,20±0,50 – за температури 3 °C і 3,63±0,55 – за температури 37 °C), утричі більшою, ніж за температури культивування 3 °C.

Така відмінність вмісту й динаміки загальних ліпідів у мікобактерій дисоціативних форм зумовлена культуральними властивостями, морфологічними формами, а значить, й біохімічним, у тому числі ліпідним складом клітинної оболонки.

Мікобактерії 117б пересіву, маючи яскраво виражену здатність формувати помаранчевий пігмент, з підвищенням температури культивування знижують вміст загальних ліпідів; мікобактерії 118 пересіву, типові представники L-форм (сферопласти) з вірогідним вмістом елементарних тілець (гранул), розмножуючись за більш високої температури, можливо, інтенсивно накопичують ліпіди. Остан-



«→» – елементарні тільца

Рис. 147. M. bovis дисоціативних форм, культивованих за температури:

a – 3 °C; *б* – 37 °C × 1500

нє стосується не самих L-форм, а гранул, які вміщуються в них у вигляді кулястих утворень. Якщо L-форми, що культивувалися за 3 °C, вміщували тільки поодинокі в полі зору мікроскопа червоні гранули, то за 37 °C вони значно частіше виявлялися не тільки всередині кулястих утворень, а й на межі виходу та поряд зі сферопластами (*рис. 147*).

Що стосується фракційного складу загальних ліпідів дослідних і контрольних зразків мікобактерій (*табл. 95; рис. 148*), то привертає увагу той факт, що мікобактерії дисоціативних форм усіх чотирьох варіантів уміщували нижчий рівень фосфоліпідів, ніж мікроорганізми контролю, проте з достовірною різницею лише в п'яти випадках із 12. Вміст діацилгліцеролів у контрольному зразку мікобактерій певною мірою дорівнював їх вмісту в дисоціативних формах мікобактерій. В останніх їх вміст був вищим або нижчим. І тільки в мікобактерій 118 пересіву вміст діацилгліцеролів суттєво перевищував їх вміст у мікобактерій контролю: достовірна різниця аналізованих показників відмічена в трьох випадках із трьох (за температур 3, 20 та 37 °C). Вміст стеринів у мікобактерій контролю був значно нижчим, ніж у мікобактерій 117а, в варіантів з достовірною різницею у всіх шести випадках. Мікобактерії 117б варіанта та 118 пересіву вміщували практично однакову кількість стеринів порівняно з мікобактеріями контролю. Суттєвої різниці не відмічено у вмісті ВЖК мікобактерій контрольного та дослідного зразків за всіх температур культивування. Практично однаковий вміст триацилгліцеролів зафіксовано в контрольному та дослідному зразках мікобактерій за винятком 117а варіанта, де встановлено достовірне підвищення вмісту цієї аналізованої фракції за температур культивування 20 і 37 °C та мікобактерій 118 пересіву за температури культивування 37 °C.

95. Фракції загальних ліпідів у *M. bovis* дисоціативних форм,
культивованих за різних температур

Фракція	Контроль	117 варіант			118 пересів
		а	б	в	
Температура 3 °С					
Фосфоліпід	21,69±0,43	19,2±0,58*	20,57±0,50	20,00±0,70	17,33±0,56**
Діацилгліцероли	15,06±0,06	16,97±0,26**	17,69±0,37**	18,18±0,48**	25,67±0,40***
Стерини	14,78±0,25	17,34±0,59**	16,97±0,26**	16,37±0,51*	15,67±0,37
ВЖК	15,73±0,52	16,97±0,26	15,52±0,45	16,36±0,50	14,67±0,37
Триацилгліцероли	16,69±0,49	16,24±0,37	16,61±0,35	15,64±0,44	15,33±0,33
Естери стеринів	15,86±0,66	13,28±0,53	12,64±0,4*	13,45±0,48*	11,33±0,69**
Температура 20 °С					
Фосфоліпід	21,69±0,43	18,9±0,27**	20,06±0,64	19,00±0,71*	20,04±0,71
Діацилгліцероли	15,06±0,06	15,55±0,44	17,52±0,35**	15,00±0,71	24,89±0,33***
Стерини	14,78±0,25	16,77±0,43*	15,61±0,52	17,00±0,71*	15,64±0,40
ВЖК	15,73±0,52	14,63±0,38	16,56±0,37	15,67±0,42	14,98±0,71
Триацилгліцероли	16,69±0,49	19,21±0,58*	16,56±0,37	17,33±0,56	13,87±0,52
Естери стеринів	15,86±0,66	14,94±0,54	13,69±0,41*	16,00±0,71	10,58±0,55**
Температура 37 °С					
Фосфоліпід	21,69±0,43	19,22±0,22	20,5±0,37	19,11±0,44*	20,32±0,74
Діацилгліцероли	15,06±0,06	15,79±0,47	14,10±0,44	16,03±0,65	17,21±0,56*
Стерини	14,78±0,25	17,45±0,46***	15,81±0,51	16,40±0,44*	14,11±0,46
ВЖК	15,73±0,52	14,68±0,42	16,67±0,39	16,02±0,64	16,81±0,58
Триацилгліцероли	16,69±0,49	20,33±0,68*	16,24±0,45	16,44±0,45	18,85±0,52*
Естери стеринів	15,86±0,66	12,53±0,40*	16,67±0,39	16,00±0,67	12,7±0,44*

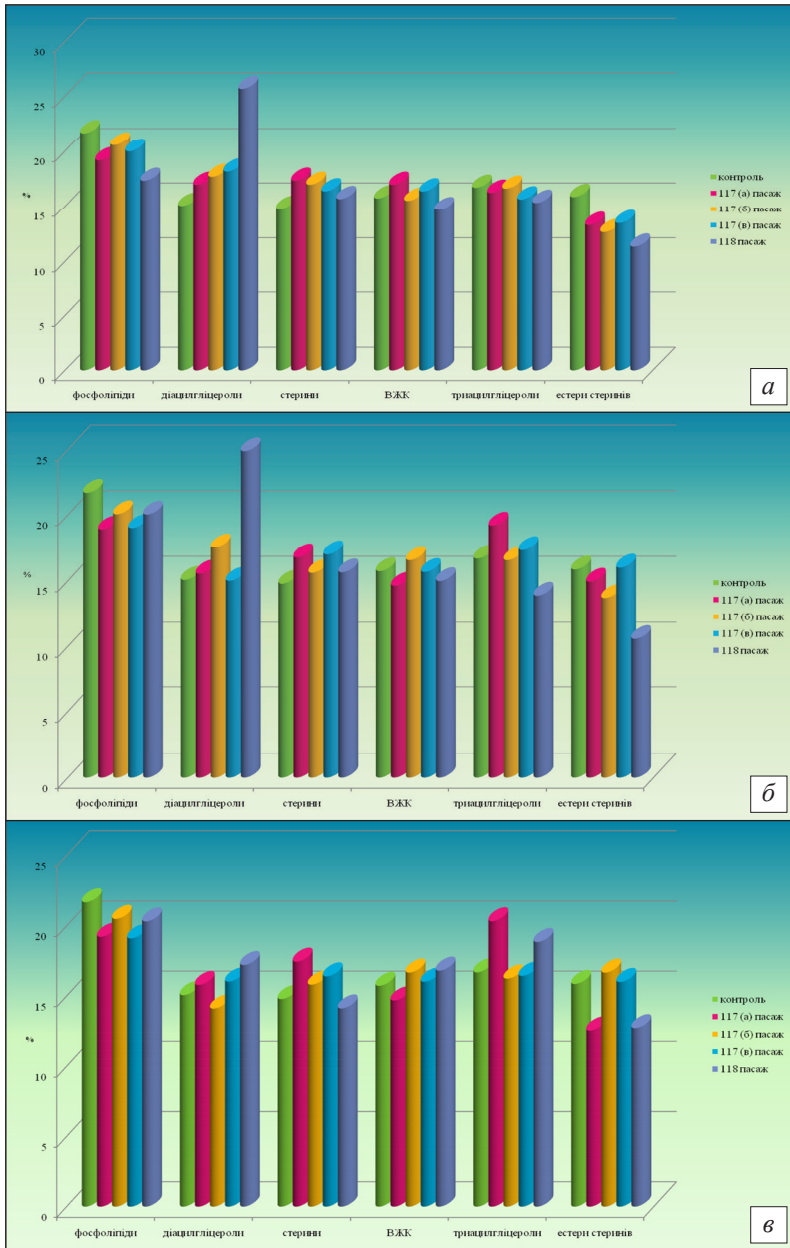


Рис. 148. Фракції загальних ліпідів у *M. bovis* дисоціативних форм, культивованих за температури: а – 3 °С; б – 20 °С; в – 37 °С

Естери стеринів значно менше вмішували мікобактерії 118 пересіву, ніж мікобактерії контролю, та мікобактерії 117а варіанта за температури 37 °С, 117б варіанта за температур 3 і 20 °С та 117в варіанта за температури 3 °С культивування.

Отже, вірулентні мікобактерії мають такий самий якісний фракційний склад клітинної оболонки, як і мікобактерії дисоціативних форм.

Найбільш суттєві відмінності в кількісному фракційному складі встановлені між мікобактеріями 118 пересіву і мікобактеріями контролю: (естери стеринів та діацилгліцероли) – за всіх температур культивування згадані фракції дисоціативних форм мали вищий показник, ніж у контролі. Достовірні відмінності, тільки за іншою фракцією – стерини, за всіх температур культивування встановлені в мікобактерій 117а, в варіантів.

Що стосується вмісту в клітинній оболонці ВЖК *M. bovis* (табл. 96–98; рис. 149 досліджуваних варіантів дисоціативних форм у порівняльному аспекті з усередненими даними 100 та 124 пересіву – материнська культура, контроль, то слід зазначити, що в усіх дослідних зразках виявлено нову ундеканову кислоту (C_{11:0}), яка рееструвалася за усіх температурних режимів культивування. У контрольному зразку згадана кислота не відмічалася. Разом з цим у жодному з досліджуваних варіантів мікобактерій не зафіксовано таких кислот, як гексакозанова (C_{26:0}) та гептакозанова (C_{27:0}), які не виділені й в контрольному зразку 100–124 пересівів.

Підкреслимо, що, за нашими повідомленнями, аналізовані ВЖК мікобактерій материнської культури цього ж варіанта *M. bovis*, культивованих на такому ж середовищі, з такими самими значеннями рН, не рееструвалися вже з 100 пересіву, хоча в 59 субкультурі гептакозанова кислота містилася (0,59±0,32).

Аналізуючи вміст основних, скелетних ВЖК мікобактерій контрольних зразків встановлено, що ці кислоти (пальмітинова C_{16:0}, олеїнова C_{18:1}, стеаринова C_{18:0}) залишилися основними скелетними ВЖК і в мікобактеріях дисоціативних форм, у тому числі і *L*-формах 118 субкультури.

Незважаючи на зміну морфологічних ознак та тинкторіальних властивостей (втрата кислотостійкості), наявність згаданих кислот у дисоціативних формах мікобактерій на найвищому рівні залишається постійною, а їх рівень взагалі значно вищий, ніж у субкультурах мікобактерій 100 та 124 пересівів, хоча й встановлені деякі відмінності в бік зниження вмісту аналізованих кислот. Так, достовірне зниження пальмітинової кислоти відмічено в мікобактерій (*L*-форм 118 субкультури) під час культивування за усіх температурних режимів. Уміст олеїнової кислоти достовірно був нижчим у 117а субкультурі за всіх температурних режимів, а 117б, в субкультур нижчий за температури 20 і 37 °С культивування. Вміст стеаринової кислоти в мікобактерій 117б, в, 118 субкультури за 3 °С був нижчим, а в деяких випадках і достовірним (117б – за 3 °С; 118 – за 3 та 20 °С).

96. Вільні жирні кислоти *M. bovis* дисоціативних форм,
культивованих за 3 °С

ВЖК	Код	Контроль	117 варіант			118 пересів
			а	б	в	
Ундеканова	C _{11:0}	-	0,32±0,27	0,40±0,05	0,28±0,06	0,78±0,29
Лаурінова	C _{12:0}	0,07±0,02	0,06±0,04	сліди	0,11±0,32	сліди
Тридеканова	C _{13:0}	0,38±0,15	0,16±0,06	0,52±0,07	0,28±0,61	0,97±0,13
Міристинова	C _{14:0}	0,31±0,13	0,60±0,30	1,60±0,60	0,53±0,21	0,30±0,09
Пентадеканова	C _{15:0}	0,64±0,12	0,57±0,29	0,48±0,05	0,50±0,30	0,49±0,06
Пальмітолеї-нова	C _{16:1}	1,13±0,38	0,51±0,31	1,14±0,50	1,20±0,14	0,39±0,06
Пальмітинова	C _{16:0}	27,70±0,68	33,76±0,89**	26,12±0,53	23,95±0,06*	17,63±0,12***
Маргарінова	C _{17:0}	0,98±0,11	0,82±0,46	4,27±0,61*	сліди	0,13±0,06**
Олеїнова	C _{18:1}	39,81±0,72	28,49±1,27**	39,63±0,45	40,17±0,57	48,30±1,83*
Стеаринова	C _{18:0}	15,42±0,64	16,58±0,30	11,80±0,93*	14,60±0,21	10,50±0,03**
Лінолева+ліноленова	C _{18:1} +C _{18:3}	1,38±0,19	0,64±0,31	3,57±0,27**	1,59±0,28	2,59±0,29*
Нонадеканова	C _{19:0}	2,97±0,58	0,69±0,31	3,56±0,27	1,28±0,30	2,57±0,43
Арахінова	C _{20:0}	0,13±0,06	13,39±0,24	0,45±0,42	11,48±0,96**	сліди
Генейкозанава	C _{21:0}	0,78±0,17	0,69±0,31	0,59±0,33	0,80±0,36	1,45±0,04*
Бегенова	C _{22:0}	2,86±0,52	1,26±0,51	4,08±0,59	1,95±0,14	4,36±0,58
Трикозанава	C _{23:0}	0,17±0,07	0,03±0,04	0,89±0,24	0,57±0,32	0,11±0,06
Тетракозанава	C _{24:0}	0,06±0,02	0,86±0,46	сліди	0,28±0,24	0,1±0,06
Пентакозанава	C _{25:0}	5,27±0,70	0,57±0,29**	0,90±0,24**	0,43±0,06**	9,33±0,21*

97. Вільні жирні кислоти у *M. bovis* дисоціативних форм,
культивованих за 20 °С

ВЖК	Код	Контроль	117 варіант						118 пересів
			а		б		в		
Ундеканова	C _{11:0}	-	0,11±0,07	0,11±0,01	0,07±0,01	0,07±0,01	0,07±0,01	0,98±0,23	
Лауринова	C _{12:0}	0,07±0,02	сліди	сліди	сліди	сліди	сліди	сліди	
Тридеканова	C _{13:0}	0,38±0,15	0,36±0,09	0,16±0,01	0,23±0,05	0,23±0,05	0,23±0,05	1,43±0,13*	
Міристинова	C _{14:0}	0,31±0,13	0,95±0,21	0,40±0,01	0,63±0,09	0,63±0,09	0,63±0,09	0,19±0,01	
Пентадеканова	C _{15:0}	0,64±0,12	0,44±0,09	0,53±0,08	0,44±0,07	0,44±0,07	0,44±0,07	0,81±0,10	
Пальмітолеї-нова	C _{16:1}	1,13±0,38	0,36±0,08	0,22±0,04	0,28±0,06	0,28±0,06	0,28±0,06	0,43±0,08	
Пальмітинова	C _{16:0}	27,70±0,68	35,90±0,72**	39,48±0,82**	35,43±0,63**	35,43±0,63**	35,43±0,63**	18,19±0,67**	
Маргарінова	C _{17:0}	0,98±0,11	8,16±0,64**	5,20±0,51**	2,93±0,36*	2,93±0,36*	2,93±0,36*	8,69±0,57***	
Олеїнова	C _{18:1}	39,81±0,72	15,41±0,71***	16,75±0,41***	12,19±0,47***	12,19±0,47***	12,19±0,47***	41,30±0,90	
Стеаринова	C _{18:0}	15,42±0,64	21,94±0,71**	24,11±0,61**	36,27±0,49***	36,27±0,49***	36,27±0,49***	11,95±0,56*	
Лінолева+ліноленова	C _{18:1} +C _{18:3}	1,38±0,19	7,07±0,56**	2,36±0,18*	2,68±0,24*	2,68±0,24*	2,68±0,24*	8,69±0,44***	
Нонадеканова	C _{19:0}	2,97±0,58	0,02±0,005*	0,04±0,01*	сліди	сліди	сліди	0,14±0,01*	
Нова неідентифікована		-	0,91±0,23	0,93±0,12	0,89±0,14	0,89±0,14	0,89±0,14	0,01±0,03	
Арахінова	C _{20:0}	0,13±0,06	3,85±0,55**	5,72±0,42***	5,36±0,65**	5,36±0,65**	5,36±0,65**	0,03±0,01	
Генейкозанова	C _{21:0}	0,78±0,17	0,45±0,08	0,30±0,08	0,49±0,10	0,49±0,10	0,49±0,10	0,2±0,06	
Бегенова	C _{22:0}	2,86±0,52	3,81±0,62	3,20±0,45	1,96±0,16	1,96±0,16	1,96±0,16	6,11±0,55*	
Трикозанова	C _{23:0}	0,17±0,07	0,05±0,01	0,04±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01	0,03±0,01	0,27±0,06	
Тетракозанова	C _{24:0}	0,06±0,02	0,09±0,01	0,27±0,09	0,08±0,01	0,08±0,01	0,08±0,01	0,33±0,10	
Пентакозанова	C _{25:0}	5,27±0,70**	0,12±0,01**	0,18±0,01**	0,04±0,01**	0,04±0,01**	0,04±0,01**	0,24±0,05**	

98. Вміст вільних жирних кислот у *M. bovis* дисоціативних форм, культивованих за 37 °С

ВЖК	Код	Контроль	117 варіант			118 пересів
			а	б	в	
Ундеканова	C _{11:0}	-	сліди	0,42±0,08	0,20±0,06	0,05±0,03
Лауринова	C _{12:0}	0,07±0,02	сліди	сліди	сліди	сліди
Тридеканова	C _{13:0}	0,38±0,15	0,04±0,03	0,78±0,09	0,29±0,07	0,10±0,07
Міристинова	C _{14:0}	0,31±0,13	0,76±0,09*	1,30±0,10**	0,44±0,05	0,13±0,09
Пентадеканова	C _{15:0}	0,64±0,12	0,19±0,04*	1,30±0,10	0,58±0,08	0,23±0,08*
Пальмітолеїнова	C _{16:1}	1,13±0,38	0,02±0,01*	0,22±0,09	0,12±0,01	0,21±0,07
Пальмітинова	C _{16:0}	27,70±0,68	25,22±0,39*	39,81±0,95***	45,59±0,58***	24,03±0,67*
Маргарінова	C _{17:0}	0,98±0,11	11,33±0,78***	0,26±0,07**	0,29±0,01**	3,23±0,44**
Олеїнова	C _{18:1}	39,81±0,72	6,15±0,44***	22,20±0,62***	13,20±0,56***	34,44±0,48**
Стеаринова	C _{18:0}	15,42±0,64	25,98±0,57***	18,27±0,75*	31,39±0,32***	13,45±0,48
Лінолева+ліноленова	C _{18:1} +C _{18:3}	1,38±0,19	23,56±0,48***	10,26±0,59***	3,26±0,36**	7,92±0,41***
Нонадеканова	C _{19:0}	2,97±0,58	0,02±0,01**	сліди	0,19±0,01**	0,36±0,06*
Арахінова	C _{20:0}	0,13±0,06	1,21±0,53	1,74±0,17***	2,21±0,19***	0,04±0,03
Генейкозанова	C _{21:0}	0,78±0,17	0,76±0,48	0,52±0,07	0,72±0,07	1,38±0,5
Бегенова	C _{22:0}	2,86±0,52	2,58±0,56	2,62±0,08	1,30±0,09*	1,38±0,5
Трикозанова	C _{23:0}	0,17±0,07	1,13±0,64	0,04±0,01	0,04±0,01	0,07±0,1
Тетракозанова	C _{24:0}	0,06±0,02	0,67±0,33	0,17±0,01*	0,14±0,03	0,29±0,1
Пентакозанова	C _{25:0}	5,27±0,70**	0,38±0,35**	0,09±0,02**	0,04±0,01**	12,7±0,5***

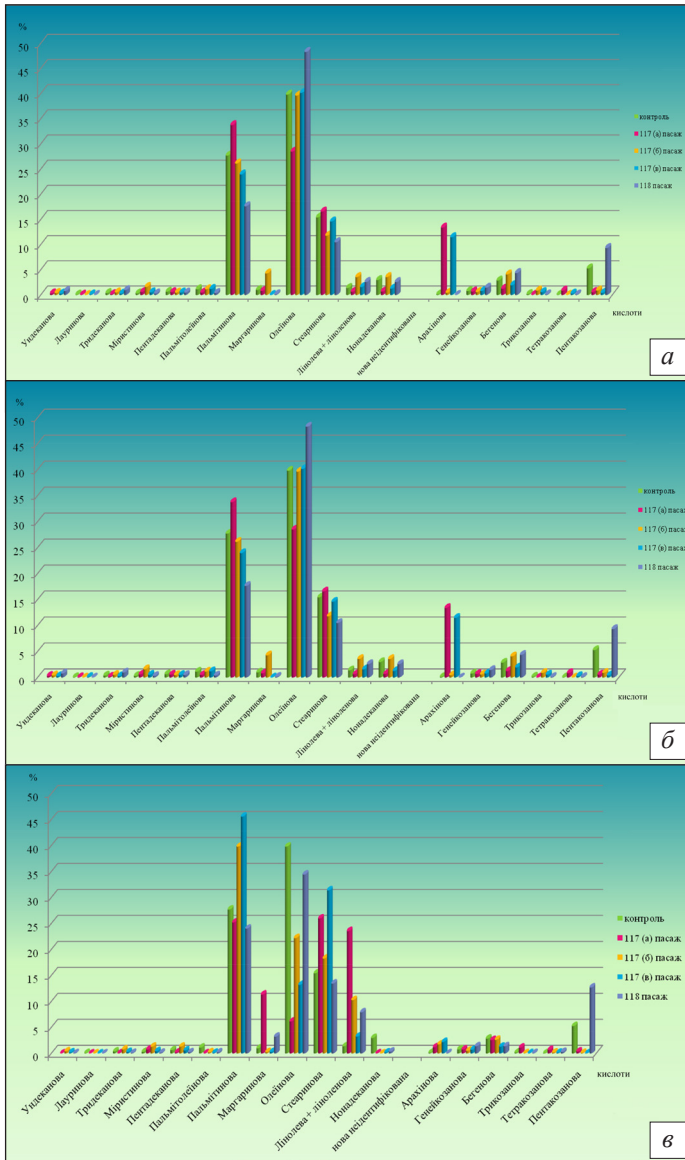


Рис. 149. Вільні жирні кислоти *M. bovis* дисоціативних форм, культивованих за різних температур: а – 3 °С; б – 20 °С; в – 37 °С

Тут і далі за текстом: сліди – наявність кислоти <0,01 %; $C_{a.0}$ – насичена жирна кислота (а – кількість атомів вуглецю); $C_{a.n}$ – ненасичена жирна кислота (n – кількість подвійних зв'язків)

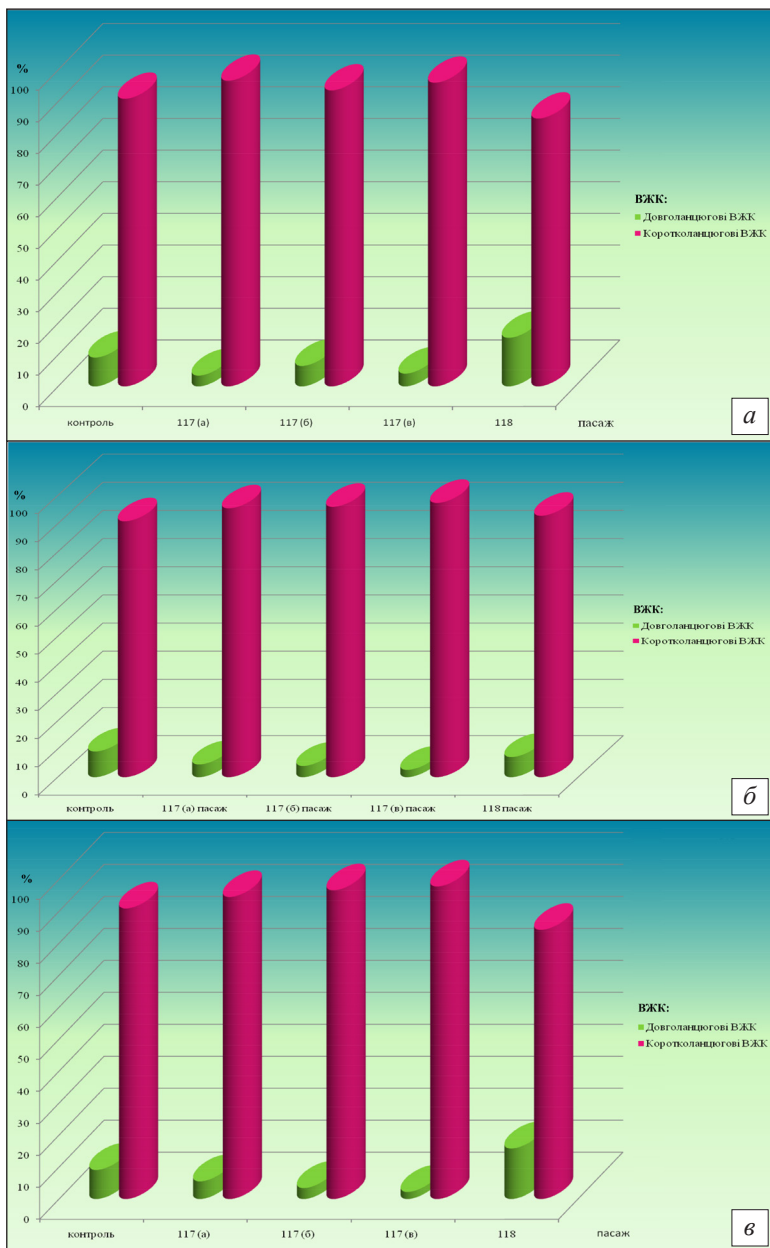
Водночас суттєві зрушення на окремих етапах досліджень дисоціативних форм встановлені й у вмісті інших ВЖК мікобактерій. Вміст маргаринової кислоти ($C_{17:0}$), у субкультури 117а пересіву перевищував вміст у контрольному зразку у 8,3 та 11,6 раза відповідно. Збільшення вмісту цієї кислоти у 8,8 раза відмічено і в 118 пересіві за температури культивування 20 °С. Досить показове підвищення рівня вмісту лінолевої + ліноленової кислот зафіксовано реально в усіх досліджуваних мікобактерій (117а, в та 118 пересіву), причому тільки за температури культивування 37 °С. Досить суттєві, щоб звернути на це увагу, зрушення цих кислот відмічено в мікобактерій 117а та 118 субкультури за температури 20 °С, де аналізовані показники становили $7,07 \pm 0,56$ та $8,69 \pm 0,44$ % відповідно. У мікобактерій 117б, в та 118 субкультури не виявлено нонадеканової та арахінової кислот за температури культивування 3, 20, 37 °С відповідно. Лауринова ВЖК практично не реєструвалася у мікобактерій дослідних зразків. На рівні межі слідів вона виявлена тільки за температури культивування 3 °С у 117а, б субкультур. Поряд з цим необхідно зазначити, що температура культивування 20 °С виявилася оптимальною для синтезу мікобактеріями неідентифікованої ВЖК, яка не реєструвалася у мікобактерій контрольного зразка.

За нашими даними, характерною особливістю є те, що за пасажування мікобактерій цього варіанта тільки через середовище з рН 6,5 фракція ВЖК у динаміці пасажів *M. bovis* мала загальну тенденцію до вірогідного підвищення їх рівня, зі суттєвою зміною їх якісного та кількісного складу. Так, якщо у *M. bovis* вихідного варіанта виділяли 19 ВЖК, то на 130 пасажі їх кількість зменшилася до 14, а на 150 – до 10. У них, як і в мікобактерій дисоціативних форм, були встановлені авірулентні властивості.

Отже, аналіз вмісту ВЖК мікобактерій дисоціативних форм засвідчив, що їх клітинна оболонка має практично такий самий якісний склад і, в цілому, кількісний вміст ВЖК, як і мікобактерії материнської субкультури. Пальмітинова, олеїнова, стеаринова кислоти, будучи базовими ВЖК патогенних мікобактерій, містяться і в дисоціативних формах, зазвичай з деякими відхиленнями у вмісті. У той же час дисоціація мікобактерій супроводжувалась й синтезом нової кислоти, яка раніше не фіксувалася в материнській культурі, зокрема ундеканова ($C_{11:0}$), та зникнення гептакозанової й гексакозанової кислот.

Аналізуючи (табл. 99 – 101; рис. 150) вміст довго- та коротколанцюгових вільних жирних кислот клітинної стінки мікобактерій, встановлено, що довголанцюгові жирні кислоти в мікобактерій контролю в сумі склали 9,11 %, а коротколанцюгові – 90,89 %, в мікобактерій дослідних зразків 117а, б, в за температури 3 °С ці показники становили 3,41 та 96,59 %; 6,46 і 93,54; 4,03 і 95,97 % відповідно. Виняток становили L-форми 118 пересіву, в яких співвідношення коротколанцюгових та довголанцюгових жирних кислот було практично у 2 рази більше, ніж у мікобактерій контролю – 1:10 та 1:5,5 відповідно.

Така ж тенденція спостерігалася і за температури культивування 37 °С. За температури 20 °С вміст довго- та коротколанцюгових вільних жирних кислот був практично таким самим, як і в мікобактерій контролю.



*Рис. 150. Співвідношення коротко- та довголанцюгових ВЖК у *M. bovis* дисоціативних форм, культивованих за температури: а – 3 °С; б – 20 °С; в – 37 °С*

99. Співвідношення коротко- та довголанцюгових ВЖК у *M. bovis* дисоціативних форм, культивованих за 3 °С

ВЖК	Контроль	117 варіант			118 пасаж
		<i>a</i>	<i>б</i>	<i>в</i>	
Σ довголанцюгових	9,11± 0,90	3,41± 0,44**	6,46± 0,86	4,03± 0,54**	15,35± 0,80**
Σ коротколанцюгових	90,89± 0,12	96,59± 0,84*	93,54± 0,94	95,97± 0,76*	84,65± 0,64*

100. Співвідношення коротко- та довголанцюгових ВЖК у *M. bovis* дисоціативних форм, культивованих за 20 °С

ВЖК	Контроль	117 варіант			118 пасаж
		<i>a</i>	<i>б</i>	<i>в</i>	
Σ довголанцюгових	9,11± 0,90	4,52± 0,41**	3,99± 0,47**	2,60± 0,50**	7,15± 0,62
Σ коротколанцюгових	90,89± 0,12	95,48± 0,98*	96,01± 0,65*	97,40± 0,60**	92,85± 0,58

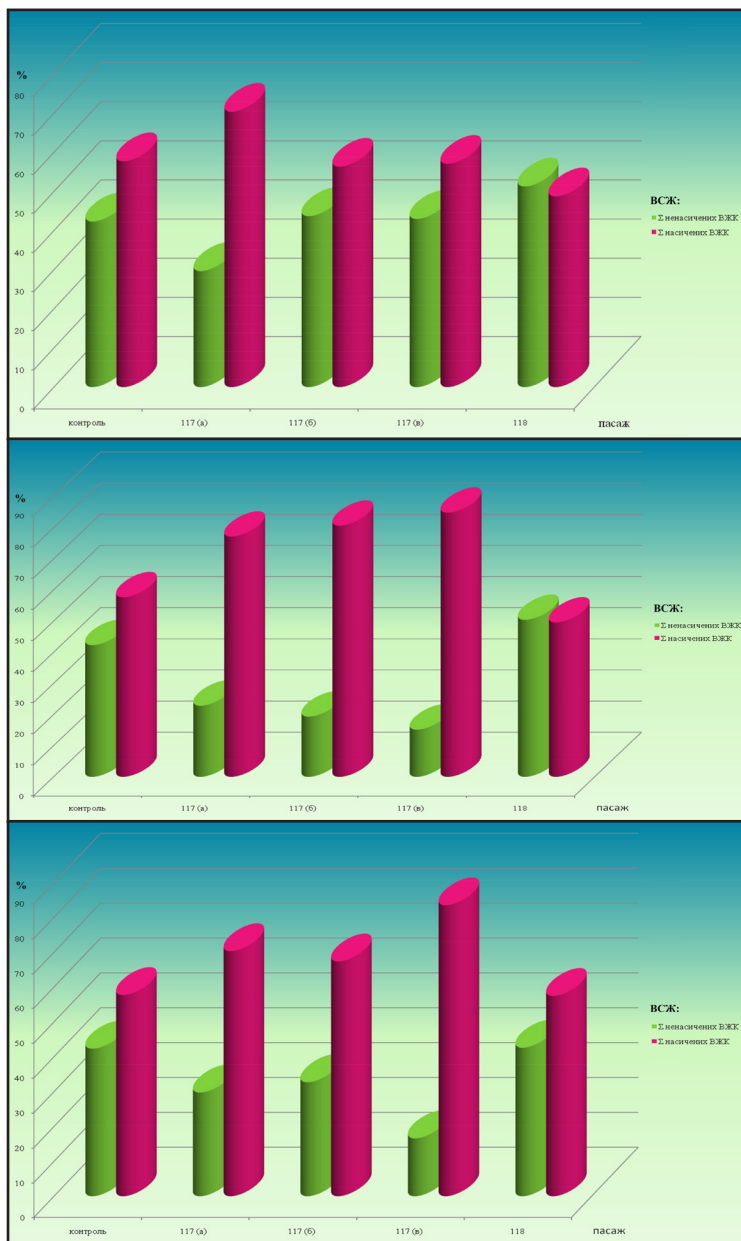
101. Співвідношення коротко- та довголанцюгових ВЖК у *M. bovis* дисоціативних форм, культивованих за 37 °С

ВЖК	Контроль	117 варіант			118 пасаж
		<i>a</i>	<i>б</i>	<i>в</i>	
Σ довголанцюгових	9,11± 0,90	5,52± 0,51*	3,44± 0,3**	2,24± 0,22***	15,81± 0,4***
Σ коротколанцюгових	90,89± 0,12	94,48± 0,96	96,57± 0,38**	97,77± 0,65***	84,19± 0,57**

Сума ненасичених жирних кислот (пальмітолеїнової, олеїнової, лінолевої та ліноленої) у варіантів мікобактерій суттєво відрізнялася між собою (табл. 102; рис. 151).

102. Співвідношення ненасичених та насичених жирних кислот *M. bovis* дисоціативних форм, культивованих за 3 °С

Кислота	Контроль	117 варіант			118 пасаж
		<i>a</i>	<i>б</i>	<i>в</i>	
Σ ненасичених	42,31± 0,82	29,64± 1,17**	43,68± 1,11	42,96± 1,14	51,28± 1,21***
Σ насичених	57,69± 0,80	70,36± 1,08**	56,32± 1,08	57,04± 1,21	48,72± 1,16**



*Рис. 151. Співвідношення ненасичених та насичених жирних кислот *M. bovis* дисоціативних форм, культивованих за температури: а – 3 °C; б – 20 °C; в – 37 °C*

Так, найбільше відхилення спостерігалось у мікобактерій 117а варіанта за температури культивування 3 °С та L-форм 118 пересіву.

У цілому сума ненасичених жирних кислот у мікобактерій контролю тільки дещо нижча (42,3 %), ніж у форм мікобактерій дослідних 117б, в варіантів та 118 пересіву – 43,68 ; 42,96 та 51,28 % відповідно за температури культивування 3 °С – *рис. 151,а*.

Стосовно температури культивування 20 °С (*табл. 103; рис. 151,б*), то найбільше відхилення спостерігалось у L-форм 118 пересіву, де переважала Σ ненасичених жирних кислот над Σ насичених: 50,42 та 49,58 % відповідно, але вміст Σ ненасичених жирних кислот був значно нижчий у 117а, б, в варіантів порівняно з контролем: 22,48; 19,33; 15,15 %, що у 1,89; 2,18; 2,79 рази менше за контроль відповідно.

103. Співвідношення ненасичених та насичених жирних кислот *M. bovis* дисоціативних форм, культивованих за 20 °С

Кислота	Контроль	117 варіант			118 пасаж
		<i>а</i>	<i>б</i>	<i>в</i>	
Σ ненасичених	42,31± 0,82	22,84± 0,67***	19,33± 0,64***	15,15± 0,54***	50,42± 0,54**
Σ насичених	57,69± 0,80	77,16± 0,72***	80,67± 0,85***	84,85± 0,65***	49,58± 0,53***

За температури культивування 37 °С сума ненасичених жирних кислот у 117а, б, в варіантів була в 1,42; 1,29; 2,55 рази менше за контроль, тоді як у L-форм 118 пересіву вона була практично на рівні з контролем (*табл. 104; рис. 151,в*).

104. Співвідношення ненасичених та насичених жирних кислот *M. bovis* дисоціативних форм, культивованих за 37 °С

Кислота	Контроль	117 варіант			118 пасаж
		<i>а</i>	<i>б</i>	<i>в</i>	
Σ ненасичених	42,31± 0,82	29,73± 0,61***	32,68± 0,53	16,58± 0,50***	42,57± 1,16**
Σ насичених	57,69± 0,80	70,27± 0,47***	67,32± 0,32	83,42± 0,88***	57,43± 0,55

Отже, вперше встановлено, що вміст загальних ліпідів *M. bovis* дисоціативних форм значно нижчий за всіх температур культивування, ніж у контролі (100+124 пасаж/2).

Якісний фракційний склад мікобактерій дослідних зразків практично не змінюється, проте кількісний вміст відрізняється від вихідних форм. Так, мікобактерії 118 пересіву за всіх температур культивування містили більше естерів стеринів та діацилгліцеролів, ніж мікобактерії материнської культури.

У той же час дисоціація мікобактерій, на тлі стабільності набору вільних жирних кислот, супроводжується синтезом нових кислот: ундеканової ($C_{11:0}$) та неідентифікованої (за 20 °C), що, напевно, є характерним для дисоціативних форм. Виявлена особливість, зокрема синтез нових кислот, може використовуватися для ідентифікації та диференціації патогенних та апаатогенних (дисоціативних) форм *M. bovis*.

Звичайно, провівши об'ємні, численні дослідження ліпідного складу мікобактерій бичачого виду одного епізоотичного високовірулентного швидкорослого штаму в перших генераціях та їх конверсії в наступному в інші морфологічні й дисоціативні форми, які здатні утворювати пігмент та розмножуватися за низьких плюсових температур (3 °C), необхідно коротко зазначити: якісний склад й кількісний вміст ліпідів у мікобактерій, культивованих на щільному яєчному середовищі, динамічно змінюється залежно від рН середовища, кількості пасажів, морфологічних форм мікробної клітини, ступеня вірулентності. Останній залежить від співвідношення коротко- й довголанцюгових вільних жирних кислот.

Більш інтенсивні зміни в якісному складі й кількісному вмісті ліпідів клітинної стінки виявлені в мікобактерій, культивованих на середовищі з рН 6,5. У таких умовах не тільки втрачається вірулентність (за багаторазових пересівів), але й відбувається суттєве зниження синтезу довголанцюгових вільних жирних кислот.

Між тим мікобактерії в біологічному світі піддаються значному впливу різноманітних факторів, що не може не впливати на їх активність, змінюючись морфологічно та набуваючи нових або ж втрачаючи традиційні властивості кислотостійких паличок.

Тому наступні дослідження ліпідного складу мікобактерій, які показово змінюють швидкість розмноження на тлі зміни біологічного циклу розвитку з відповідними властивостями в динаміці пасажів, спрямували на вивчення впливу на якісний склад і кількісний вміст ліпідів мікобактерій залежно від умов впливу фізико-хімічних речовин ґрунту, організму морських свинок, різного віку культури, речовин-стимуляторів росту й ін.

6.2.7. Ліпідний склад *M. bovis*, виділених з ґрунту

Для цих досліджень ліпідного складу використали швидкорослий штаму *M. bovis*, який перебував у ґрунті три місяці. Для контролю досліджували вихідні мікобактерії материнського штаму.

Після тримісячного перебування у ґрунті *M. bovis* бактеріальну масу накопичували на яєчному живильному середовищі з рН 6,5. Це середовище було використане як оптимальне тільки для адаптації мікобактерій, що вважаємо підтвердженням у попередніх розділах книги. У першій генерації штаму утворював колонії на 28 добу інкубації, що пов'язано, можливо, з його більш тривалою адаптацією до штучного середовища (після тривалої дії фізико-хімічних складових ґрунту).

У біомасі мікобактерій після перебування у ґрунті вміст загальних ліпідів був меншим, ніж у від вихідної культури, в 1,34 раза на суху речовину 8,57 проти 11,5 %) – *табл 105*.

105. Загальні ліпіди *M. bovis*

Показник	Мікобактерії, штам	
	вихідний	з ґрунту
Загальні ліпіди, % на наважку	8,05±0,20	6,00±0,67*

Серед фракцій ліпідів таких мікобактерій виявили меншу кількість фосфоліпідів, триацилгліцеролів та ефіри стеринів (27,97 проти 19,6 %; 18,32 проти 15,23 % та 14,47 проти 13,50 % відповідно) – *табл. 106*.

106. Склад ліпідів *M. bovis* (ТШХ-аналіз), % від суми

Фракція загальних ліпідів	Мікобактерії, штам	
	вихідний	з ґрунту
Фосфоліпіди	27,97±0,26	19,60±0,80***
Діацилгліцероли	12,54±0,27	16,85±0,59**
Стерини	12,23±0,20	17,45±0,71**
Вільні жирні кислоти	14,47±0,23	17,37±0,73*
Триацилгліцероли	18,32±0,16	15,23±0,84*
Ефіри стеринів	14,47±0,24	13,50±0,68
∑ ліпідів	100	100

Значне зменшення фракцій фосфоліпідів та збільшення вільних жирних кислот вказує на зміни в структурі клітинної стінки та посилення метаболічних процесів у клітині під дією умов зовнішнього середовища.

У біомасі вихідної культури вміщувалося менше діацилгліцеролів, стеринів та вільних жирних кислот, ніж у мікобактерій, які перебували в ґрунті.

ГРХ-аналізом фракції вільних жирних кислот мікобактерій, виділених після перебування в ґрунті, порівняно з вихідною культурою суттєвої різниці в сумі насичених та ненасичених жирних кислот не виявлено: в обох зразках приблизно 30 % становили ненасичені жирні кислоти і 70 % – насичені (*табл. 107; рис. 152*).

Звертають на себе увагу динамічні зміни вільних жирних кислот. Із 19 кислот, що виявлялися в мікобактеріях вихідної культури, тільки 15 ідентифіковано після знаходження в ґрунті. В останніх відмічено зниження вмісту маргаринової, лінолева + ліноленової, нонадеканової, арахінової, генейкозаної, пентакозаної кислот, а такі, як трикозаної, тетракозаної, гексакозаної, гептакозаної практично не синтезувалися мікробною клітиною.

Із довголанцюгових жирних кислот (C₂₁–C₂₇) велика кількість припадала на бегенову кислоту, якої у 3,6 раза було більше, ніж у вихідної культури. Пентакозаної кислоти було менше в 1,3 раза, а генейкозаної – у 7 разів.

107. Вільні жирні кислоти *M. bovis*, % від суми

Кислота	Код	Мікобактерії, штам	
		вихідний	з ґрунту
Лауринова	C _{12:0}	0,04±0,02	0,48±0,44
Тридеканова	C _{13:0}	0,10±0,02	1,22±0,46
Міристинова	C _{14:0}	0,27±0,04	2,17±0,57*
Пентадеканова	C _{15:0}	0,22±0,02	0,41±0,31
Пальмітолеїнова	C _{16:1}	0,55±0,07	1,63±0,72
Пальмітинова	C _{16:0}	19,62±0,53	27,82±1,60***
Маргаринова	C _{17:0}	0,81±0,07	0,14±0,05***
Олеїнова	C _{18:1}	23,87±0,60	26,06±1,04
Стеаринова	C _{18:0}	7,42±0,11	8,14±0,82
Лінолева + ліноленова	C _{18:2+} C _{18:3}	2,97±0,16	2,44±0,56
Нонадеканова	C _{19:0}	3,34±0,06	1,36±0,51*
Арахінова	C _{20:0}	5,23±0,14	0,61±0,36***
Генейкозанова	C _{21:0}	6,74±0,23	0,98±0,55***
Бегенова	C _{22:0}	5,78±0,18	20,84±0,99***
Трикозанова	C _{23:0}	5,89±0,35	сліди
Тетракозанова	C _{24:0}	5,57±0,19	сліди
Пентакозанова	C _{25:0}	7,43±0,26	5,70±0,87
Гексакозанова	C _{26:0}	2,53±0,30	сліди
Гептакозанова	C _{27:0}	1,62±0,19	-
Σ ненасичених		27,39±0,44	30,13±1,03
Σ насичених		72,61±0,50	69,87±1,67

Серед коротколанцюгових жирних кислот (C₁₂–C₂₀) по відсотковому вмісту переважала пальмітолеїнова кислота; її кількість у мікобактерій, які перебували у ґрунті, зросла в 1,42 раза. У мікобактерій цього штаму, окрім цієї кислоти,

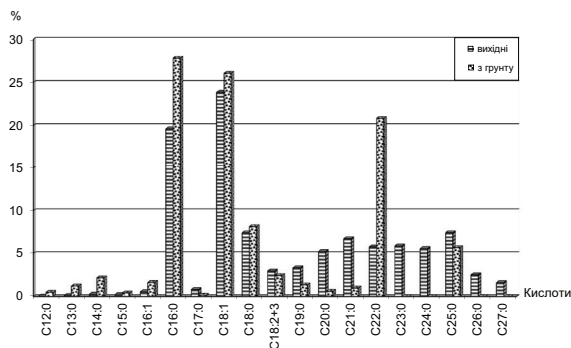


Рис. 152. Вільні жирні кислоти *M. bovis*, % від суми

різко збільшилась кількість лауринової, міристинової, тридеканової, кислот (приблизно від 3 до 12 разів).

Отже, перевага коротколанцюгових кислот мікобактерій (рис. 152), які перебували в ґрунті, свідчить про посилення адаптаційних процесів, які активізувалися за цих умов. Підтвердженням є незначне збільшення суми

ненасичених жирних кислот і зменшення суми насичених. Суттєве зменшення загальних ліпідів, фракцій фосфоліпідів та триацилгліцеролів, можливо, призвело до зниження вірулентності *M. bovis* швидкорослого штаму, який перебував у ґрунті три місяці.

Щоб перевірити одержані результати провели біологічну пробу на чотирьох морських свинках за загальноприйнятим методом.

Як видно з табл. 108, мікобактерії вихідного варіанта викликали алергію на ППД-туберкулін для ссавців, розпочинаючи з 20-ї доби досліджу, мікобактерії з ґрунту – із 30-ї доби. Перші загинули через 36–38 дб, інші – 61–83 доби.

Патолого-анатомічні зміни за індексом ураження, викликаних мікобактеріями вихідного варіанта, були більш як у два рази інтенсивніші й значно поширені, ніж ті, що знаходилися в ґрунті.

108. Сенсibiliзувальні та патогенні властивості мікобактерій до та після перебування у ґрунті

<i>M. bovis</i> , штам	№ морської свинки	Алергічне дослідження, доба ¹			Тривалість досліджу, дб	Специфічні ураження ²				Індекс ураження
		20	30	60		лімфатичні вузли	селезінка	печінка	легені	
Вихідний	23	+	+	–	36	++	+++	–	+++	20
	24	+	+	–	38	++	++	–	+++	18
Виділений з ґрунту	45	–	+	–	61	+	+++	–	++	15
	46	–	+	+	83	+	+++	–	+	11

¹Результат: (+) – позитивний; (–) – негативний.
²Для специфічних уражень: (+) – поодинокі вузлики; (++) – декілька вузликів; (+++) – численні, рідко розташовані вузлики.

Таким чином, у ліпідному складі швидкорослого штаму *M. bovis* за час перебування у ґрунті відбулися певні зміни, які призвели до зниження вірулентності. До таких змін можна з упевненістю віднести суттєве зниження або відсутність деяких з них, зокрема довголанцюгових вільних жирних кислот.

6.2.8. Ліпідний склад мікобактерій, виділених від морських свинок, заражених різновіковою культурою *M. bovis* швидкорослого штаму

Для вивчення впливу тривалості культивування мікроорганізмів на ліпідний склад і вірулентність *M. bovis* швидкорослого штаму використовували біологічну пробу на морських свинках.

Ступінь вірулентності визначали за строком загибелі піддослідних тварин. Двох морських свинок (№ 47, 48) заражали зависом мікобактерій 9-добової культури, а двох інших (№ 49, 50) – 30-добової.

Після загибелі тварин проводили виділення мікобактерій з патологічного матеріалу, їх накопичення, дослідження та порівняння показників ліпідного складу клітинної стінки з вихідною культурою, яка культивувалася 30 діб, але не була пасажована через організм морських свинок.

Накопичення культури мікобактерій трьох варіантів проводили на ячному живильному середовищі з рН 6,5 і подальшим дослідженням ліпідного складу.

Як видно з *табл. 109*, у мікобактерій, культивованих 9 діб, виявлена максимальна кількість загальних ліпідів (11,43 %), у той час як у зразках вихідної культури та мікобактерій, культивованих 30 діб, їх виявлено в 1,5–2,5 раза менше (на суху речовину відповідно 16,33; 11,50; 6,11 %).

109. Загальні ліпіди *M. bovis* вихідного швидкорослого материнського штаму та мікобактерій, виділених від морських свинок

Показник	Культура		
	вихідна	9-добова	30-добова
Загальні ліпіди, % на наважку	8,05±0,20	11,43±0,30***	4,28±0,33***

У той же час серед основних фракцій ліпідів майже третину складають полярні ліпіди, тоб то фосфоліпіди (*табл. 110*).

110. Фракційний склад ліпідів мікобактерій, % від суми

Фракція загальних ліпідів	Культура		
	вихідна	9-добова	30-добова
Фосфоліпіди	27,97±0,26	27,77±0,28	27,18±0,18
Діацилгліцероли	12,54±0,27	12,41±0,20	12,08±0,25
Стерини	12,23±0,20	14,38±0,20***	13,76±0,31*
Вільні жирні кислоти	14,47±0,23	14,06±0,30	13,76±0,21
Триацилгліцероли	18,32±0,16	17,32±0,21*	17,11±0,22*
Ефіри стеринів	14,47±0,24	14,06±0,22	16,11±0,21**
∑ ліпідів	100	100	100

У *M. bovis* вихідного штаму виявлено найбільшу кількість фосфоліпідів, діацилгліцеролів, вільних жирних кислот та триацилгліцеролів на відміну від інших досліджуваних мікобактерій.

У мікобактерій, культивованих 9 діб, зареєстровано максимальний вміст стеринів (14,38 %) і підвищений вміст фосфоліпідів. А в мікобактерій, культивованих 30 діб, переважала фракція ефіри стеринів. Кількість діацилгліцеролів була майже на одному рівні в усіх досліджуваних мікобактерій. Водночас вміст фракцій у мікобактерій 9- та 30-добової культури в загальному практично однаковий, що підтверджує ідентичність патогенного потенціалу.

Виходячи з результатів дослідження фракцій ліпідів, можна наголошувати – максимальна кількість триацилгліцеролів у вихідного штаму *M. bovis* свідчить про посилені метаболічні процеси, на відміну від двох інших.

Методом газорідинної хроматографії виявили високий вміст насичених жирних кислот (57,33–72,61 %), особливо у вихідній культурі (табл. 111).

111. Вільні жирні кислоти *M. bovis* вихідного штаму та виділених від заражених морських свинок, % від суми

Кислота	Код	Культура		
		вихідна	9-добова	30-добова
Лауринова	C _{12:0}	0,04±0,02	0,03±0,03	сліди
Тридеканова	C _{13:0}	0,10±0,02	0,31±0,13	0,31±0,06*
Міристинова	C _{14:0}	0,27±0,04	0,41±0,12	0,47±0,06
Пентадеканова	C _{15:0}	0,22±0,02	0,51±0,07*	1,18±0,17**
Пальмітолеїнова	C _{16:1}	0,55±0,07	0,81±0,17	0,59±0,17
Пальмітинова	C _{16:0}	19,62±0,53	25,81±0,16***	27,98±0,22***
Маргаринова	C _{17:0}	0,81±0,07	1,90±0,13**	6,14±0,25***
Олеїнова	C _{18:1}	23,87±0,60	36,58±0,28***	30,29±0,40***
Стеаринова	C _{18:0}	7,42±0,11	9,21±0,14***	10,62±0,17***
Лінолева + ліноленова	C _{18:2} +C _{18:3}	2,97±0,16	5,28±0,11***	7,01±0,21***
Нонадеканова	C _{19:0}	3,34±0,06	сліди	2,75±0,21
Арахінова	C _{20:0}	5,23±0,14	2,03±0,20***	0,24±0,06***
Генейкозанова	C _{21:0}	6,74±0,23	3,66±0,26***	3,20±0,17***
Бегенова	C _{22:0}	5,78±0,18	2,24±0,13***	0,71±0,36***
Трикозанова	C _{23:0}	5,89±0,35	1,46±0,17***	0,24±0,06***
Тетракозанова	C _{24:0}	5,57±0,19	1,28±0,16***	0,79±0,20***
Пентакозанова	C _{25:0}	7,43±0,26	7,46±0,10	6,85±0,12
Гексакозанова	C _{26:0}	2,53±0,30	0,51±0,18**	0,16±0,08**
Гептакозанова	C _{27:0}	1,62±0,19	0,51±0,10**	0,47±0,12**
Σ ненасичених		27,39±0,44	42,67±0,25***	37,89±0,22***
Σ насичених		72,61±0,50	57,33±0,13***	62,11±0,15***

У мікобактерій, культивованих 9 діб, велику частину в складі ВЖК становили ненасичені жирні кислоти за рахунок високого вмісту олеїнової кислоти (36,58 %).

Високий вміст пальмітинової кислоти відмічено в усіх зразках, максимально у мікобактерій, культивованих 30 діб (27,98 %).

Суттєвий вміст жирних кислот C_{20:0}–C_{24:0} виявлено і в мікобактерій вихідного штаму, на відміну від мікобактерій, культивованих 9 та 30 діб. Максимальний вміст пентадеканової – 1,18 %, маргаринової – 6,14 %, лінолевої з ліноленовою – 7,01 % виявлено в мікобактерій, культивованих 30 діб.

Поряд з цим необхідно відзначити, що вміст взагалі вільних жирних кислот з великою кількістю атомів вуглецю в мікобактерій вихідного варіанта значно перевищує цей показник в інших варіантів мікобактерій, особливо у тих, що культивувалися 30 діб.

Водночас звертає увагу той факт, що в цілому якісний склад вільних жирних кислот практично ідентичний, за винятком лауринової кислоти, яка виявлена на мінімальному діагностичному рівні в мікобактерій трьох варіантів, та нонадеканової, яка не зафіксована в мікобактерій, культивованих 9 діб.

Зміни кількості тих чи інших жирних кислот, можливо, пов'язані з різними рівнями метаболічних процесів у досліджуваних мікобактерій.

Отже, встановлено, що показники фракцій ліпідів досліджених мікобактерій практично не відрізнялися, а пасажування через організм піддослідних тварин не вплинуло на їх вміст, за винятком загальних ліпідів. Утім кількість довголанцюгових вільних жирних кислот мікобактерій, які в цілому характеризуються патогенністю, значно знизилася. Це може свідчити про певний вплив віку культур, які були відібрані для зараження, на вірулентність мікобактерій. Для підтвердження попереднього висновку провели біологічні дослідження на морських свинках.

Вірулентність різновікової культури швидкорослого штаму M. bovis. Результати, наведені в табл. 112, свідчать про високу вірулентність мікобактерій досліджуваного штаму.

112. Вірулентність M. bovis швидкорослого штаму залежно від строку культивування*

Строк культивування мікобактерій, доба	Кількість заражених морських свинок	Алергічне дослідження, доба		Загибло тварин	Тривалість дослід, доба	Туберкульозні зміни	
		20	30			+	-
9	2	-	+	2	60	2	-
30	2	-	+	2	41-55	2	-

* Результат: (+) – позитивний; (-) – негативний.

Усі морські свинки реагували на введення алергену на 30 добу досліді. Крім того, у тварин спостерігали виразки, які утворилися на місці введення завису мікобактерій, та схуднення до 20 % від початкової маси тіла.

Патолого-анатомічним дослідженням виявлені найяскравіші туберкульозні зміни в селезінці кожної загиблої піддослідної тварини, де чітко спостерігали різну кількість вогнищ (табл. 113).

Лімфатичні вузли, селезінка, печінка та легені були збільшені й ущільнені в усіх піддослідних тварин. Мінімальний індекс ураження внутрішніх

113. Ступінь ураження внутрішніх органів морських свинок, заражених різновіковою культурою *M. bovis* швидкорослого штаму

Строк культивування мікобактерій, доба	№ тварини	Специфічні ураження ¹				Індекс ураження
		лімфатичні вузли	селезінка	печінка	легені	
9	47	++	+++	–	++	16
	48	++	+++	–	++	16
30	49	+	++	–	–	5
	50	++	+++	–	++	16

¹Результати: (+) – поодинокі вузлики; (++) – декілька вузликів; (+++) – численні вузлики.

органів у морської свинки № 49 обумовлений відносно швидкою загибеллю (порівняно з іншими тваринами), у результаті чого специфічні зміни в інших органах макроскопічно не були виявлені.

Отже, досліджуваний епізоотичний швидкорослий штам *M. bovis* незалежно від тривалості культивування зумовив специфічні для туберкульозу ураження внутрішніх органів морських свинок, що свідчить про відсутність залежності між віком культури та ступенем вірулентності мікобактерій. Це узгоджується з даними результатів досліджень ліпідного складу 9- та 30-добових культур *M. bovis*, за якими в цілому принципівих відмінностей в його зрушеннях не було виявлено ані в якісному складі, ані в кількісному вмісті, хоча, і про це необхідно наголосити, й знизився вміст довголанцюгових жирних кислот в обох дослідних штамів порівняно з вихідною культурою.

6.2.9. Ліпідний склад *M. bovis* швидко- та повільнорослого штаму, культивованих на щільному середовищі з рН 7,1 та 6,5

Для дослідження використовували біомасу епізоотичного штаму *M. bovis* (друга генерація материнського штаму мікобактерій; рис. 153 зразок 1), виділеного з лімфатичних вузлів реагуючої на туберкулін корови та накопиченого на удосконаленому кафедрою епізоотології ДДАУ живильному середовищі для культивування мікобактерій (рН 6,5) за 37 °С протягом 30 діб. Із третього пасажу цей штам почав формувати колонії на другу добу після посіву (див. попередні розділи).

У подальшому мікобактерії швидкорослого штаму накопичували протягом 30 діб на тому ж середовищі тільки з рН 7,1–7,2 та з рН 6,5 за 37 °С.

Встановлено, що максимальна кількість загальних ліпідів відмічена в мікобактерій, накопичених на середовищі з рН 7,1–7,2.

Більшу частину ліпідних фракцій (рис. 154) складають нейтральні ліпіди ді- (ДГ), триацилгліцероли (ТГ), стерини (С), ефіри стеринів (ЕС). Триацил-

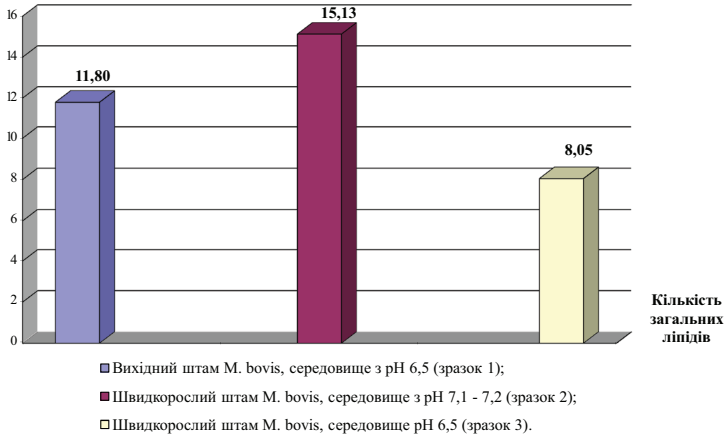


Рис. 153. Вміст загальних ліпідів штамів M. bovis, %

гліцероли – найбільша фракція нейтральних ліпідів мікобактерій: це – ефіри гліцерину і жирних кислот, які етерифікують всі три його гідроксильні групи. Вони вміщують тверді насичені (пальмітинову, стеаринову, гексакозанову), рідкі ненасичені (олеїнову, лінолеву, ліноленову, кротонову, ізокротонову) і розгалужені жирні кислоти (туберкулостеаринову і фтіонову).

Якщо у тварин і рослин ця група нейтральних жирів є запасною, то бактеріальна клітина не резервує їх, а використовує як проміжні метаболіти із широким спектром біологічних властивостей. Вони здатні стимулювати на шкірі здорових тварин утворення специфічних гранул, які складаються із моноцитів і епітеліоїдних клітин; у разі повторного введення – появу туберкул.

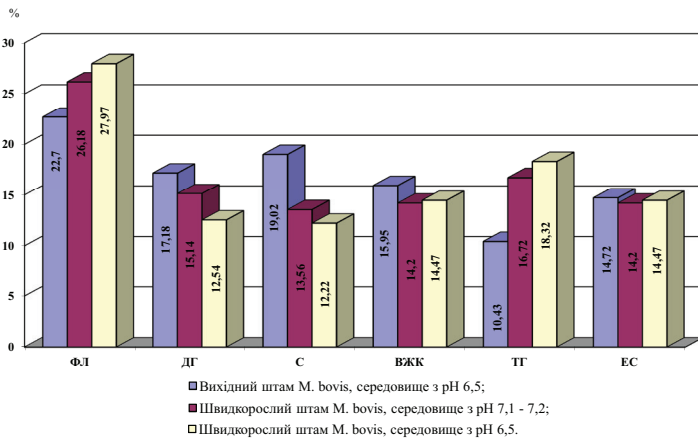


Рис. 154. Склад фракцій ліпідів у зразках (ТШХ-аналіз), % від суми

Триацилгліцероли послаблюють резистентність організму до туберкульозу, при цьому фтіонова кислота активно гальмує міграцію лейкоцитів.

Як засвідчили наші дослідження, у мікобактерій швидкорослого штаму, культивованих на середовищі з рН 7,1–7,2 та 6,5, відмічається підвищений вміст фосфоліпідів та триацилгліцеролів, на відміну від вихідної культури, в мікобактерій якої переважають діацилгліцероли, стерини, вільні жирні кислоти та ефіри стеринів.

При порівнянні даних досліджень швидкорослого штаму *M. bovis*, культивованих на середовищі з різним рН, встановлено, що мікроорганізми, інкубовані на середовищі з рН 7,1–7,2, вміщують більше діацилгліцеролів та стеринів, ніж такі, що інкубувалися на середовищі з рН 6,5, де переважає кількість фосфоліпідів і триацилгліцеролів. У той же час ефіри стеринів і ВЖК залишаються стабільною фракцією в умовах різного рН середовища.

Максимальний вміст ВЖК виявлено в мікобактерій вихідного штаму.

Методом газорідинної хроматографії було визначено жирнокислотний склад фракції вільних жирних кислот (табл. 114).

За літературними даними, жирнокислотний склад патогенних і непатогенних мікобактерій в основному однаковий і наведений насиченими жирними кислотами C_{12} – C_{24} , а також невеликою кількістю ненасичених і розгалужених аналогів цих кислот.

Нашими дослідженнями виявлено високий вміст насичених жирних кислот у мікобактерій, культивованих на рН середовищі 6,5. У *M. bovis*, культивованих на середовищі з рН 7,1–7,2, сума насичених ВЖК становила всього 42 %, а ненасичених досягала 58 %. Це, можливо, пов'язано з порушенням рівня метаболізму мікобактерій за зміни рН середовища в лужну сторону. За даними наукових публікацій, під час адаптації мікроорганізмів до несприятливих умов середовища включається механізм регуляції жирнокислотного складу і збільшується вміст ненасичених жирних кислот. Саме це спостерігалося і в наших дослідженнях.

У біомасі всіх досліджуваних мікобактерій виявлена велика кількість пальмітинової кислоти, яка є основним компонентом суміші вільних жирних кислот. Найбільша її кількість реєструється в мікобактерій, культивованих на середовищах з рН 6,5 та 7,1–7,2. Достатньо суттєвий вміст жирних кислот $C_{21:0}$ – $C_{24:0}$ виявлено в мікобактерій, культивованих на середовищі з рН 6,5 (швидкорослий штам), на відміну від інших мікобактерій (вихідний штам рН 6,5 та швидкорослий – рН 7,1–7,2), тобто незалежно від рН середовища. Не впливає рН середовища і на вміст пентакозанової кислоти, але спостерігається різниця її кількості залежно від штаму: у швидкорослого *M. bovis* рН 7,1–7,2 та 6,5 вміст цієї кислоти в два–три рази більше, ніж у вихідного повільнорослого – рН 6,5 (рис. 154).

Однак у співвідношенні деяких вільних жирних кислот спостерігається зміна залежно від рН середовища. Так, під час культивування вихідного й швидкорослого штамів на середовищі з рН 6,5 переважали стеаринова і арахінова кислоти (15 і 17 проти 7 і 5 % відповідно), а при рН 7,1–7,2 їх кількість знижувалася в 5 і більше разів. Проте за рН середовища 7,1–7,2 в мікобактерій різко збільшувався вміст олеїнової кислоти, тоді як у вихідного

114. Вільні жирні кислоти мікобактерій, % від суми

ВЖК	Код	рН середовища, штам		
		6,5, повільно-рослий	7,1–7,2, швидко-рослий	6,5, швидко-рослий
Лауринова	C _{12:0}	0,15±0,01	0,01±0,004***	0,04±0,02**
Тридеканова	C _{13:0}	сліди	0,07±0,01**	0,10±0,02**
Міристинова	C _{14:0}	0,26±0,02	0,16±0,02**	0,27±0,04**
Пентадеканова	C _{15:0}	сліди	0,16±0,04*	0,22±0,02***
Пальмітолеїнова	C _{16:1}	1,54±0,03	0,87±0,04***	0,55±0,07***
Пальмітинова	C _{16:0}	28,49±1,43	30,52±0,45	19,62±0,53**
Маргарінова	C _{17:0}	сліди	сліди	0,81±0,07***
Олеїнова	C _{18:1}	28,39±1,34	56,57±0,51***	23,87±0,60*
Стеаринова	C _{18:0}	15,09±0,56	сліди	7,42±0,11***
Лінолева + ліноленова	C _{18:2+} C _{18:3}	2,44±0,06	0,54±0,08***	2,97±0,16*
Нонадеканова	C _{19:0}	0,39±0,02	0,73±0,05**	3,34±0,06***
Арахінова	C _{20:0}	17,47±0,54	3,38±0,27***	5,23±0,14***
Генейкозанова	C _{21:0}	1,29±0,03	1,16±0,23	6,74±0,23***
Бегенова	C _{22:0}	1,54±0,05	0,18±0,05***	5,78±0,18***
Трикозанова	C _{23:0}	сліди	сліди	5,89±0,35***
Тетракозанова	C _{24:0}	0,65±0,03	0,60±0,2	5,57±0,19***
Пентакозанова	C _{25:0}	2,30±0,09	4,84±0,29**	7,43±0,26***
Гексакозанова	C _{26:0}	сліди	0,12±0,05	2,53±0,3**
Гептакозанова	C _{27:0}	сліди	0,09±0,03*	1,62±0,19**
Коротколанцюгові		94,22	93,01	64,44
Довголанцюгові		5,78	6,99	35,56
∑ ненасичених		32,37±0,9	57,98±0,43***	27,39±0,44**
∑ насичених		67,63±1,78	42,02±0,23***	72,61±0,5

та швидкорослого штамів (рН 6,5 та 6,5 відповідно) на середовищі з рН 6,5 її було в 2 рази менше за одночасного збільшення в 5 разів суми лінолевої та ліноленової кислот (2,44 та 2,97 % відповідно).

Зниження вмісту ненасичених жирних кислот на користь насичених з середовищем рН 6,5 у вихідного та швидкорослого штамів свідчить про те, що цей показник більш сприятливий для росту та розвитку *M. bovis*, оскільки, за літературними даними, переважання насичених ВЖК зазвичай характерно для мікобактерій.

Аналізуючи результати проведених досліджень, необхідно зазначити, що за культивування швидкорослого штаму *M. bovis* на живильному середовищі одного складу, але з різним рН спостерігаються зміни як у загальному, так і у фракційному складі ліпідів. Ці зміни стосуються рівня метаболізму *M. bovis* і

повністю підтверджують епізоотологічні спостереження та теоретикоекспериментальні дані досліджень, викладені нами в попередні роки (Ткаченко О.А., 1999), в яких наголошено, що рівень вмісту кислотних грам-еквівалентів внутрішнього середовища тварини та штучного живильного середовища активізує (за кислого) або ж пригнічує (за більш лужного середовища) адаптивну здатність мікобактерій. Імовірно, що ці прояви зумовлені захисною перебудовою метаболізму клітин у разі несприятливих умов, наприклад зневоднення. На нашу думку, це можна пов'язати зі змінами рН середовища в негативний бік. У клітинах мікобактерій ненасичені жирні кислоти при вбудовуванні в ліпіди мембран, напевне, спонукають збільшення їх плинність. Це сприяє виживанню клітин, якщо змінюються температура, рН середовища й т. ін. Коливання у вмісті деяких насичених та ненасичених жирних кислот у клітинних стінках мікобактерій відображає, скоріше за все, фізіологічні особливості клітин і, можливо, корелює зі швидкістю дихання та фазою росту популяції в цілому, а також з фізикохімічним станом (плинністю) ліпідів мембран і напрямом адаптаційних процесів.

Отже, у *M. bovis* швидкорослої культури, одержаної на середовищі з рН 7,1–7,2, кількість загальних ліпідів в 1,3–2,0 рази вище, ніж у вихідного та швидкорослого штаму, культивованого на середовищі з рН 6,5. В обох зразках швидкорослого штаму *M. bovis* зафіксована підвищений вміст фосfolіпідів і триацилгліцеролів порівняно з вихідною культурою, в якій переважають діацилгліцероли, стерини, вільні жирні кислоти та ефіри стеринів. У біомасі швидкорослого штаму *M. bovis*, культивованого на середовищі з рН 7,1–7,2, переважає кількість діацилгліцеролів та стеринів, а за вирощування на середовищі з рН 6,5 – більше фосfolіпідів та триацилгліцеролів, що зумовлено впливом кислотнolужних грам-еквівалентів на синтез хімічних складових мікобактерій.

У зразках мікобактерій, культивованих на середовищі з рН 6,5, рівень насичених жирних кислот вищий в 1,6–1,7 рази, ніж за культивування на середовищі з рН 7,1–7,2. Ненасичені жирні кислоти домінують в мікобактерій, які культивовані на середовищі з рН 7,1–7,2. Підвищення рівня ненасичених жирних кислот має адаптивний характер та є результатом механізму регуляції жирнокислотного складу і активації синтезних систем за порушення рівня метаболізму.

Досить показовими в цьому напрямі є динаміка вмісту коротко- ($C_{12:0}$ – $C_{20:0}$) та довголанцюгових ($C_{21:0}$ – $C_{27:0}$) вільних жирних кислот. Практично на одному рівні вони вміщуються в мікобактерій вихідної повільнорослої культури, яка одержана на середовищі з рН 6,5 та її швидкорослої субкультури, одержаної на середовищі з рН 7,1–7,2 (94,22 та 5,78 % і 93,01 та 6,99 % відповідно). У мікобактерій швидкорослого штаму, що культивувалися на середовищі з рН 6,5 співвідношення довго- й коротколанцюгових вільних жирних кислот суттєво змінилося: з 35,56 до 64,44 % відповідно. Це підтверджує думку про те, що рН середовища 6,5 є більш придатним для підтримання й збереження біологічної активності швидкорослих мікобактерій перших генерацій (після виділення збудника з біологічного матеріалу тварин), хоча й відмічається дещо нижчий вміст (порівняно з іншими дослідженими мікобактеріями) загальних ліпідів (8,5 % проти 11,8 та 15,13 % відповідно).

6.2.10. Залежність рівня вмісту ліпідів *M. bovis* від гідрогумату

Питання оптимального живильного середовища для культивування мікобактерій залишається досить актуальним серед проблем сучасної ветеринарної мікробіології. Збудник туберкульозу, особливо змінені морфологічні форми, є достатньо вибагливим до складу живильних середовищ, умов культивування і відноситься до мікроорганізмів, які важко піддаються виділенню на живильних середовищах.

Роботи Р.А. Нуратінова (2004) та Н.Г. Павлова (2006) вказують, що деякі речовини гумінової природи, за внесення їх у живильні середовища, можуть дещо пришвидшити розмноження мікобактерій і покращити якість лабораторної діагностики туберкульозу.

Інші вчені повідомляють про те, що препарати гумінової природи посилюють розмноження та розвиток окремих видів мікроорганізмів і ступінь стимуляції може бути достатньо високим і залежати від дози препарату, живильного середовища та умов навколишнього середовища. Активна речовина препаратів, проникаючи в клітину, здійснює пряму мембранотропну дію, сприяючи перебудові мембрани та зміні в ланцюзі метаболічних реакцій.

У зв'язку з такими повідомленнями виникла необхідність вивчити ступінь залежності адаптивної здатності *M. bovis* від впливу гідрогумату.

Вплив гідрогумату на інтенсивність росту культури M. bovis. Для цього в роботі використано *M. bovis* музейного повільнорослого штаму “Шахтар” та такі, що виділені з біологічного матеріалу (лімфатичні вузли) реагуючої на ППД-туберкулін для свавців великої рогатої худоби неблагополучного щодо туберкульозу господарства. З метою визначення бактеріологічної ефективності використали середовище Мордовського з гідрогуматом різної концентрації. Контролем слугувало стандартне середовище Мордовського з рН 6,5 та сухе живильне середовище для культивування мікобактерій ДП “Ветеринарна медицина” (м. Харків), рН 7,1–7,2.

З'ясування впливу гідрогумату на швидкість росту мікобактерій проводили шляхом приготування середовища Мордовського дев'яти варіантів із поступовим зниженням концентрації досліджуваного препарату методом послідовних розведень. На початку готували робочі розведення препарату для додавання до середовища Мордовського. За відправну точку розведення гідрогумату використано концентрацію 0,25 %. Розведення проводили за схемою:

1) стерильний робочий розчин гідрогумату 0,25%-вого – 4 см³, і з нього додавали по 0,5 см³ в 4 пробірки з некоагульованим середовищем Мордовського рН 6,5;

2) додавали до залишку розчину 2 см³ стерильної дистильованої води і отримували 4 см³ 0,125%-вого розчину гідрогумату, з нього теж додавали по 0,5 см³ в 4 пробірки з некоагульованим середовищем Мордовського рН 6,5 і так далі;

3) 2 см³ 0,125%-вого розчину гідрогумату + 2 см³ дистильованої води = 4 см³ 0,06%-вого;

4) 2 см^3 0,06%-вого розчину гідрогумату + 2 см^3 дистильованої води = 4 см^3 0,03%-вого;

5) 2 см^3 0,03%-вого розчину гідрогумату + 2 см^3 дистильованої води = 4 см^3 0,015%-вого;

6) 2 см^3 0,015%-вого розчину гідрогумату + 2 см^3 дистильованої води = 4 см^3 0,008%-вого;

7) 2 см^3 0,008%-вого розчину гідрогумату + 2 см^3 дистильованої води = 4 см^3 0,004%-вого;

8) 2 см^3 0,004%-вого розчину гідрогумату + 2 см^3 дистильованої води = 4 см^3 0,002%-вого;

9) 2 см^3 0,002%-вого розчину гідрогумату + 2 см^3 дистильованої води = 4 см^3 0,001 %-вого.

Середовище пробірки з певною концентрацією розчину гідрогумату коагулювали в скошеному положенні за температури $90 \text{ }^\circ\text{C}$ протягом 60 хв.

Далі:

1) готували завис *M. bovis* штаму “Шахтар”: 1 мг культури на 1 см^3 фізіологічного розчину; проводили мікроскопію;

2) посів завису на середовище Мордовського з різною концентрацією гідрогумату; контролем слугувало стандартне живильне середовище Мордовського;

3) облік росту колоній проводили через 2–3 доби протягом перших 10 та кожні 5 діб протягом наступних 80, з описом їх кількості, вивченням морфологічних ознак та тинкторіальних властивостей мікобактерій.

Розмір колоній визначали за критеріями:

- дрібні колонії (1–2 мм);
- середні колонії (2–4 мм);
- великі колонії (більше 4 мм).

Наступним етапом стало дослідження ефективності середовища для виділення збудника із проб біологічного матеріалу (лімфатичні вузли) великої рогатої худоби неблагополучних щодо туберкульозу господарств.

Схема досліду полягала у препаруванні 8 проб біологічного матеріалу з метою виявлення та опису змін, характерних для туберкульозу: п’ять проб зі змінами, характерними для туберкульозу, три – без змін.

Суспензію, яку приготували з біологічного матеріалу, висівали, на середовища Мордовського⁽¹⁾, Мордовського з додаванням гідрогумату⁽²⁾ та сухе живильне середовище⁽³⁾ для культивування мікобактерій ДП “Ветеринарна медицина” (м. Харків) рН 7,1–7,2. У процесі культивування посівів вивчали культуральні властивості та морфологічні ознаки мікобактерій колоній.

Для вивчення впливу досліджуваного препарату на інтенсивність розмноження *M. bovis* проведено порівняльне дослідження кількості накопиченої біомаси *M. bovis* епізоотичного штаму на середовищі з гідрогуматом та середовищі Мордовського. З цією метою провели висів підготовленого завису *M. bovis* з розрахунку 1 мг на 1 см^3 фізіологічного розчину на 120 пробірок середовища Мордовського та на 120 пробірок такого самого середовища з

додаванням гідрогумату в концентрації 0,125 %. Зняття культури проводили на 30 добу, з часу появи колоній.

У результаті вивчення ростових властивостей мікобактерій на середовищах з гідрогуматом встановлено (рис. 155 та 156), що перші колонії з'явилися на 13 добу на середовищах з концентрацією гідрогумату 0,25 та 0,125 %.

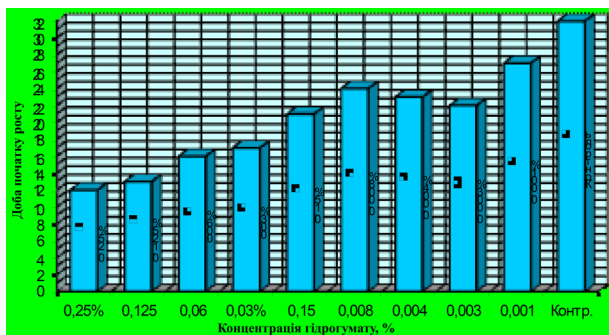


Рис. 155. Ріст культури *M. bovis* штаму “Шахтар” на середовищі з гідрогуматом

Найбільша (середня) кількість колоній – $8,5 \pm 2,10$ на 10 добу від початку росту спостерігалася на середовищі з розведенням гідрогумату 0,125 %, у контролі – $3,0 \pm 0,40$, що в 2,83 раза ($P > 0,95$) менше, ніж на дослідному середовищі.

Колонії на середовищах з різним розведенням гідрогумату за зовнішнім виглядом відрізнялися від вихідної культури *M. bovis* штаму “Шахтар”. Вони були більшими за розміром (середні та великі), відмічалась поява, крім S-форм, колоній вихідного штаму і R-форм.

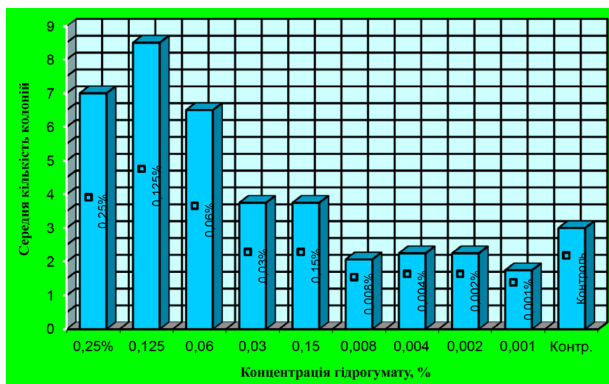


Рис. 156. Кількість колоній *M. bovis* штаму “Шахтар” на 10 добу від початку росту на середовищі з гідрогуматом

Ріст колоній мікобактерій на середовищі з нижчою концентрацією гідрогумату спостерігався у більш віддалений строк. Мікроскопія мазків приготвлених культур: короткі червоні зернисті палички зі заокругленими кінцями. У контролі ріст колоній спостерігався на 32 добу.

Отже, із зазначеного можна зробити висновок, що середовище Мордовського з додаванням 0,125%-вого розчину гідрогумату в 2,83 раза ефективніше порівняно зі звичайним середовищем Мордовського ($P > 0,95$).

Виділення культури збудника туберкульозу з патологічного матеріалу на середовищі з різним рН та розчином гідрогума-

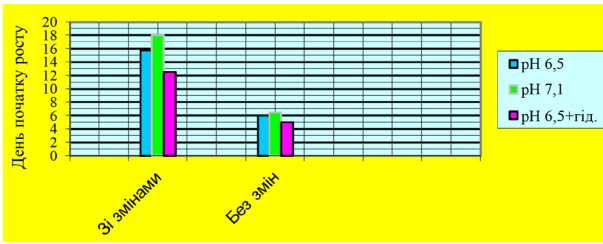


Рис. 157. Ріст культур мікобактерій на середовищах

середовищі для культивування мікобактерій ДП “Ветеринарна медицина” – $18,0 \pm 2,44$ доби, а на середовищі Мордовського за pH 6,5 з розчином гідрогумату 0,125 % – $12,5 \pm 0,64$.

Різниця початку росту колоній між стандартним середовищами Мордовського та середовищами з гідрогуматом становила 1,26 раза, ДП “Ветеринарна медицина” з pH 7,1 – 1,44 раза.

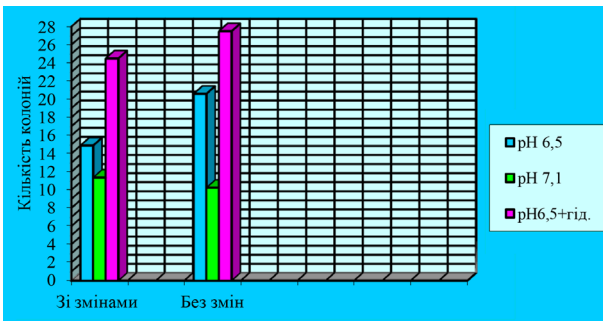


Рис. 158. Кількість колоній мікобактерій на 10 добу від початку росту

стандартному середовищі Мордовського та середовищі з гідрогуматом дорівнювала 1,2 раза, а в ДП “Ветеринарна медицина” pH 7,1–7,2 – 1,3 раза.

Середня кількість колоній на 10 добу від початку росту в посівах з проб патологічного матеріалу зі змінами на середовищі Мордовського з розчином гідрогумату в 1,64–2,15 раза була вищою відповідно середовища Мордовського та сухого живильного середовища для культивування мікобактерій ДП “Ветеринарна медицина”.

Середній показник кількості колоній на 10 добу від початку росту в пробах без змін на середовищі Мордовського дорівнював $20,6 \pm 12,8$, на середовищі Мордовського з розчином гідрогумату – $27,5 \pm 17,25$, а на середовищі ДП “Ветеринарна медицина” – $10,25 \pm 4,0$, що в 1,33–2,68 раза менше, ніж на першому середовищі.

За морфологією колоній мікобактерій, виділені з проб патологічного матеріалу, зі змінами були S-форми, дрібні та середні, кольору слонової кістки, во-

ту 0,125 % наведено на рис. 157 та 158.

Під час аналізу даних встановлено, що середній показник початку росту колоній з проб зі змінами на середовищі Мордовського становить $15,75 \pm 2,09$ доби, на живильному

Середній показник початку росту колоній у пробах без змін на середовищі Мордовського становив $6,0 \pm 0$ діб, на середовищі Мордовського з розчином гідрогумату – $5,0 \pm 0$ діб, ДП “Ветеринарна медицина” з pH 7,1 – $6,5 \pm 0,5$ доби. Різниця між початком росту колоній на

логі. Морфологічні характеристики колоній мікобактерій, виділених із проб, без змін – R- та S-форми, дрібні та середні, жовтого та білого кольорів, вологі. Мікроскопія мікобактерій, виділених із проб, зі змінами – короткі, червоні, зернисті палички зі заокругленими кінцями. Мікроскопія штамів проб без змін – червоні палички короткі та довгі, зі заокругленими краями, кокоподібні та сегментовані, зернисті.

Як засвідчили дослідження, гідрогумат за оптимальної концентрації в середовищі та однакових умов культивування суттєво впливає на інтенсивність накопичення *M. bovis* епізоотичного штаму. На 30 добу від початку росту колоній на середовищі з гідрогуматом об'єм знятої культури був у 18,6 раза більшим за масою, ніж за аналогічний термін культивування на середовищі Мордовського.

Одержані дані також показали, що гідрогумат суттєво впливає на інтенсивність розмноження *M. bovis* музейних та епізоотичних штамів.

Внесення гідрогумату в штучне живильне середовище в концентрації 0,125 % підвищує термін появи перших колоній в 1,2–1,44 раза та їх кількість в 1,33–2,68 раза.

На 30 добу від початку росту колоній на середовищі з гідрогуматом об'єм знятої культури був у 18,6 раза більшим за масою, ніж за аналогічний термін культивування на середовищі Мордовського.

Отже, гідрогумат в концентрації 0,125 %, внесений в щільне середовище, підвищує біологічну активність (зокрема росту) мікобактерій. Звичайно, це відбувається за рахунок інтенсифікації метаболічних процесів мікробної клітини.

Ліпідний склад M. bovis, культивованих на середовищі з гідрогуматом. Одержавши обнадійливі результати під час дослідження впливу гідрогумату на інтенсивність росту *M. bovis*, обґрунтованими виявилися досліді з вивчення ліпідів мікобактерій, культивованих з цією стимулювальною речовиною. Можливо, виявлення нових закономірностей у накопиченні тих чи інших ліпідів мікобактеріями на середовищі з гідрогуматом сприятиме з'ясуванню, до певної міри, однієї з багатьох біологічних властивостей – механізму посилення чи сповільнення інтенсивності розмноження мікобактерій, а отже, і перебігу інфекційного процесу туберкульозу.

Для дослідження ліпідного складу використано *M. bovis* епізоотичного штаму, які виділено з лімфатичних вузлів реагуючої на ППД-туберкулін корови неблагополучного щодо туберкульозу господарства (див. попередні розділи). Культуру *M. bovis* накопичували на звичайному середовищі (контроль) та на середовищі з додаванням 0,125%-вого розчину гідрогумату (дослід), наведена концентрація якого є найбільш оптимальною для стимуляції розмноження мікобактерій, про що повідомлено вище. Культивування посівів проводили за температури 37 °C протягом 30 діб від початку росту колоній.

Для виділення загальних ліпідів, компонентного складу фракцій вільних жирних кислот досліджуваних *M. bovis* використали раніше наведені методи.

У результаті дослідження встановлено, що загальна кількість ліпідів у контрольному зразку біомаси *M. bovis* становила 5,2 % від суми, а в до-

слідному цей показник дорівнював 4,2 % від суми, що в 1,2 раза менше, ніж у контролі.

За допомогою методу тонкошарової хроматографії визначали основні фракції ліпідів: фосфоліпіди (полярні ліпіди), діацилгліцероли, стерини, вільні жирні кислоти, триацилгліцероли, ефіри стеринів.

Вміст полярних фосфоліпідів у контрольному зразку біомаси *M. bovis* становив 20,88 % від суми фракцій ліпідів, а в дослідному – 19,44 %, що в 1,07 раза менше, ніж у контролі. Вміст триацилгліцеролів у дослідному зразку дорівнював 15,74 %, а в контролі – 15,51 %, що свідчить практично про однаковий вміст їх у досліджуваних мікобактерій.

Фракція стеринів в контрольному зразку мікобактерій становила 15,82 %, а в дослідному – 14,82 %, що в 1,06 раза більше, ніж у мікобактерій, які були культивовані на середовищі з 0,125%-вим розчином гідрогумату.

Фракції діацилгліцеролів, вільних жирних кислот, ефірів стеринів, у досліджуваних мікобактерій перевищували їх вміст у контролі і становили відповідно для середовища з 0,125%-вим розчином гідрогумату 16,98; 15,12; 17,90, а для контролю – 16,77; 14,56; 16,46.

У результаті дослідження жирнокислотного складу фракцій вільних жирних кислот встановлено (табл. 115), що вміст ненасичених вільних жирних кислот у дослідному зразку становив 35,53 %, а в контрольному – 40,54 %, що в 1,14 раза більше, ніж на середовищі з додаванням 0,125%-ного розчину гідрогумату.

Вміст насичених кислот у досліді був вищим в 1,08 раза і становив 64,47 % проти 59,46 % у контролі.

Коефіцієнт ненасиченості в досліді становив 0,55, а в контролі 0,68. У зв'язку з цим необхідно зазначити, що за дії несприятливих факторів на мікобактерії, культивовані на живильних середовищах, включається механізм адаптації і збільшується вміст ненасичених жирних кислот. З огляду на дані наших досліджень, можна припустити, що гідрогумат у складі щільного живильного середовища сприяє метаболізму мікобактерій і створює більш благоприємні умови для їх розмноження.

У дослідному зразку біомаси мікобактерій виявлено підвищений вміст пальмітинової кислоти, яка є основним компонентом вільних жирних кислот мікобактерій. Проте в контролі спостерігалось збільшення вмісту олеїнової кислоти (35,81 проти 30,34 % у дослідному зразку) за одночасного зменшення вмісту комплексу лінолева + ліноленова кислоти (із 3,77 % у контролі до 4,87 % у досліді).

Аналіз засвідчив, що при культивуванні *M. bovis* епізоотичного штаму на звичайному щільному середовищі та на середовищі з додаванням гідрогумату відбувається зміна загальної кількості ліпідів і їх фракційного складу. Зменшення загальної кількості ліпідів у дослідному зразку, що, напевне, пов'язано зі стимулювальною дією гідрогумату на розмноження мікобактерій, призводить на такому тлі до збільшення кількості насичених жирних кислот та попередження надмірно різкої перебудови метаболізму.

115. Вільні жирні кислоти мікобактерій, % від суми*

Вільна жирна кислота	Код	Зразок, % від Σ	
		1 (контроль)	2 (дослід)
Міристинова	C _{14:0}	0,32	0,18
Пентадеканова	C _{15:0}	0,21	0,38
Пальмітолеїнова	C _{16:1}	0,96	0,32
Пальмітинова	C _{16:0}	21,00	22,33
Маргарінова	C _{17:0}	1,07	3,01
Олеїнова	C _{18:1}	35,81	30,34
Стеаринова	C _{18:0}	10,23	11,68
Лінолева + ліноленова	C _{18:2,3}	3,77	4,87
Нонадеканова	C _{19:0}	1,81	2,04
Арахінова	C _{20:0}	0,14	0,17
Генейкозанова	C _{21:0}	1,78	1,66
Бегенова	C _{22:0}	19,75	16,95
Трикозанова	C _{23:0}	0,55	0,09
Тетракозанова	C _{24:0}	1,20	0,59
Пентакозанова	C _{25:0}	2,10	5,39
Σ ненасичених		40,54	35,53
Σ насичених		59,46	64,47
Коефіцієнт ненасиченості		0,68	0,55
* C _{A:O} – насичена жирна кислота (A – кількість атомів вуглецю); C _{A:H} – ненасичена жирна кислота (H – кількість подвійних зв'язків).			

Отже, у дослідному зразку біомаси *M. bovis* епізоотичного штаму вміст загальних ліпідів у 1,2 раза нижчий, ніж у контролі, що можна мотивувати пришвидшенням росту мікобактерій під дією 0,125%-вого розчину гідрогумату.

Загальна кількість фракцій насичених жирних кислот у зразку мікобактерій, культивованих на середовищі з додаванням 0,125%-вого розчину гідрогумату, вища, ніж у контролі, що свідчить про позитивний вплив цієї речовини на метаболізм мікобактерій.

6.2.11. Ліпіди (фосфоліпіди) багаторазово пасажованих *M. bovis* дисоціативних форм

Зазначимо, що з об'єктивних причин (призупинення фінансування) можливості проведення досліджень вмісту ліпідів мікобактерій в лабораторії Дніпропетровського національного університету ім. Олеся Гончара, де досліджували попередні субкультури цього материнського штаму, такі досліді проведені за безпосередньої участі провідного фахівця Ю.В. Глухової Центру обласної державної родючості м. Дніпро за дещо іншою методикою. У тако-

му випадку необхідно було вивчити ліпідний склад мікобактерій патогенного штаму, який досліджений за іншою методикою (Давиденко П.О. й співавт., у 2011). Такий методологічно-організаційний підхід, на наш погляд, виправданий з позиції об'єктивності результатів досліджень.

Такі дослідження виявилися обґрунтованими у зв'язку з суттєвими відмінностями між відібраними для хроматографічного аналізу мікобактеріями 118 генерації (L-форм), культивованими на середовищі Левенштейна-Йенсена за різних температур. Мікроскопічними дослідженнями було встановлено мікобактерії з різною морфологією та кислотостійкістю (рис. 159). Так, за традиційної температури культивування (37 °С) мікобактерії: 1 – патогенного штаму, кислотостійкі короткі зернисті палички; 2 – культури-ревертанта, некислотостійкі короткі й більш довгі зернисті палички та кислотостійкі елементарні тільця; 3, 4 – некислотостійкі короткі й більші мікобактерії (деякі з них вміщують кислотостійкі зерна) та поодинокі окремо розташовані кислотостійкі елементарні тільця.

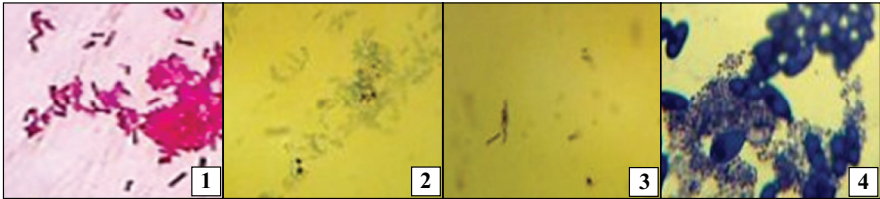


Рис. 159. *M. bovis*: 1 – патогенного штаму;
2 – дисоціативних форм культури-ревертанта, виділені від морської свинки;
3, 4 – дисоціативних форм, культивовані за 37 і 3 °С (50 субкультура)
×1600

Принципово відрізняються від 1–3-х попередніх мікобактерії 4, які культивувалися за 3 °С – некислотостійкі, овальної форми утворення з різною оптичною густиною поверхні, з яких звільняються некислотостійкі зерна, що розташовуються в овалах і поблизу них.

Відмітимо, що за температури 37 °С культура одержана з певним інтервалом повторних посівів, бо систематичні пересіви призводили до втрати культури.

У результаті досліджень загальних ліпідів встановлено (табл. 116), що патогенний штам *M. bovis* вміщує найвищу їх кількість ($29,07 \pm 0,021$ %). Мікобактерії – дисоціанти 50 субкультури, одержані за 37 і 3 °С культивування, вміщували відповідно в 2,54 та 2,66 раза менше ліпідів, а мікобактерії, які 9 місяців персистували в організмі морської свинки, – в 3,48 раза, ніж мікобактерії патогенного штаму материнської культури.

Зіставляючи отримані дані з результатами досліджень П.О. Давиденка (2010) цих же форм мікобактерій, але перших генерацій (субкультур), можна стверджувати, що між мікроорганізмами не відбулося суттєвих змін, оскільки в ці-

**116. Загальні ліпіди патогенного штаму *M. bovis*
та його дисоціативних форм, % на наважку**

Загальні ліпіди мікобактерій			
Патогенні (100 пасаж)	культура-ревертант (морська свинка)	субкультура	
		37 °C	3 °C
29,07±0,021	8,35±0,27	11,42±0,12	10,91±0,07

лому вони співпадають: відповідно до патогенного штаму (100 субкультура) за температури 3 °C культивування дисоціативні форми перших генерацій вміщували в 4,04 раза, за 37 °C – в 1,36 раза менше загальних ліпідів, що сумарно за двома субкультурами (накопичені при 3 і 37 °C) в 2,7 раза менше. Це свідчить про стабільність синтезу загальних ліпідів на тлі динамічних змін морфологічних ознак й тинкторіальних властивостей *M. bovis* дисоціативних форм.

Вивчаючи фракційний склад досліджуваних мікобактерій встановлено (табл. 117), що в загальному вони вміщують шість і більше фракцій (фосфоліпіди мікобактерій культури-ревертанта, виділені з матеріалу морської свинки, поділилися на дві групи, у тому числі одна неідентифікована). Проте кількісний вміст кожної із фракцій суттєво відрізняється. Так, мікобактерії патогенного штаму найбільше вміщували неідентифікованої фракції (50,53±0,31 %), удвічі менше холестерину (24,6±0,27 %). Вміст дигліцеридів становив 12,43± 0,26 %, а фосфоліпідів та тригліцеролів – по 6,41±0,07 та 6,03±0,14 % відповідно.

Дещо інший кількісний склад наведених фракцій виявлено у мікобактерій (культура-ревертант), що виділені з біоматеріалу морської свинки. При цьому показовими виявилися дані по холестерину, якого вміщувалося в 1,26 раза менше, ніж у патогенних мікобактерій, тригліцеридах – більше в 1,28 та

**117. Фракції загальних ліпідів патогенного штаму *M. bovis*
та його дисоціативних форм, % від суми**

№ п/п	Фракція	<i>M. bovis</i>			
		патогенні (100 субкультура)	культура- ревертант (морська свинка)	50 субкультура	
				37 °C	3 °C
1.	Фосфоліпіди	6,41±0,07	6,45±0,31	6,07±0,05	4,3±0,29
2.	Фосфоліпіди	-	3,59±0,33	-	-
3.	Холестерин	24,6±0,27	19,01±0,2	22,69±0,25	4,69±0,31
4.	Неідентифікована	50,53±0,31	48,69±0,36	36,62±0,27	69,96±0,22
5.	Дигліцериди	12,43±0,26	14,51±0,32	23,6±0,3	7,49±0,23
6.	Тригліцериди	6,03±0,14	7,75±0,32	11,05±0,14	-
7.	Моногліцериди	-	-	-	13,56±0,34
		100,0	100,0	100,0	100,0

фосфоліпідах (2 частина) у мікобактерій культури-ревертанта (3,59 %), яких не виявляли в патогенних та інших мікобактерій. Це свідчить, в останньому випадку, що персистенція мікобактерій в тканинах макроорганізму супроводжується розширенням спектра синтезу фосфоліпідів.

Більш показовими виявилися результати дослідження дисоціативних форм материнської культури *M. bovis*. При цьому мікобактерії, які культивувалися за 37 °С, здебільшого вміщували неідентифіковану фракцію (36,62±0,27 %). Проте вміст дигліцеридів (23,6 %) виявився в 1,89 раза вищим, ніж у патогенного штаму, практично в два рази підвищився вміст тригліцеридів – з 6,03±0,14 у патогенних мікобактерій до 11,05±0,14 % – у мікобактерій, культивованих за 37°С.

Реально на одному рівні, з двома попередніми варіантами мікобактерій залишалися фосфоліпіди (6,07±0,05 %).

Принципово інший якісний і кількісний склад фракцій виявлено в мікобактерій дисоціативних форм, культивованих за температури 3 °С. Утім не виділені тригліцериди, але встановлені моногліцериди (13,56±0,34 %), які не виявлялися в мікобактерій трьох попередньо аналізованих варіантів.

Вміст неідентифікованої фракції суттєво підвищився порівняно з такою в патогенних мікобактерій (з 50,53±0,31 % до 69,96±0,22 %), культивованих за 3 °С (в 1,38 раза). Рівень фосфоліпідів знизився з 6,41±0,07 % (патогенні мікобактерії) до 4,3±0,29 % (в 1,49 раза), холестерин – з 24,6±0,27 % до 4,69±0,31 % (у 5,24 раза); дигліцериди з 12,43±0,26 % до 7,49±0,23 % (в 1,65 раза).

Аналізуючи результати досліджень, ідентифікували тільки чотири фосфоліпіди, незалежно від варіанта мікобактерій (табл. 118), які за кількісним вмістом суттєво відрізняються. Патогенні мікобактерії найбільше вміщують кефаліну (47,32±0,13 %) та кардіоліпіну (43,41±0,24 %). Лецитину та олеїллецитину вміщується значно менше. Мікобактерії культури-ревертанта характеризуються високим рівнем кардіоліпіну та кефаліну, але першого все-таки в 1,25 раза менше, ніж у патогенних мікобактерій. Водночас на цьому тлі в мікобактерій культури-ревертанта олеїллецитину в 2,8 раза більше, ніж у мікобактерій вихідного штаму.

118. Фосфоліпіди *M. bovis* патогенного штаму і його дисоціативних форм, % від суми

№ п/п	Фосфоліпід	<i>M. bovis</i>			
		патогенний штам	культура-ревертанта	50 субкультура, культивована за температури	
				37 °С	3 °С
1.	Олеїллецитин	3,35±0,14	9,44±1,58	12,07±0,09	6,24±0,11
2.	Лецитин	5,92±0,12	5,9±0,11	8,04±0,07	3,3±0,14
3.	Кардіоліпін	43,41±0,24	34,63±0,17	44,98±0,15	53,15±0,12
4.	Кефалін	47,32±0,13	50,03±0,09	34,91±0,1	37,31±0,13
		100,0	100,0	100,0	100,0

Суттєво відрізнявся вміст фосфоліпідів у мікобактерій 50 субкультури, яка культивувалася за різних температур. Кардіоліпін та кефалін займали високий рівень, але останнього, відносно мікобактерій патогенного штаму, було менше в 1,35 раза.

Вміст олеїллецитину підвищився у 3,6 раза, а лецитину – в 1,4 раза.

Мікобактерії, які культивувалися за 3 °С, олеїллицетину вміщували в 1,86 раза більше, ніж патогенний збудник, проте він виявився нижчим порівняно з такими, що культивувалися за 37 °С, в 1,93 раза.

Лецитину в 1,79 раза менше вміщувалося в мікобактерій, пасажованих 50 разів за температури 3 °С, порівняно з патогенними мікобактеріями, та в 2,43 раза в мікобактерій, що культивувалися за 37 °С.

Вміст кефаліну та кардіоліпіну залишався високим у мікобактерій досліджуваних варіантів. Проте останній підвищився з $43,41 \pm 0,24$ % у патогенних мікобактерій до $53,15 \pm 0,12$ % в апатогенних (дисоціативних форм), а перший, навпаки, знизився з $47,32 \pm 0,13$ % до $37,31 \pm 0,13$ % відповідно.

Отже, вміст загальних ліпідів, їх фракцій та фосфоліпідів у досліджуваних мікобактерій різний, що впливає на вірулентність. Проте їх кількість залежить від температури культивування, вплив якої суттєво змінює якісний склад і кількісний вміст фракцій загальних ліпідів. В авірулентних мікобактерій, культивованих за 3 °С, не синтезуються тригліцериди та синтезуються моногліцериди, що свідчить про особливості метаболізму та синтезних систем в умовах низьких плюсових температур.

Такі зміни ліпідного складу, й фосфоліпідів зокрема, могли супроводжуватися, на тлі втрати патогенності, збереженням імуногенної активності та зниженням (втратою) сенсibiliзувальної здатності, що може виявитися ефективним при конструюванні протитуберкульозної вакцини.

Водночас з'ясування особливостей культуральних, тинкторіальних, біохімічних властивостей, морфогенезу в умовах середовища та за різних температур, а також патогенності й сенсibiliзувальної здатності в L- та інших формах досліджуваних мікобактерій, які активно розмножуються за низьких плюсових температур, та враховуючи літературні повідомлення щодо наявності в мікроорганізмів таких форм імуногенної активності, обґрунтованими виявилися подальші експерименти з виявлення в досліджуваних мікобактерій, зокрема L- та інших форм (118 пересів), таких можливостей, які викладені в розділі книги „Імуногенність дисоціативних L- та інших форм”.

Узагальнюючи та обмірковуючи результати значної роботи з вивчення ліпідного складу мікобактерій, у тому числі й дисоціативних форм, багаторазово пасажованих через живильне середовище з різним рН, можна відзначити ідентичність їх фракцій, якісного складу вільних жирних кислот штаму *Vallee*, *BCG*, окремих видів атипичних мікобактерій.

Поряд з цим з'ясувалося, що зі збільшенням кількості пересівів, зміною морфологічних ознак, тинкторіальних властивостей на тлі швидкості розмноження змінюються ліпідний склад мікобактерій, структура якості й вмісту вільних жирних кислот: збільшується кількість коротколанцюгових й знижу-

ється вміст чи повне зникнення (звичайно, на діагностичному рівні) довголанцюгових жирних кислот.

На тлі таких змін метаболічних процесів мікробної клітини скелетні вільні жирні кислоти (пальмітинова, олеїнова, стеаринова) лишаються стабільними в кількісному та якісному відношенні, навіть у дисоціативних форм, які культивуються за низьких плюсових температур й мають властивості атипових мікобактерій.

Наяву тривалі, з багаторазовими пересівами дослідження субкультур одного материнського штаму дали можливість дещо по-новому розглянути та оцінити повідомлення ряду дослідників попередніх років, які вивчали ліпідний склад мікобактерій з різною вірулентністю, швидкістю росту, морфологічною ознакою й ін. Стверджуючи закономірні дані, які характерні для того чи іншого штаму мікобактерій, наші дослідження свідчать про те, що практично не змінюється склад фракцій та вільних жирних кислот, хоча вміст загальних ліпідів тенденційно знижується зі зниженням ступеня вірулентності. Водночас таке явище супроводжується збільшенням вмісту коротколанцюгових та зниженням – довголанцюгових вільних жирних кислот.

Акцентуючи увагу на цьому положенні, яке, принагідно підкреслимо, узгоджується з повідомленням дослідників минулих років, необхідно наголосити й на факті, що кислотостійкість не пов'язана із вмістом загальних ліпідів мікобактерій, їх вірулентністю, про взаємозв'язок яких стверджують автори, згадані в огляді літератури до цього розділу. Так, у мікобактерій штаму *BCG*, дисоціативних форм *M. bovis* перших генерацій вміст загальних ліпідів, за нашими дослідженнями, становив $1,74 \pm 0,28$ та $2,2 \pm 0,31$ – $2,6 \pm 0,32$ % на наважку відповідно з втраченою вірулентністю, а в таких патогенних штамів *Vallee* та нашого вірулентного швидкорослого (повільнорослого) – $8,82 \pm 0,79$ та $11,8 \pm 1,60$ %. Між тим здатність утримувати фуксин зберігають як авірулентні, так і вірулентні мікобактерії. За цього фракційний склад загальних ліпідів ідентичний за якістю та кількісним вмістом. Проте в авірулентних мікобактерій не тільки знижується вміст довголанцюгових вільних жирних кислот, але й припиняється синтез узагалі деяких з них.

Повертаючись до скелетних вільних жирних кислот, які ми досліджували в різні періоди роботи, можна засвідчити (*табл. 119*), звичайно з певною обережністю, що незалежно від біологічної активності мікобактерій вміст аналізованих кислот практично не відрізняється. Хоча є в цьому узагальнюючому попередньому висновку й досить суттєва відмінність між двома вірулентними штамми мікобактерій: вміст пальмітинової та стеаринової кислот у мікобактерій швидкорослого штаму виявився в 1,5 та 1,28 рази відповідно вищим, ніж у штаму *Vallee*. У той же час олеїнова кислота за вмістом виявлялася реально ідентичною.

Подібне встановлено й у штамів авірулентних мікобактерій. Однак у таких штамів *BCG* всі три кислоти мають нижчий вміст, ніж у трьох штамів авірулентних дисоціативних форм.

**119. Вміст скелетних вільних жирних кислот вірулентних
й авірулентних *M. bovis*, % на наважку**

№ п/п	ВЖК	<i>Vallee</i>	Швидко- рослі	<i>BCG</i>	Дисоціативні форми (117а, б, в)
1	Пальмітинова	18,87±0,98	28,49±1,43	21,12±0,07	25,22±0,39 – 45,59±0,58
2	Олеїнова	27,18±1,43	28,39±1,34	14,57±0,4	6,15±0,44 – 22,2±0,62
3	Стеаринова	11,75±0,59	15,09±0,56	11,48±0,23	25,98±0,57 – 31,39±0,32
Σ		19,26±0,1	23,99±1,1	15,72±0,23	19,11±0,46 – 33,06±0,5

Найнижчий сумарний вміст скелетних кислот відмічається в мікобактерій вакцинного штаму та дисоціативних форм, а найвищий – у вірулентного швидкокорослого штаму та одного з варіантів його дисоціативних форм. Олеїнової кислоти в останніх вміщується від 2,34 до 4,6 раза менше, ніж в інших досліджених варіантах мікобактерій.

Підсумовуючи вміст скелетних кислот у досліджених мікобактерій, можна з високим ступенем вірогідності стверджувати: їх рівень не може певною мірою свідчити про ступінь вірулентності.

Очевидно, це твердження не припустимо повністю спростовувати, особливо у відриві від динаміки вмісту інших коротко- й довголанцюгових вільних жирних кислот, вміст яких динамічно змінювався, зокрема у швидкокорослого штаму та його дисоціативних форм. Але швидкокорослі мікобактерії (не відносячи дисоціативні форми) мають суттєві відмінності. Так, за систематичних послідовних численних пасажів через штучне ячне живильне середовище з рН 6,5 на 150 пересіві з 19 вільних жирних кислот вихідних мікобактерій виявилось на діагностичному рівні тільки 10 на тлі вмісту пальмітинової, олеїнової, стеаринної кислот: 28,97±0,91; 27,16±0,55; 13,58±0,52 % відповідно. Співвідношення насичених та ненасичених, а також коротко- та довголанцюгових вільних жирних кислот становило 36,2 та 63,8 % й 80,79 та 19,21 % відповідно.

Тим часом у мікобактерій дисоціативних форм вміщується 16–17 кислот й вміст скелетних кислот зменшився, як і в таких швидкокорослого штаму, з одночасним синтезом до цього не ідентифікованої коротколанцюгової вільної жирної кислоти – ундеканової.

Узагальнення та обмірковування результатів дає змогу висловити думку про те, що інтенсивність синтезу вільних жирних кислот, як коротко- так і довголанцюгових, відбувається за рахунок скелетної групи. Скелетна група кислот, незалежно від умов розмноження мікобактерій, практично є стабіль-

ною, забезпечуючи компенсаторну функцію, та, залежно від вірулентності, відповідний вміст як коротко-, так і довголанцюгових вільних жирних кислот.

На останнє може впливати недостатня атенуйованість дисоціативних форм мікобактерій (про що йтиметься в наступному розділі), коли використовується різна доза таких форм мікроорганізмів у дослідях на морських свинках.

Підтвердженням повідомлень авторів попередніх десятиліть виявилися результати досліджень кислот. В умовах культивування мікобактерій, не зовсім благоприємних для розмноження, збільшується вміст у клітинній стінці досліджуваних мікроорганізмів ненасичених кислот, що свідчить про мобілізацію, активізацію адаптивних процесів.

Досліджуючи один штам мікобактерій, культивованих на середовищі з різним рН, достовірно доведено позитивний вплив на ріст мікобактерій кислотності 6,5 в умовах як швидкого, так і повільного розмноження: вміст ненасичених вільних жирних кислот становив $72,61 \pm 0,5$ – $67,63 \pm 1,78$ % відповідно. Натомість за рН середовища 7,1–7,2 аналізовані показники виявилися в позначці $42,02 \pm 0,23$ %.

Проте оптимальний вміст кислотно-лужних грам-еквівалентів (рН 6,5) у живильному середовищі, забезпечуючи активний метаболізм мікробної клітини, сприяє більш швидкій втраті кислотостійкості, зміні морфології, росту культури та зниженню вірулентності, про що аргументовано викладено вище.

Зниження рівня вмісту або ж повне зникнення окремих, як правило, довголанцюгових вільних жирних кислот мікробної клітини може стверджувати про взаємопов'язані між собою явища. Того ж часу мікобактерії штаму *BCG*, маючи досить виражену кислотостійкість, авірулентні, зазвичай типової форми палички (інколи наявні й інші морфологічні варіанти), низький вміст загальних ліпідів, вміщують весь діагностований нами набір вільних жирних кислот з атомами вуглецю від $C_{12:0}$ до $C_{27:0}$, з яких майже 80 % насичених.

Отже, результати досліджень ліпідного складу *M. bovis* та їх дисоціативних форм, окремих видів атипичних мікобактерій та стислий їх аналіз не стільки вирішили, скільки виявили чимало нез'ясованих питань.

Це зумовлено, на наш погляд, лабільністю та подібністю генетичного коду у видів мікобактерій та більш глибокими механізмами їх прояву (взаємодією). І важливо, що вміст загальних ліпідів жодною мірою не може слугувати показником вірулентності. І *BCG*, і дисоціативні форми *M. bovis*, маючи практично однаковий рівень ліпідів, суттєво відрізняються за вірулентністю: перші – кислотостійкі, як правило, позбавлені залишкової вірулентності; дисоціативні форми перших генерацій (зазвичай, некислотостійкі) – ні.

ВИЖИВАННЯ МІКОБАКТЕРІЙ

Збудник туберкульозу характеризується високою стійкістю до впливу фізичних й хімічних чинників унаслідок високого вмісту в бактеріальній клітині ліпідних речовин, особливостей будови клітинних структур та специфічних генетичних задатків. Це визначає різну можливість мікобактерій стосовно стійкості до чинників довкілля, у тому числі й форм мікобактерій певного етапу біологічного циклу розвитку.

7.1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

За нагрівання до 60 °С мікобактерії туберкульозу гинуть через 30 хв, а по даних Н.М. Количева (1985) – через 40–50. *M. avium* витримує нагрівання навіть 65 хв. Автор відмічає, що на стійкість мікобактерій до температурного режиму впливає густина їх завису. Підвищення до 70 °С викликає загибель мікобактерій туберкульозу через 20 хв, до 80 °С – через 5 хв (Благодарний А.Я., 1980). Кип'ятіння вбиває їх протягом декількох хвилин. За даними В.Г. Звончика (1967), *M. bovis* 15 с зберігають здатність до росту на живильних середовищах після нагрівання до 75 °С. Проте автор підкреслює, що в разі нагрівання їх до 75–80 °С протягом 3–15 с і 85 °С – 3–7 с вони зберігають вірулентність для морських свинок. Для того щоб убити мікобактерії туберкульозу в молоці за температури 85 °С, її вплив необхідно продовжити 30 хв (Артюх І.А. й співавт., 1955), а 90 °С – 5 хв (Мажар В.К., 1965). Надзвичайно стійкі досліджувані мікобактерії до низьких температур: за мінус 23 °С життєздатність мікроорганізмів зберігається до семи років (Благодарний А.Я., 1980).

Згубно діє на мікобактерії туберкульозу пряме сонячне світло. За даними А.А. Клебанової (1931), у середній смузі Росії яскраве сонячне світло розпочинає вбивати мікобактерії туберкульозу з 60-хвилинного впливу.

У відношенні мінеральних кислот мікобактерії досить резистентні. Так, в 5–10%-вому розчині сірчаної і соляної кислот вони залишаються життєздатними 24 год. Відносно швидко їх вбиває 50–70 %-вий алкоголь (Lindner, 1971).

За даними Н.М. Количева (1984), *M. avium* зберігає вірулентність в патологічному матеріалі, який знаходиться в 30%-вому розчині гліцерину за температури 5 °С протягом 2 міс., а виживання – 3 міс. Н.М. Количев і В.П. Сухотіна (1983), використовуючи для дезінфекції ґрунту феносмолін, встановили, що 8 %-ва емульсія його, з розрахунку 10 л на 1 м² ґрунту, вбиває *M. bovis* на глибині до 5 см через 48 год, а *M. avium* – через 24 год; 15%-ва емульсія цього ж препарату – через 24 год. За повідомленнями В.В. Тілґа (1983), 0,5%-вий розчин естостерилу вбиває мікобактерії туберкульозу за 30 хв. Н.И. Прокофьева в 1986 році спостерігала бактерицидний ефект на *M. bovis* розчинів

парасоду й фоспару в 3%-вій і метафору – в 0,5%-вій концентраціях за впливу протягом 60 хв. Автор помітила досить виражену стійкість *M. bovis* до впливу сухого хлорного вапна. Так, мікобактерії туберкульозу не гинули в такому, що вміщувало 23 % активного хлору, 30 діб і більше, тоді як уміст у вапні 28 % активного хлору викликав загибель збудника на 22 добу. Благоприємне середовище для виживання мікобактерій – ґрунт. Виживання мікобактерій в різних його типах зумовлено впливом ґрунтового-географічних, кліматичних і сезонних особливостей.

За даними Н.М. Количева (1984), у стерильному ґрунті і витяжках з нього за температури 37,5–38,5 °С мікобактерії туберкульозу не тільки зберігають свою життєздатність, але й можуть розмножуватися.

В умовах Сибіру, за повідомленнями Е.Г. Посохина (1952), мікобактерії туберкульозу пташиного виду виживають у ґрунті, не змінюючи своєї вірулентності, до 12 міс. і більше. Н.М. Количев (1984), вивчаючи виживання мікобактерій в умовах Омської області в різні пори року, дійшов висновку, що восени та зимою в нестерильних зразках ґрунту, що знаходилися в природних умовах на глибині до 15 см, *M. bovis* зберігає вірулентні властивості до 4 міс., а життєздатність – до 15. У таких самих умовах, тільки на глибині 5 см, у літній період мікобактерії бичачого виду зберігали вірулентні властивості до 3 міс., а пташиного – до 4 міс. Тривалість виживання їх, за повідомленнями автора, не перевищувала 7–8 міс.

Ще триваліше мікобактерії виживають в мерзлих ґрунтах Якутії (Прокофьева Н.И., 1986). Так, *M. bovis* і *M. avium* зберігають життєздатність і вірулентність на поверхні ґрунту 12 міс., на глибині 5 см – 27 міс. і на глибині 10 і 20 см – 36 міс.

В умовах Таджикистану, за даними Н. Ярбаєва (1975), мікобактерії туберкульозу бичачого виду, які внесені на поверхню ґрунту і на глибину 10 см, зберігають вірулентні властивості протягом 26 міс.

В.С. Козлов (1982), вивчаючи виживання й мінливість мікобактерій туберкульозу в дернисто-підзолистому піщаному ґрунті, виявив, що *M. tuberculosis* зберігають життєздатність до 3 міс., *M. bovis* – до 5-ти, *M. avium* – до 18 міс. Мікобактерії, які виділені з ґрунту у певні строки, помітно відрізнялися від вихідних як морфологічними ознаками, так і послабленням вірулентності.

Гній є захисним середовищем для мікобактерій туберкульозу від впливу несприятливих факторів. У підстилковому матеріалі вони зберігаються більше 7 міс., а в ґрунті з гноєм – до 9 років (Ярних В.С., 1985). Розрідження гною водою сприяє нейтралізації середовища, що покращує умови перебування мікобактерій. Так, за повідомленням В.С. Ярних, в умовах Центральної зони Російської Федерації мікобактерії туберкульозу зберігають життєздатність в рідкому гної понад 475 діб. У гнійній рідині на відкритому повітрі під впливом розсіяного світла в умовах Таджикистану *M. bovis* зберігає вірулентність до 280 діб (Ярбаєв Н., 1975). Учений стверджує, що протягом одного літнього періоду не відбувається природного знезараження контамінованих мікобактеріями туберкульозу пасовищ. Про більш високий термін виживання туберку-

льозних мікобактерій в гної (до 15 років) повідомляють А.А. Поляков та його співавтори (1971).

У глибокій підстилці з деревної тирси і стружки, яка не змінюється та знаходиться безпосередньо на землі в холодному приміщенні, *M. avium* зберігають вірулентність 9,5 року (Щепилов Н.С. й співавт., 1971). Досліди Н.М. Количева (1984) з вивчення виживання і вірулентності збудників туберкульозу бичачого та пташиного видів у тирсі засвідчили, що перші зберігають вірулентність за температури 5–20 °С відповідно 4–11 міс., пташиного виду – не більше 3 міс., а тривалість виживання у *M. bovis* – 16 міс., *M. avium* – 18. У глибокій підстилці з подрібнених стрижнів кукурудзи *M. avium* зберігає життєздатність 12 міс. (Левченко И.Д., 1965).

На виживання мікобактерій у воді великий вплив здійснює сонячне світло. Так, за повідомленнями И.Д. Левченка (1965), за зберігання води в літній час під впливом сонячних променів мікобактерії туберкульозу пташиного виду виживають не більше 12 діб, такої самої води, контамінованої згаданими мікобактеріями, в темноті за кімнатної температури – 23,5 міс. Мікобактерії туберкульозу здатні тривалий час затримуватися в молочних продуктах. Так, у маслі, яке перебуває в холодильнику, вони зберігають життєздатність до 300, у сирі – до 260, в молоці – 14–18 діб (Скворцов В.В., 1961). Проте Н. Ярбаев 1975 року спостерігав значно більший термін збереження вірулентних властивостей мікобактерій бичачого виду (в молоці – до 240 діб за кімнатної температури і 280 – у холодильнику). Повідомлення В.Н. Позднякової (1985) свідчать про те, що в разі знезараження молока інфрачервоним електронагрівом мікобактерії туберкульозу бичачого виду втрачають вірулентність та життєздатність при 75 °С за 60 с, а людського та пташиного – при 77 і 80 °С за 30 і 3 с відповідно. У замороженому м'ясі збудник туберкульозу зберігається до року (Кузин А.И., 1982).

У поширенні туберкульозної інфекції дуже небезпечним є корми, контаміновані мікобактеріями. Так, *M. avium* та *M. bovis* зберігають життєздатність на поверхні ячменю 1398 днів, гороху – 976, пшениці – 972 дні, у комбікормах – 793 дні, у силосі – до 14 міс., сіні – 102 тижні, грубих кормах – до 47 тижнів, а в ґрунті – від 7 до 18 міс.

Установлено, що збудники туберкульозу (*M. avium* та *M. bovis*) у фекаліях великої рогатої худоби, курячому посліді, гною, різних підстилках зберігають свою вірулентність від 4 до 12 міс., а життєздатність – від 3 до 4 років.

Найсприйнятливіше середовище для виживання збудників туберкульозу – це болотяна вода, де вони здатні не втрачати своїх біологічних властивостей до 12 міс., а в річковій – до 7. У морській воді вірулентність мікобактерій туберкульозу зберігається протягом 98 днів.

На живильному середовищі культури *M. bovis* та *M. avium* зберігаються до двох, а на висушеному – до трьох років. Virізняються мікобактерії стійкістю і до низьких температур. Навіть у разі охолодження до –100 °С культура є вірулентною, а за температури – 23 °С вона життєздатна до 7 років.

У молоці, отриманому від хворих тварин, збудник зберігається 305 діб, у свіжому маслі та сирах – до 10 міс., у замороженому м'ясі – до 300 діб (Количев Н.М., 1988).

У неблагополучних щодо туберкульозу господарствах збудник частіше за все знаходиться в ґрунті вигульних дворів (83 %), пилу (65 %), годівницях (63 %), поїлках (57 %), на підлозі (55 %), рідше на стінах (31 %), дерев'яних (28 %) і металевих конструкціях (6 %), підсумовує А.Е. Висоцький (2002).

Значне поширення мікобактеріозної інфекції у видів тварин, зумовленої атипovими мікобактеріями, вимагало вивчення їх резистентності щодо різних фізичних і хімічних факторів. З повідомлень Hartwig й співавт., (1962) слідує, що 46 культур швидкорослих мікобактерій гинули за температури 60 °C протягом 4 год, а за даними Н.М. Количева (1982) – значно швидше, через 40–50 хв. Scammon й співавт., (1963) повідомили, що із 30 культур нефотохромогенних мікобактерій 7 не загинули за температури 60 °C через 60 хв, а 4 не гинули навіть протязом 2 год. Scammon й співавт., (1963), О.В. Мартма (1971) й інші стверджують, що частина культур атипovих мікобактерій більш резистентна до високої температури, ніж збудник туберкульозу, тому не всі з них гинуть за пастеризації молока та відвйок. Повідомлення Н.М. Количева (1982) свідчать про те, що атипovі мікобактерії порівняно з *M. bovis* і *M. avium* більш стійкі й до лужного розчину формальдегіду. Найбільш стійкими з них виявилися *M. intracellularea* і *M. gordonae*. Тривалість виживання швидкорослих мікобактерій в нестерильному ґрунті на глибині до 15 см – 11–15 міс., скотохромогенних – 19; у нестерильній тирсі за температури 5–20 °C ті й інші мікобактерії виживають 17–19 міс. (Количев Н.М., 1984).

За дії інфрачервоних променів атипovі мікобактерії в молоці гинуть за температури 79,5 °C миттєво (Кассіч Ю.Я. й співавт., 1986).

Того самого часу відкриваються нові фактори виживання мікобактерій, зокрема “активуючий оживлення фактор” (“*resuscitation-promoting factor*”) або *rpf* гени. *Micrococcus luteus* експресує *rpf* ген, продукт якого потрібний, щоб оживити ріст сплячої культури *Micrococcus luteus*, і який є істотним для росту цього організму. Недавно продемонстровано, що *M. tuberculosis* має, щонайменше, п’ять *rpf* гомологів. Це знову наводить на думку про важливість латентності і оживлення для виживання *M. tuberculosis* (Tufariello J. M., 2004; Downing K.J., 2005). Припускаючи, що “активуючий оживлення фактор” є суттєво вагомим для виведення (для повернення) зі сплячого стану і імуногенним, декретованим антигеном, він може бути й привабливою мішенню для вакцинації (Yeremeev V.V., 2003).

Підсумовуючи повідомлення дослідників, можна відзначити, що резистентність мікобактерій туберкульозу й атипovих досить висока, хоча й дещо відрізняється в одного і того ж виду мікроорганізму. Це, можливо, зумовлено біологічними властивостями кожного окремого штаму мікобактерій, ступенем впливу факторів довкілля та методологічними підходами до проведення відповідних досліджень. На виживання мікобактерій впливають й біохімічні властивості ґрунтів певної природно-географічної зони й ін. У цьому контексті нами проведено низку дослідів з використанням патогенних та атипovих мікобактерій (Ткаченко О.А., Хільченко Г.І., 2011).

7.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Виконання роботи розпочали з дослідження проб, які відбирали з об'єктів тваринницьких приміщень та вигульних дворів неблагополучних господарств, оздоровлених у різні строки від туберкульозу тварин. Було досліджено 88 проб таких господарств:

№ 1 – неблагополучне щодо туберкульозу великої рогатої худоби; приміщення тваринницької ферми вивільняли від інфікованого та хворого поголів'я протягом 5 років; останніх тварин вивезено за 3 міс. до відбору проб; на вивільненій фермі проведено останню дезінфекцію, досліджено 51 пробу;

№ 2 – неблагополучне щодо туберкульозу; проби відбирали в присутності скомпрометованої щодо інфекції худоби; дезінфекцію проводили після кожного виділення реагуючих на туберкулін тварин, досліджено 11 проб;

№ 3 – оздоровлене від туберкульозу за рік до відбору матеріалу, дезінфекцію не проводили – 26 проб.

У день відбору проби обробляли послідовно 4%-вим розчином їдкою натру та 10%-вим – сірчаної кислоти для знищення сапрофітної мікрофлори. З осаду готували мазки, які фарбували загальноприйнятим методом за Цілем-Нільсеном і аналізували в світловому бінокулярному мікроскопі під масляною імерсією. Після цього проводили висів суспензії на два ячні живильні середовища з рН 7,1 та 6,5. Середовища були підготовлені й перевірені на стерильність за тиждень до висіву матеріалу. Залишком суспензії після її нейтралізації заражали морських свинок масою 300–350 г. Біопробу проводили згідно з діючими рекомендаціями (Савченко Е.П., 1998), при цьому об'єднували суспензії з двох проб, відібраних із різних точок одного й того ж вигульного майданчика чи об'єкта тваринницького приміщення, та вводили двом лабораторним тваринам.

Для вивчення залежності між життєздатністю і вірулентністю мікобактерій виконували пасажі через організм морських свинок виділених культур, які не викликали патолого-анатомічних змін у дослідних тварин, але за культуральними та біохімічними властивостями були віднесені до збудника туберкульозу бичачого виду.

У виділених культур вивчали морфологічні ознаки мікобактерій, тинкторіальні культуральні властивості, швидкість росту культури за пересівів, ріст на середовищі з натрієм саліциловокислим (Ільїна, 1973), пероксидазну, каталазну (Зимин, 1966) та нітратредуктазну (Tsukamuga, 1966) активності, термостабільність каталази (Макаревич, 1973).

7.2.1. Властивості та стійкість мікобактерій залежно від фізико-хімічних показників ґрунту на різних глибинах залягання

У результаті досліджень мазків під імерсійною системою (приготовлені зі суспензії) виявлено поодинокі червоні зернисті палички розміром $1-3 \times 0,2-0,5$ мкм та незначні їх скупчення в пробах, відібраних із годівниць тваринницьких приміщень господарства № 2. Це вказує на високий ступінь

контамінації навколишнього середовища мікобактеріями, оскільки загально-відомо, що збудник туберкульозу виявляється за даного дослідження тільки в разі наявності в 1 см³ суспензії 100 000 і більше бактеріальних клітин.

Культуральним методом було виділено 19 штамів мікобактерій (табл. 120). При цьому на стандартному середовищі (рН 7,1) отримано позитивний результат у 9,1 % випадків, а на середовищі з рН 6,5 – у 12,5 %.

120. Контамінація об'єктів навколишнього середовища мікобактеріями

Місце відбору матеріалу	Досліджено проб на туберкульоз				
	всього	виділено культур мікобактерій на середовищі з рН			
		7,1		6,5	
		<i>n</i>	%	<i>n</i>	%
Ґрунт вигульних майданчиків	8	-	-	-	-
Тваринницькі приміщення: годовниці	18	6	3,33	8	44,4
кормові проходи	10	1	10	1	10
ґнійні проходи	8	-	-	-	-
ґнійні жолоби	16	1	6,2	2	12,5
стіла	9	-	-	-	-
вікна	4	-	-	-	-
стіни	15	-	-	-	-
Всього	88	8	9,1	11	12,5

У господарстві № 1 мікобактерії були виділені в пробах із годівниць – 3 культури та з кормового проходу – 2. У господарстві № 2 ізольовано 9 культур з проб годівниць. Під час дослідження матеріалу, відібраного з об'єктів оздоровленого господарства, мікобактерії виділили в 3 пробах із ґнійного жолоба і 2 – з годівниць. Із проб, відібраних у приміщеннях, де утримувалася скомпрометована щодо туберкульозу худоба, виділено найбільшу кількість культур мікобактерій. Це пояснюється тим, що збудник постійно виділяється зі слизом і мокротинням хворої та інфікованої худоби, внаслідок чого підтримується висока концентрація, в першу чергу в годівницях і кормових проходах.

За бактеріоскопічного дослідження виділених штамів мікобактерій практично в кожному мазку виявили різноманітні за морфологією червоні палички – від кокоподібних до 5–6 мкм завдовжки та 0,3–0,6 мкм завширшки.

Водночас біопробу на морських свинках туберкульоз було встановлено в 6 об'єднаних пробах із годівниць господарства № 2, що збігається з результатами культуральних досліджень. Крім того, відмічалася реакція на туберкулін у двох морських свинок, заражених об'єднаною суспензією з ґнійного жолоба, та однієї – з годівниць корівника оздоровленого господарства, з яких було ще виділено і культури мікобактерій. Проте по закінченні дослідів за патолого-анатомічного розтину лабораторних тварин змін, характерних для

туберкульозної інфекції, не було виявлено. Культуральними дослідженнями патологічного матеріалу від згаданих свинок виділено дві культури мікобактерій, які за тинкторіальними властивостями та морфологічними ознаками не відрізнялися від культур, виділених з об'єктів навколишнього середовища даного господарства. Паралельне зараження морських свинок залишком суспензії дало негативний результат. У подальшому було проведено ще три аналогічні дослідження, за результатами яких тільки за четвертого пасажування зареєстровано падіж морських свинок на 63 та 78 добу з характерними для туберкульозної інфекції патолого-анатомічними змінами.

Отже, нами встановлено, що в природних умовах передусім мікобактерії втрачають вірулентну здатність, яка у життєздатних мікроорганізмів за незначної кількості пасажів через сприйнятливий макроорганізм достатньо легко цілком відновлюється. Провівши диференціацію виділених культур за культуральними, біологічними та біохімічними властивостями, ми розподілили їх на дві групи: мікобактерії, що формували перші колонії за пересівів на другу-третю добу культивування й не викликали сенсibiliзації морських свинок до туберкуліну – 5 культур; 14 штамів мікобактерій мали різний ступінь патогенності для лабораторних тварин і при культивуванні макроскопічний ріст розпочинався на 12–21 добу дослідження (табл. 121).

121. Властивості виділених культур*

Група	Виділено культур мікобактерій	Швидкість росту генерації, доба		Характер колоній	Стійкість до нагрію салі-циловикислого	Активність			Термостабільність каталази
		перший	наступний			каталазна	пероксидазна	нітрапродуктазна	
1	5	9–23	2–3	S та R	+	+	–	+	+
2	14	14–27	12–21	R	–	–	–	–	–

* Результат: (+) – позитивна, (–) – негативна реакція;
S – вологий ріст (S-форма); R – сухий ріст (R-форма).

Мікобактерії першої групи при культивуванні на живильних середовищах формували як гладкі випуклі блискучі вологі колонії з рівними краями (S-форма), так і горбкуваті матові сухі крихтоподібні (R-форма). За пересівів ці культури мали високу інтенсивність росту і на 10–14 добу культивування численні колонії зливалися, вкриваючи до 2/3 поверхні живильного середовища. Колір колонії коливався від блідо-жовтого до сіро-білого. Культури другої групи набували лише R-форми сіруватого

та кремового кольору. Під час пасажування спостерігався повільний ріст поодиноких колоній.

Проведенням біохімічних і культуральних досліджень удалося віддиференціювати атипові мікобактерії (перша група) від патогенних. А за часом формування колоній на живильних середовищах при пасажуванні їх було віднесено до четвертої групи за класифікацією Раніона. Того ж часу негативна нітроредуктазна активність мікобактерій другої групи дозволила виключити наявність серед них *M. tuberculosis*.

Отже, нами було виділено мікобактерії з 19 досліджених проб об'єктів навколишнього середовища, з них 5 атипових (з матеріалу, відібраного в господарстві № 1) та 14 бичачого виду (9 – з матеріалу з господарства № 2 та 5 проб – з господарства № 3).

Одержані дані свідчать про наявність збудника туберкульозу на території тваринницької ферми господарства № 3, оздоровленого від даної інфекції понад рік. За відсутності або неякісного проведення дезінфекції це, без сумніву, може викликати спалах туберкульозу тварин. Така сама проблема спостерігається і в господарстві № 2, де зафіксовано найвищий рівень контамінації об'єктів навколишнього середовища *M. bovis*. Постійне виділення та циркуляція серед поголів'я патогенних мікобактерій зводить нанівець результати оздоровлення шляхом видалення із стада реагуючої худоби після чергової туберкулізації. За цього в іншому неблагополучному господарстві (№ 1) після проведення якісної заключної дезінфекції патогенні мікобактерії не були виділені із тваринницьких приміщень та прифермської території. Тут було ізольовано лише 5 культур атипових мікобактерій, що ще раз підтверджує дані про їх значно вищу резистентність до різноманітних фізико-хімічних факторів порівняно зі збудником туберкульозу бичачого виду.

Таким чином, дослідження засвідчили, що патогенні мікобактерії досить часто знаходяться на об'єктах навколишнього середовища господарств з різною епізоотичною ситуацією.

Підсумовуючи викладені результати досліджень, відзначимо, що мікобактерії виділені в 21,6 % проб навколишнього середовища тваринницьких об'єктів, з них у 26,3 % – атипові та 73,7 % – бичачого виду. На середовищі з рН 6,5 при культивуванні виділили на три штами мікобактерій більше, ніж на стандартному (рН 7,1).

M. bovis у приміщеннях молочно-товарних ферм за незадовільного проведення санітарно-ветеринарних заходів залишається життєздатним не менше, ніж рік. Збудник туберкульозу, який втратив патогенність під впливом несприйнятливих факторів навколишнього середовища, після четвертого пасажу через сприйнятливий макроорганізм знову набуває вірулентних властивостей.

Одержавши такі результати щодо виживання мікобактерій в умовах господарств, нами проведені відповідні дослідження. Для цього визначали період життєздатності збудника туберкульозу бичачого виду в експериментальних умовах. Попередньо на агроекологічному полігоні навчального господарства

ДДАУ “Самарський” відібрали зразки повнопрофільного та слабозмитого звичайного чорнозему з глибини залягання прошарку 0–10, 11–20 та 21–30 см. Грунт досліджували в НДІ ДДАУ “Агроєкологія” за певними фізико-хімічними показниками: концентрація гумусу (за методом Тюріна, в модифікації Симакова та Ципльонкіна), сума мінерального азоту (за Кравковим із застосуванням іонселективних електродів) та фосфору й азоту (за методом Чирікова з 0,5 н оцтовокислою витяжкою) і рН водної витяжки (Аринишкіна Е.В., 1970). В умовах навчально-дослідної лабораторії кафедри епізоотології ДДАУ всі прошарки ґрунту були досліджені на наявність сапрофітних та патогенних мікобактерій з негативними результатами.

У досліді використали 3 штами *M. bovis*: еталонний *Vallee* та два музейні – “ШХ” і “ШВ”. Накопичення бактеріальної маси мікобактерій проводили на живильному середовищі Левенштейна-Йенсена (м. Харків). З відібраної бактеріальної маси готували завис із концентрацією 2 млрд мікробних клітин в 1 см³ фізіологічного розчину.

Для виготовлення капронових тест-об’єктів відріз нейтрального капрону прали, кип’ятили, висушували і прасували. Після цього тканину розрізали на смужки розміром 1–5 см та по 50 штук розкладали по чашках Петрі, які загортали в папір і стерилізували в автоклаві, відповідно до Методичних рекомендацій з визначення бактерицидної дії дезінфектантів, перспективних для знешкодження збудників туберкульозу в докільлі (2003 р.).

У стерильних умовах на кожну смужку наносили 1 см³ завису мікобактерій. Після підсихання тест-об’єкти вносили до вегетаційних судин з пробами ґрунту. Кожний штам мікобактерій закладали в обидва ґрунти на глибині 20, 15, 10 і 5 см та на поверхні. Підготовку, набивку, тарування та полив вегетаційних судин з ґрунтом проводили за методикою З.І. Журбицького (1968).

Через кожні 10 діб (всього три рази) з поверхні ґрунту та 15 разів з прошарків проводили відбір тест-об’єктів з подальшою передвисівною обробкою за методом Б.Я. Хайкіна (1988).

Отриману суспензію за традиційним методом досліджували бактеріоскопічно та висівали в об’ємі двох бактеріологічних петель на щільне ячне середовище шести пробірок (рН 7,0–7,1 та рН 6,5). Залишок суспензії нейтралізували і вводили по 1,0 см³ здоровим морським свинкам. Усі отримані при культивуванні колонії мікобактерій досліджували мікроскопічно й біохімічно (Козлов В.С., 1982).

Вивчення життєздатності M. bovis у ґрунті на різних глибинах залягання. У результаті досліджень фізико-хімічних властивостей ґрунту встановлено, що концентрація гумусу та макроелементів в обох чорноземах була найбільш високою в прошарку 0–10 см (табл. 122).

У більш глибоких прошарках відмічалось зниження концентрації всіх показників. Отже, замість гумусу та макроелементів було встановлено, що для дослідів відібрано звичайний повнопрофільний середньоміцний малогумусний середньосуглинистий та звичайний малогумусний слабозмитий середньосуглинистий чорноземи, які, за даними Н.Е. Бекаревича, Н.І. Левчишина

122. Фізико-хімічні показники ґрунту

Тип чорнозему	Глибина залягання прошарку, см	Концентрація гумусу, %	Сума мінерального азоту, мг/кг	P ₂ O ₅ , мг/кг	pH	K ₂ O, мг/кг
Повнопрофільний	0–10	4,07	59,2	172	7,5	144
	11–20	3,96	56,1	152	7,3	135
	21–30	3,81	55,2	144	7,25	132
Слабозмитий	0–10	3,90	34,7	115	7,5	122
	11–20	3,46	27,5	113	7,4	117
	21–30	3,20	18,4	82	7,3	107

та М.П. Сонька (1976), займають 79,6 % загальної земельної площі Дніпропетровської області.

У дослідженій під мікроскопом суспензії, яка одержана після передвисівної обробки капронових смужок, що були розміщені в поверхневому прошарку ґрунту, мікобактерії не рееструвалися.

У табл. 123 показано, що на середовищі з pH 6,5 колонії мікобактерій формувалися на 1–6 діб раніше, ніж на такому з pH 7,1–7,2.

Як засвідчили дані бактеріологічних досліджень зразків з поверхні і повнопрофільного, і слабозмитого чорнозему на 10 добу відбору, мікобактерії штаму “ШВ” (швидкрослий) формували колонії на живильному середовищі на 21 добу, *Vallee* ріст проявили на 25 добу, а “ШХ” – на 35 добу культивування.

Зі суспензії, приготовленої з проб ґрунту, відібраних на 20 добу досліді, колонії мікобактерій почали формуватися в основному на 42 добу культивування (*Vallee*, “ШВ”) і тільки мікобактерії штаму “ШХ” проявили ріст на 49 добу (повнопрофільний чорнозем). За цього, мікобактерії перших двох штамів з обох типів чорнозему в однаковій мірі проявляли ріст колоній як на середовищі з pH 7,1–7,2, так і з pH 6,5. Проте мікобактерії штаму “ШХ”, відібрані як з одного, так і з другого типу чорнозему, стимулювали ріст колоній на сім діб раніше на середовищі з pH 6,5, ніж на такому з pH 7,1–7,2.

Водночас необхідно визначити, що мікобактерії, які знаходилися на поверхні двох типів ґрунтів, значно інтенсивніше розмножуються на середовищі з pH 6,5, ніж на середовищі з pH 7,1–7,2; на 87 добу культивування кількість колоній на першому виявилася в 1,6–3,5 раза більшою, ніж на другому середовищі.

На 30 добу відбору проб ґрунту мікобактерії не проявили ріст на обох середовищах.

Біохімічні дослідження виділених мікобактерій на 10 та 20 добу досліді не виявили суттєвої відмінності від вихідних культур. Це, на нашу думку, можливо, пов’язано з відносно коротким часом перебування збудника туберкульозу в неблагополучних умовах зовнішнього середовища.

На 30 добу знаходження мікобактерій на поверхні ґрунтів, паралельно з культуральними негативними результатами досліджень, провели зараження морських свинок виготовленою суспензією з усіх зразків, що розташовували-

123. Бактеріологічні дослідження проб з поверхні повнопрофільного та слабозмітного чорнозему *

Штам <i>M. bovis</i>	Доба відбору проб	Початок росту культури, доба	Кількість колоній в одній пробірці на добу культивування										
			21	28	35	42	49	56	63	70	73	80	87
Vallee	10	27/25	-/-	0,3/0,3	0,6/0,8	0,6/1,1	0,7/1,4	1,6/2,2	1,9/2,8	2,1/3,7	2,4/4,3	2,7/5,1	3,1/6,2
	20	41/41	-/-	-/-	-/-	0,3/0,8	0,3/0,8	0,3/0,8	0,3/1,1	0,5/1,3	0,7/1,5	1,0/1,8	1,0/1,8
	30	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
"ШВ"	10	24/21	-/0,3	0,3/1,3	0,5/1,8	0,5/2,1	0,8/2,5	0,6/2,5	0,6/3,1	0,8/3,3	0,8/3,3	1,0/3,5	1,0/3,5
	20	42/40	-/-	-/-	-/-	0,3/0,3	0,3/0,3	0,3/0,3	0,3/0,5	0,5/0,8	0,5/1,0	0,5/1,3	0,8/1,3
	30	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
"ШХ"	10	37/31	-/-	-/-	-/0,5	0,1/0,5	0,3/0,8	0,3/1,3	0,5/0,8	0,8/2,3	0,8/2,5	0,8/3,3	1,3/3,8
	20	53/49	-/-	-/-	-/-	-/-	-/0,1	0,3/0,3	0,3/0,3	0,5/0,5	0,8/1,0	0,8/1,0	0,8/1,0
	30	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Vallee	10	28/27	-/-	0,1/0,3	0,3/0,8	0,6/0,8	0,6/1,1	0,8/1,5	1,3/1,8	1,5/2,3	1,8/2,8	2,3/3,5	2,7/4,8
	20	41/37	-/-	-/-	-/-	0,3/0,5	0,3/0,8	0,3/0,8	0,5/1,1	0,5/1,3	0,5/1,3	0,8/1,5	0,8/1,5
	30	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
"ШВ"	10	26/21	-/0,1	0,1/0,8	0,1/1,5	0,3/1,8	0,5/2,3	0,8/2,5	0,8/2,8	0,8/2,8	1,1/3,1	1,3/3,1	1,3/3,3
	20	44/41	-/-	-/-	-/-	-/0,5	0,1/0,5	0,1/0,5	0,3/0,5	0,3/0,5	0,5/1,3	0,5/1,3	0,5/1,3
	30	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
"ШХ"	10	40/36	-/-	-/-	-/-	0,1/0,3	0,3/0,5	0,3/1,1	0,5/1,8	0,5/2,1	0,8/2,5	0,8/3,1	1,1/3,5
	20	59/56	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/0,1	0,1/0,3	0,3/0,3	0,5/1,0	0,5/1,0	0,5/1,0
	30	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
Поверхня слабозмітного чорнозему													
Vallee	10	28/27	-/-	0,1/0,3	0,3/0,8	0,6/0,8	0,6/1,1	0,8/1,5	1,3/1,8	1,5/2,3	1,8/2,8	2,3/3,5	2,7/4,8
	20	41/37	-/-	-/-	-/-	0,3/0,5	0,3/0,8	0,3/0,8	0,5/1,1	0,5/1,3	0,5/1,3	0,8/1,5	0,8/1,5
	30	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
"ШВ"	10	26/21	-/0,1	0,1/0,8	0,1/1,5	0,3/1,8	0,5/2,3	0,8/2,5	0,8/2,8	0,8/2,8	1,1/3,1	1,3/3,1	1,3/3,3
	20	44/41	-/-	-/-	-/-	-/0,5	0,1/0,5	0,1/0,5	0,3/0,5	0,3/0,5	0,5/1,3	0,5/1,3	0,5/1,3
	30	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-
"ШХ"	10	40/36	-/-	-/-	-/-	0,1/0,3	0,3/0,5	0,3/1,1	0,5/1,8	0,5/2,1	0,8/2,5	0,8/3,1	1,1/3,5
	20	59/56	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/0,1	0,1/0,3	0,3/0,3	0,5/1,0	0,5/1,0	0,5/1,0
	30	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-

* Чисельник – середовище з рН 7,1; знаменник – з рН 6,5; (-) – результати негативні.

ся на поверхні ґрунту. Протягом дослідів лабораторні тварини не реагували на планові введення туберкуліну, ознак захворювання не виявлялося, маса свинок зростала. Через 3 місяці провели евтаназію всіх тварин. Розтин їх будь-яких патолого-анатомічних змін внутрішніх органів не виявив. Було проведено відбір біологічного матеріалу та висів з нього приготовленої суспензії на яєчні середовища. За цього одержано негативний результат.

Інтенсивність росту мікобактерій різних штамів значно відрізнялася. Найбільш високою вона була у штаму *Vallee*, де при культивуванні проб, відібраних на 10 добу дослідів, кількість колоній на середовищі з рН 6,5 збільшилася в понад 20 разів, тоді як на рН 7,1 – тільки в 10. Інтенсивність росту *M. bovis* штамів “ШВ” та “ШХ” в цей же період практично не відрізнялася між собою і становила відповідно 3–13 та 7–15 разів. Із проб, відібраних на 20 добу дослідів, перші колонії виділялися на 14–21 добу пізніше, ніж за попереднього дослідження. Формування колоній було більш повільним, їх діаметр в 1,5–2,0 рази меншим, а інтенсивність росту становила 25–80 % порівняно з показниками колоній, що були виділені на 10 добу дослідів.

Аналізуючи дані *табл. 123*, виявляємо:

1) у 87,5 % випадків спостерігається більш інтенсивніший ріст мікобактерій, виділених з повнопрофільного чорнозему;

2) краща інтенсивність росту колоній на обох живильних середовищах зареєстрована у штаму *M. bovis* на всіх етапах дослідів;

3) мікобактерії штамів “ШВ” та “ШХ” за накопиченням бактеріальної маси практично не відрізняються, хоча перший формує колонії на 10–15 діб раніше;

4) в 95 % досліджень на середовищі з рН 6,5 відмічено раніший ріст культур, ніж на стандартному.

У *табл. 124* наведена динаміка термінів появи перших колоній на середовищах з рН 7,1–7,2 та 6,5, з нанесеною на них суспензією, підготовленою з тест-об’єктів, контамінованих *M. bovis* штаму “ШХ”. На 105 добу дослідження культура з’явилася в середньому на 4–32 доби пізніше, ніж за першого дослідження на Харківському середовищі, та на 10–31 добу – на “Новому”, що свідчить про динамічну втрату мікобактеріями патогенності. Але необхідно зазначити, що за кожного дослідження на середовищі з рН 6,5 фіксували швидше формування колоній, ніж з рН 7,1 (Короленко Л.С. й співавт., 1997; Ткаченко О.А. й співавт., 2001; Хільченко Г.І. й співавт., 2004).

Усі культури, виділені зі зразків ґрунту на 105 добу дослідів і які за морфологією колоній та результатами бактеріоскопії віднесені до мікобактерій, досліджені на нітроредуктазну та каталазну активність. Встановлено, що жодна з культур, які перебували в ґрунті, не набула здатності до редукції нітратів (*табл. 125*). Під час проведення каталазної проби отримано позитивний результат (з інтенсивністю в 3 та 4 хрести) при дослідженні *M. bovis* штаму *Vallee*, який був закладений на глибині 5 та 10 см в обох чорноземах. Усі інші культури давали негативну або слабопозитивну (сумнівну) реакцію на каталазу.

Визначення періоду життєздатності патогенних мікобактерій в ґрунті проводили протягом зимового періоду. Для цього було використано морських

124. Ріст *M. bovis* штаму “ШХ” на штучному живильному середовищі в динаміці досліджень*

Тип чернозему	Глибина залигання тест-об’єкта, см	Доба відбору проби							
		15	30	45	60	75	90	105	120
Повнопрільний	5	<u>26</u> 21	<u>29</u> 21	<u>36</u> 34	<u>34</u> 29	<u>42</u> 34	<u>48</u> 40	<u>58</u> 52	-
	10	<u>27</u> 25	<u>32</u> 31	<u>36</u> 34	<u>39</u> 36	<u>42</u> 36	<u>44</u> 39	<u>49</u> 44	-
	15	<u>24</u> 24	<u>25</u> 23	<u>39</u> 31	<u>36</u> 36	<u>42</u> 34	<u>44</u> 34	<u>52</u> 36	-
	20	<u>32</u> 26	<u>30</u> 29	<u>35</u> 35	<u>39</u> 39	<u>39</u> 36	<u>32</u> 36	<u>36</u> 36	<u>48</u> 44
Слабозмитий	5	<u>30</u> 28	<u>35</u> 33	<u>39</u> 35	<u>44</u> 35	<u>48</u> 39	<u>50</u> 41	<u>58</u> 44	-
	10	<u>26</u> 29	<u>29</u> 26	<u>36</u> 34	<u>39</u> 36	<u>42</u> 39	<u>44</u> 40	<u>49</u> 42	-
	15	<u>27</u> 22	<u>37</u> 29	<u>39</u> 36	<u>39</u> 39	<u>42</u> 39	<u>42</u> 42	<u>52</u> 44	-
	20	<u>27</u> 24	<u>28</u> 25	<u>36</u> 31	<u>36</u> 35	<u>39</u> 36	<u>44</u> 39	<u>52</u> 40	-
* Чисельник – початок росту культури на середовищі з рН 7,1; знаменник рН 6,5.									

свинок масою не менше 350 г та таких, що не реагували на алергічне дослідження. Дослідження проводили за двома напрямками. Лабораторним тваринам першої групи підшкірно в області паху вводили завис мікобактерій в об’ємі 1 см³ (концентрація – 1 мг мікобактерій в 1 см³ фізіологічного розчину). Для зараження використовували останні виділення культур кожного штаму з усіх прошарків. Після цього, протягом наступних триразових послідовних досліджень, при культивуванні на живильних середовищах мікобактерії не виділялися. Таку суспензію, в об’ємі 1 см³, вводили морським свинкам другої групи.

Ступінь вірулентності мікобактерій визначали за часом загибелі дослідних тварин. Одночасно проводили порівняння отриманих даних з результатами біопроб, проведеної з наведеними штамми перед внесенням їх у ґрунт.

Утримання, догляд та годівлю морських свинок проводили відповідно до Методичних рекомендацій. Алергічні дослідження, забій, патолого-анатомічний розтин та узагальнення результатів біопроб проводили за загальноприйнятими у ветеринарній практиці методиками.

На середовищі з рН 6,5 колонії мікобактерій формувалися в середньому на 1–4 доби раніше, ніж на середовищі з рН 7,1. Більш інтенсивний ріст колоній

125. Результати дослідження проб з поверхні ґрунту¹

Штам мікобактерій	Доба відбору проби	Результат бактеріоскопії ¹	Початок росту культури на середовищах з рН, доба		Інтенсивність росту на середовищах з рН ²		Каталазна активність ¹	Нітрагредуказна проба ¹
			7,1	6,5	7,1	6,5		
<i>Vallee</i>	10	+	19	17	++	+++	+	-
	20	+	26	22	++	++	+	-
	30	+	41	40	+	+	+	-
“ШХ”	10	+	29	27	++	++	-	-
	20	+	37	38	+	++	-	-
“ШВ”	10	+	14	11	++	+++	-	-
	20	+	22	19	+	++	-	-

¹ Результат: (+) – позитивний; (-) – негативний.
² Інтенсивність: (+) – незначна; (++) – помірна; (+++) – висока.

спостерігали на удосконаленому середовищі, ніж на стандартному. Найбільш інтенсивний ріст спостерігали в мікобактерій штаму “ШВ”, до того ж початок росту колоній цього штаму був на 3–15 діб раніше за інші.

Бактеріоскопічними дослідженнями мазків, приготовлених із виділених культур, не виявлено мікобактерій, які б відрізнялися морфологічно від вихідних штамів. Біохімічні властивості досліджуваних культур також не змінилися. Це узгоджується з нашими попередніми даними і вказує на те, що на поверхні ґрунту на мікобактерій більш інтенсивно впливають різноманітні шкідливі фактори зовнішнього середовища. У результаті цього збудник туберкульозу втрачає життєздатність в значно коротший термін, ніж це відбувається в більш глибших прошарках.

За мікроскопії досліджуваної суспензії, виготовленої з тест-об’єктів, відібраних з прошарків 5–20 см на 15–120 добу дослідження, відмічали значну кількість мікобактерій, які не відрізнялися за морфологічними ознаками від вихідних культур. Починаючи зі 135 доби, при бактеріоскопії суспензії культури штаму “ШХ” спостерігали, поряд з типовими, кокоподібні мікобактерії та блакитні палички. Морфологічні зміни мікобактерій штаму “ШВ” реєстрували зі 150 доби досліду, а *Vallee* – 180 доби.

Мікобактерії штаму *Vallee* зберігали свою життєздатність в повнопрофільному чорноземі сім місяців, а в слабозмитому – шість (табл. 126).

При цьому виявили формування перших колоній на вдосконаленому середовищі на 1–8 діб раніше, ніж на стандартному. У динаміці виділення мікобактерій з кожного прошарку спостерігалася тенденція до затримки початку росту культури в більш пізніші терміни відбору проб.

**126. Початок росту мікобактерій штаму Vallee
у динаміці досліджень***

Тип чорнозему	Глибина залягання тест-об'єкта, см	Доба відбору проби				
		60	120	180	210	240
Повнопр- фільний	5	36/32	41/39	45/44	–	–
	10	34/31	43/36	51/47	59/55	–
	15	36/31	47/39	49/41	57/56	–
	20	31/31	45/41	52/49	–	–
Слабо- змитий	5	36/34	45/43	47/45	–	–
	10	37/33	46/44	52/47	–	–
	15	39/37	41/39	48/46	–	–
	20	35/34	44/39	55/52	–	–

* Тут і далі в таблицях: чисельник – початок росту культури на середовищі з рН 7,1; знаменник – рН 6,5.

Культуральними дослідженнями тест-об'єктів зі штамом “ШХ” встановлено, що досліджувані мікобактерії виживають у чорноземах до 6 місяців (табл. 127).

Підкреслимо, що в слабозмитому ґрунті на глибині залягання 5 см культура не виділялася вже після четвертого місяця дослідження. На середовищі з рН 6,5 колонії формувалися на 1–12 добу раніше, ніж на такому з рН 7,1.

Мікобактерії штаму “ШВ” зберігали життєздатність протягом п'яти місяців досліджень. У повнопрофільному чорноземі така здатність мікобактерій зберігалася протягом шести місяців (табл. 128).

Різниця в часі формування колоній на вдосконаленому та стандартному середовищах становила 1–6 діб. Отже, визначено, що культури мікобактерій,

127. Початок росту мікобактерій штаму “ШХ” у динаміці дослідження*

Тип чорнозему	Глибина залягання тест-об'єкта, см	Доба відбору проби			
		60	120	180	210
Повнопр- фільний	5	38/36	45/41	62/50	–
	10	35/34	43/42	59/53	–
	15	39/35	47/41	62/57	–
	20	41/36	46/43	61/55	–
Слабо- змитий	5	39/34	49/45	–	–
	10	36/35	51/47	68/63	–
	15	39/37	47/44	64/59	–
	20	37/36	46/44	67/60	–

128. Динаміка росту мікобактерій штаму “ШВ”*

Тип чорнозему	Глибина залягання тест-об'єкта, см	Доба відбору проби			
		60	120	150	180
Повнопро- фільний	5	28/26	34/31	51/47	–
	10	31/27	35/31	49/41	–
	15	27/25	31/27	44/39	48/41
	20	30/29	35/33	47/44	–
Слабо- змитий	5	29/26	34/32	49/45	–
	10	33/29	38/33	47/44	–
	15	32/30	36/30	55/49	–
	20	31/30	37/33	53/47	–

виділені з повнопрофільного чорнозему, формують перші колонії, в основному дещо раніше, ніж зі слабозмитого. Глибина залягання тест-об'єктів 10 та 15 см виявилася найоптимальнішою для тривалого збереження патогенними мікобактеріями своєї життєздатності.

Зміна вірулентних властивостей мікобактерій після тривалого перебування в ґрунті. Дані проведення біопроби з досліджуваними культурами порівнювали з результатами, що були отримані за визначення патогенних властивостей цих культур до внесення в ґрунт. Експериментом встановлено, що всі вихідні штами володіли високим ступенем вірулентності, викликаючи загибель лабораторних тварин упродовж 37–44 діб (табл. 129). За патолого-анатомічного дослідження виявили в усіх тварин генералізовану форму туберкульозу.

129. Вірулентні властивості вихідних штамів мікобактерій*

Штам міко- бактерій	№ морської свинки	Результат алергічних досліджень на добу біопроби		Маса морської свинки, г		Доба загибелі тварини	Результат патолого- анатомічного розтину
		30	60	до зара- ження	у кінці дослідку		
<i>Vallee</i>	1	+*	X	364	321	44	+
	2	+	X	359	322	41	+
“ШХ”	3	+	X	375	349	43	+
	4	+	X	378	331	39	+
“ШВ”	5	+	X	374	352	37	+
	6	+	X	369	341	39	+

* Результат дослідження: (+) – позитивний; X – не проводилося.

За біологічного дослідження культур мікобактерій трьох згаданих штамів, що були виділені з поверхні чорноземів на 20 добу вивчення впродовж літнього досліду, встановили зниження їх вірулентних властивостей (табл. 130).

130. Біологічні властивості патогенних мікобактерій після перебування на поверхні ґрунту*

Матеріал для зараження		№ морської свинки	Результат алергічних досліджень на добу біопроб		Маса морської свинки, г		Доба загибелі тварини	Результат патолого-анатомічного розтину
			30	60	до зараження	у кінці досліду		
тип ґрунту	штам мікобактерій							
Повнопрофільний	Vallee	11	+	X	368	331	49	+
		12	+	X	374	339	52	+
	“ШХ”	13	+	+	361	352	67	+
		14	+	+	395	351	72	+
	“ШВ”	15	+	X	388	327	54	+
		16	+	+	356	320	64	+
Слабозмитий	Vallee	17	+	+	400	371	71	+
		18	+	+	398	357	79	+
	“ШХ”	19	-	+	376	352	82	+
		20	+	+	381	343	87	+
	“ШВ”	21	+	+	390	861	66	+
		22	+	+	386	343	71	+

* Результати дослідження: (+) – позитивні; X – не проводилися.

Дещо подібна ситуація спостерігалася і в дослідженні мікобактерій, виділених у ґрунтах з глибини залягання 5–10 см, де також виявили зниження вірулентності збудника (табл. 131).

За біологічних досліджень суспензії, з якої не вдалося виділити мікобактерій при культивуванні, в усіх випадках отримали негативний результат. На туберкулін такі морські свинки не реагували. Під час контрольних зважувань зниження маси тварин не фіксувалося. На 150 добу біопроб провели забій дослідних тварин. За патолого-анатомічного розтину ознак, характерних для туберкульозної інфекції, не виявили.

Отже, на глибині залягання в ґрунті до 20 см мікобактерії штаму *Vallee* лишаються життєздатними 6 міс., у прошарках 10 та 15 см повнопрофільного чорнозему – 7 міс., штаму “ШХ” – 6, а лише в прошарку 5 см слабозмитого

131. Біологічні властивості мікобактерій штамів Vallee, “ШВ”, “ШХ” після перебування на різних прошарках ґрунту*

Матеріал для зараження			№ морської свинки	Результат алергічних досліджень на добу біопробі		Маса морської свинки, г		Доба загибелі тварин	Результат патолого-анатомічного розтину
тип ґрунту	глибина залягання тест-об'єкта, см	час перебування тест-об'єкта в ґрунті, діб		30	60	до зараження	у кінці досліду		
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Властивості штаму Vallee									
Повнопрофільний	5	135	101	+	X	375	340	56	+
			102	+	+	380	355	69	+
	10	150	103	+	+	405	355	71	+
			104	+	+	390	340	62	+
	15	150	105	+	X	360	310	53	+
			106	+	X	385	360	61	+
	20	150	107	+	X	380	330	61	+
			108	+	+	400	325	74	+
Слабозмитий	5	135	109	-	+	400	365	68	+
			110	+	+	390	330	70	+
	10	150	111	+	+	370	340	76	+
			112	+	+	385	365	63	+
	15	150	113	+	X	360	320	48	+
			114	+	X	390	315	59	+
	20	135	115	+	+	395	315	82	+
			116	+	+	360	310	77	+
Властивості штаму “ШВ”									
Повнопрофільний	5	105	117	+	+	405	376	78	+
			118	+	+	390	352	71	+
	10	105	119	+	+	395	360	64	+
			120	+	+	373	322	69	+
	15	105	121	+	+	400	353	84	+
			122	+	+	392	366	75	+
	20	120	123	+	+	370	347	69	+
			124	+	+	375	355	72	+

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Слабо-змитий	5	105	125	+	X	391	352	58	+	
			126	+	+	385	366	67	+	
	10	105	127	+	+	370	345	81	+	
			128	–	+	368	330	72	+	
	15	105	129	+	+	391	360	76	+	
			130	+	+	385	350	67	+	
	20	105	131	+	+	390	372	83	+	
			132	+	+	392	365	81	+	
	Властивості штаму “ШХ”									
	повно-про-філь-ний	5	120	133	+	+	370	342	64	+
134				+	+	365	351	69	+	
10		135	135	–	+	390	363	81	+	
			136	+	+	386	348	89	+	
15		120	137		+	375	350	73	+	
			138	+	+	380	341	82	+	
20		120	139	+	+	405	372	77	+	
			140	+	+	398	377	65	+	
слабо-змитий		5	105	141	+	+	370	355	54	+
				142	+	+	367	349	60	+
	10	120	143	+	+	400	368	82	+	
			144	+	+	391	366	72	+	
	15	120	145	+	+	365	359	88	+	
			146	+	+	370	331	71	+	
	20	120	147	–	+	384	350	77	+	
			148	+	+	390	356	82	+	
* Результат дослідження: (+) – позитивний; (–) – негативний; X – не проводилося.										

чорнозему – 4 міс., штаму “ШВ” – 5, у прошарку 15 см повнопрофільного чорнозему – 6 міс. Після тривалого перебування в ґрунті мікобактерії тільки знижують вірулентність, зберігаючи потенційну генетично закладену здатність тривало виживати, щоб залишитися в природі як певний вид мікроорганізму.

Необхідно відзначити, що виділені з об’єктів довкілля тривало неблагополучного господарства атипові мікобактерії, які, за повідомленнями численних науковців, постійно знаходяться в навколишньому середовищі, також можуть з’являтися внаслідок впливу на патогенні мікобактерії низьких як плюсових, так і мінусових температур. За таких умов, і наші результати досліджень переконливо це підтверджують, відбувається адаптивна перебудова

генетичного апарату мікобактерій, що приводить до появи нових рас мікроорганізмів з відповідними властивостями, зберігаючи можливість (на певному етапі конверсії) реверсії у вихідну агресивну (патогенну) форму збудника туберкульозу.

Із огляду на викладене, термін “резистентність” мікобактерій, який досить часто використовується рядом дослідників, є не тільки дискусійним, але й науково необґрунтованим, оскільки виживання мікобактерій, у тому числі й під впливом дезінфікуючих речовин, відбувається не за рахунок специфічної будови стінки, а за рахунок лабільного генетичного апарату, який в силу тих чи інших змін умов довкілля досить легко перелаштовує відповідні гени на створення нових можливостей (властивостей) виживати, аж до переходу в інший підвид збудника туберкульозу, тобто в іншу расу мікроорганізму.

Тому різні морфологічні форми мікобактерій, ідентифіковані нами на певних етапах дослідження одного штаму, є ланками того ж самого ланцюга, в якому рушійною силою є генетичний код, що постійно змінюється, і особливо активно за впливу різноманітних чинників.

ЕФЕКТИВНІСТЬ ІМУНІЗАЦІЇ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ВАКЦИНОЮ *BCG* ТА ДИСОЦІАТИВНИМИ ФОРМАМИ *M. BOVIS*

Проблема туберкульозу зумовлена, поряд зі значною мінливістю мікробної клітини, виходячи з високої здатності змінюватися, пристосовуючись до умов довкілля, ще й відсутністю надійного специфічного профілактичного препарату – вакцини. Ефективність існуючої *BCG* вакцини знижується через стимулювання алергії, яка виявляється у тварин та людини після щеплення профілактичним препаратом ППД-туберкулін для ссавців, а ще через часову втрату генів вакцинного запасу. Все це, без сумніву, спонукає науковців до пошуку нових сучасних імуногенних штамів мікобактерій.

8.1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Набутий імунітет щодо туберкульозу, доказом якого є феномен Коха, виробляється в організмі після перенесеної інфекції і забезпечує захист. Завдання профілактичної імунізації полягає в тому, щоб штучно створити в організмі набутий імунітет. Численні дослідження, проведені з метою одержання ефективної вакцини з убитих мікобактерій туберкульозу чи їх фракцій, й дотепер не привели до результатів, які могли б застосовуватися в практичних умовах. Тому жива вакцина з атенуйованих мікобактерій туберкульозу поки що є єдиним загальновідомим засобом штучної імунізації людини та тварин.

Живі вакцини проти ряду інфекцій (віспа, поліомієліт, сибірка, туляремія, бруцельоз й ін.) високоефективні й широко застосовуються. Перша жива вакцина проти туберкульозу, яка використовувалася у великої рогатої худоби, була розроблена Behring (1902). Ця *bovo*-вакцина складалася із мікобактерій туберкульозу людського виду послабленої вірулентності. У великої рогатої худоби вона викликала виражений імунітет але, оскільки після її введення у морської свинки виникало прогресивне захворювання туберкульозом, вакцина в людей застосовуватися не могла.

Культура *BCG* (*Bacille de Calmette et Guérin*) на основі її доведеної нешкідливості і вираженої імунізуючої здатності застосовується вже більше 90 років, вона випробувана на мільйонах дітей і дорослих, а в окремих країнах і на великій рогатій худобі.

Завдяки глибокому вивченню вакцини *BCG*, можна було вирішувати численні проблеми біології мікобактерій, протитуберкульозного імунітету, підвищення ефективності самої вакцини і механізму її дії (Авербах і Литвинов, 1970).

Як і кожна жива вакцина, вакцина *BCG* повинна була володіти трьома головними властивостями: нешкідливістю, стабільністю і імуногенністю. Вакцинні штами мали характеризуватися деякою залишковою вірулентністю для того, щоб викликати в організмі доброякісний інфекційний процес, який

протікає протягом декількох тижнів і після утворення імунітету повністю згасає. Мікобактерії, які не здатні розмножуватися в організмі (тобто повністю втратили свою вірулентність), не можуть і застосовуватися як жива вакцина, – наголошує Вейсфеллер (1975 р.). Культура *BCG* розмножується в організмі морської свинки протягом двох–трьох місяців, після чого кількість живих бактерій швидко знижується і в організмі залишається тільки невелика їх кількість. Динаміка вакцинного процесу залежить від введеної дози і від швидкості утворення імунітету. У морської свинки – тварини, особливо сприйнятливої щодо збудника туберкульозу, – вакцина *BCG* ніколи не викликає прогресивного захворювання. Handuroy й Rosset (1951) показали, що великі дози *BCG* спричинюють прогресивне захворювання і загибель. Saenz (1955) встановив, що ховрахи є дуже чутливими до токсичних речовин мікобактерій туберкульозу і навіть вбиті бактерії, введені у великій кількості, можуть призвести до загибелі тварин. Jespersen й Bentzon (1964) на підставі високої чутливості ховрахів вивчали залишкову вірулентність субштамів *BCG* на цих тваринах. Grumbach (1959) встановила, що в деяких рас мишей за внутрішньовенного введення *BCG* через 9–12 місяців розвиваються важкі зміни в нирках з інтенсивним розмноженням *BCG*.

Стабільність послабленої вірулентності атенуйованих бактерій й вірусів особливо важлива, якщо вони повинні застосовуватися як вакцини. Тому в 1927–1932 рр. було проведено понад 100 досліджень, спрямованих на вивчення можливості посилення вірулентності культури *BCG*. Проводилися пасажні досліди з введенням великих доз цих бактерій морським свинкам, резистентність яких знижували авітамінозом, токсинами, вторинною інфекцією. Не зважаючи на поодинокі випадки захворювання піддослідних тварин туберкульозом (Коршун, Движков і Горохникова, 1929), по перевірених дослідженнях такі дані підтвердилися. Petroff (1927) повідомив, що за дисоціації *in vitro* йому вдалося одержати з культури вірулентний варіант, проте Ельберт і Гельберг (1930) і Тогунова (1933) не підтвердили ці спостереження.

Calmette (1932) передбачав, що культура *BCG* стабільна, однак вона не може розглядатися як “virus fixe”. Штами *BCG*, які підтримуються в різних лабораторіях протягом багатьох років, відрізняються (Sufér і Dubos, 1951) своєю вірулентністю, здатністю розмножуватися в організмі, імуногенністю на білих мишах. Культура *BCG* із Копенгагена є найбільш вірулентною, із Бразилії (“Mogean”) – найменш вірулентною. Дози штаму *BCG* із Копенгагена, що відповідають 0,001 мг, викликають у деяких дітей абсцеси величиною в мандарин. Dubos і Pierce (1957) встановили, що штами *BCG*, які підтримуються в лабораторії “Tice” в Чикаго, здебільшого втратили свою імунізуючу здатність. В Угорщині до 1958 року застосовували культуру *BCG*, яка в дозі 0,1 мг внутрішньошкірно не спричинювала місцевої реакції у щеплених і володіла надто зниженими імунізуючими властивостями (Weiszfeiler, 1962). Jensen (1946) запропонував визначати залишкову вірулентність штамів *BCG* за розмірами місцевої реакції, яка спостерігається у морських свинок після внутрішньошкірного введення різних доз. Наразі цей метод введений в прак-

тику. Викладена інформація свідчить про певну мінливість культури *BCG* і сьогодні є ряд штамів з різними властивостями.

Зважаючи на певні позитивні результати, які досягнуті в протитуберкульозній імунізації людей за допомогою *BCG*, актуальною задачею подальшого дослідження все ще є розробка більш ефективної вакцини, яка б, по-перше, не викликала побічних ускладнень і, по-друге, не стимулювала розвиток алергії, що виявляється діагностичним препаратом (туберкуліном) у щеплених людей та тварин. Цей феномен (алергія) суттєво впливає на застосування *BCG* у тварин, оскільки алергічна реакція, яка розвивається у відповідь на введення туберкуліну, практично не відрізняється від такої, яка розвивається у тварини, хворої на туберкульоз від інфікованої польовим вірулентним штамом мікобактерій.

Тому велику цікавість являють роботи з вивчення вакцини, яка сконструйована із “*Vole Bacillus*”. Wells (1937, 1950) у Великобританії досліджував мишиний вид мікобактерій туберкульозу, який викликав спонтанну туберкульозну інфекцію у мишей полів *Microtus agrestis* і відрізняється за морфологією і культуральними властивостями від відомих патогенних мікобактерій теплокровних. Ці штами в офіційній номенклатурі одержали назву *Mycobacterium microti*. Wells і Brooke (1940) повідомили, що *Mycobacterium microti* є слабковірулентним для морської свинки і володіє більш високою імунізуючою здатністю, ніж *BCG*.

У дослідженнях Birkhauq (1946), Carper і Cohn (1943), Brooke і Day (1944), Irvine O’Connel (1950), Вейсфейлер (1946) встановили, що мишиний вид володіє такою самою імунізуючою здатністю, як і *BCG*. Вакцину, яка приготовлена з такого штаму, застосовували більш ніж у 10000 дітей і дорослих і порівнювали ефективність її з ефективністю *BCG*. Вакцина, за даними Hart й співавт. (1963), виявилася однаковою з *BCG*, але після внутрішньошкірного застосування часто спричинювала тривало незагоювані місцеві вирази шкіри. Тому в подальшому вимушені були відмовитися від її застосування. Sula (1955, 1958) одержав менш вірулентний, ейгонічно рослий варіант мишиного виду, який був названий вакциною М. Така вакцина широко використовувалася в Чехословаччині, але її застосування не мало кращих результатів, ніж застосування *BCG*. Тому подальше використання цієї нової вакцини не виявилось доцільним. Результати вивчення і застосування культури М. викладені в монографії Sula (1974).

Імуногенним атенуйованим штамом мікобактерій туберкульозу є культура R_1 , досліджували Trudeau й вивчена Steenken й Gardner (1946). Імуногенність культури R_1 досліджували Vandeviere і Willis (1963), які в різноманітних дослідках на морських свинках виявили, що імунітет, стимульований цим штамом мікобактерій у тварин, є більш тривалим, ніж за використання *BCG*.

Велику, об’ємну роботу з вивчення вакцини *BCG* на білих мишах проводили 35 років Вейсфейлер і Лищинська. Дослідники вивчали імунізацію проти туберкульозу живою вакциною *BCG* і *BCG*, вбитою нагріванням, а на морських свинках проводили кількісне вивчення імуногенної дії *BCG*, яка

залежить від дози і віку культури, розробили леофілізацію вакцини *BCG*. Перевіряли імуногенну здатність декількох атенуєваних штамів мікобактерій, у тому числі й регенерованих з фільтрівних форм. Надзвичайно важливим із чисельних пропозицій виявилися висновки Ю.К. Вейсфейлера (1975) стосовно залежності напруженості імунітету від тривалості персистенції в макроорганізмі атенуєваних мікобактерій та їх сенсibiliзувальної здатності щодо ППД-туберкуліну для ссавців. З цього приводу акцентується увага на тому, що "... не местная тканевая реакция, ни способность вызывать чувствительность у туберкулеза не являются показателями иммунитета". Вочевидь значущий висновок, оскільки домінує і дотепер думка про те, що напруженість протитуберкульозного імунітету безпосередньо залежить від сенсibiliзувальної здатності мікобактерій. Тому, незважаючи на тривале вивчення ефективності вакцини, деякі положення фундаментальної сторони механізму формування імунітету залишаються актуальними й донині.

Різноманітне висвітлення результатів вивчення *BCG* і профілактичної імунізації подано в монографіях Griesbach (1954), Irvine (1950), Frappier і Panisset (1957), Rosenthal (1957), Levy (1966), Mande (1966), Гельберг і Финкель (1970), Авербах і Литвинова (1970), Вейсфейлер (1975), Хазинов й співавт. (1985).

Водночас, незважаючи на щеплення вакциною *BCG* практично всього населення, зокрема Європейського континенту, туберкульоз (ТВ) є глобальною проблемою: щорічно реєструється 9 млн нових захворювань, – 2–3 млн смертей від цієї небезпечної інфекції (Alsteens D. й співавт., 2008). Інтерференція епідемії туберкульозу та ВІЛ-інфекції і швидке виникнення полірезистентних штамів ТВ є оптимальним для розвитку епідемії ТВ в останні роки. ТВ стає лідером серед факторів смерті у хворих на СНІД. Остаточо з'ясувалося, що існуюча вакцина (*M. bovis BCG*) лише частково ефективна в запобіганні легеневого ТВ, недостатньо ефективна для перешкодження дисемінованим формам захворювання, особливо в осіб з ознаками імунологічної недостатності.

Р.Е. Fine в 1995 та 1998 роках повідомляв, що використання слова "частковим" щодо ефекту *BCG* засноване на його дуже мінливій ефективності в різних випробуваннях. Н.Д. Hart в 1967 році наголошував, що в розвинених країнах взагалі *BCG* показала надто високу і постійну ефективність; на неї часто покладаються, щоб допомогти покінчити з епідеміями туберкульозу в Європі і Японії. Навпаки, її ефект в країнах, що розвиваються, набагато менш постійний (за деякими даними, вакцина не має вимірного ефекту на захворюваність туберкульозом взагалі). Р.Е. Fine (1995) та М.Е. Wilson й співавт. (1995) стверджують, що причини цього можуть бути пов'язані насамперед з організацією випробовування вакцини і з локальним оточуючим середовищем, ніж з вакциною як такою.

Г.А. Coldifz й співавт. (1994), Т. F. Brenez (2000) повідомляють, що хоча *BCG* дає значний захист, проте тільки на обмежений проміжок часу. До того ж вона не є ефективною в населення, вже сенсibiliзованого до мікобактеріальних антигенів (або попередньою *BCG* – вакцинацією, або латентною тубер-

кульозною інфекцією). Не виключено також, що контакт імунізованих *BCG* – вакциною осіб з циркулюючими в навколишньому середовищі штамми *M. tuberculosis* може підсилювати або якісно змінювати імунітет, створений за допомогою традиційної вакцини *BCG* із штаму *M. bovis*.

Нещодавні доклінічні і епідеміологічні дослідження D.Y. Jeon (2008) показали, що певні генотипи *Mycobacterium tuberculosis* (особливо штами лінії Beijing) можуть бути стійкими до індукованого вакциною *Mycobacterium bovis BCG* протитуберкульозного протективного імунітету. Однак зазначається, що все ж таки *BCG*-вакцинація захищає проти ТВ-інфекції (як показано на моделі легеневого ТВ на мишах) різних штамів *M. tuberculosis*, і штампспецифічна резистентність до *BCG*-індукованого захисного імунітету не є загальним явищем.

Таким чином, якщо вакцина *BCG* і ефективна для зниження рівня дитячого туберкульозу, лише за умови введення дітям, які не мають попереднього імунітету, що взаємодіє з вакцинацією. G.W. Comstock й співавт. (1976), P.D. Hart і I. Sutherland (1977), J.A. Sterne й співавт. (1998) показали, що післявакцинальний імунітет триває щонайкраще від 10 до 20 років. Отже, неонатальна вакцинація має незначний вплив на рівень захворюваності на туберкульоз у дорослих, – стверджують T.F. Brewer (2000) році та G.A. Coldifreb (1995), і для стримування глобальної епідемії ТВ невідкладно необхідні нові безпечні ефективні вакцини.

ВООЗ здійснює велику роботу по координації розробок зі створення нових протитуберкульозних вакцин. На рівні лабораторних випробувань знаходяться понад 200 варіантів вакцин, серед яких – цільноклітинні (атенуйовані, векторні), субдиничні, ДНК-вакцини, тощо. Клінічні випробування, за повідомленнями С.М. Кегг (2006), проходять шість вакцин. Передбачається, що повсюдне використання нових вакцин буде здійснено не раніше 2015 року. Сучасною парадигмою в методології конструювання ТВ-вакцин є або заміна *BCG*-вакциною, яка дає довшу тривалість захисту (якщо *BCG*-вакцинація при народженні може дати лише короткостроковий імунітет), або створення вакцини, яка може бути введена пізніше, для підсилення існуючого імунітету і забезпечення захисту в дорослих. Обидва підходи мають свої переваги і недоліки, і вакцини, котрі тепер проходять клінічні випробування, включають прихильників обох підходів. Проте одне важливе попередження – призначення вакцини у пізні строки (відносно післяекспозиційної ТВ-вакцинації – пізньої бустер стратегії) полягає в тому, що в регіонах, високоендемичних з туберкульозу, така вакцинація в багатьох випадках буде проводитися вже латентно інфікованим *Mycobacterium tuberculosis* особам. S.C. Dirrick й співавт. (2008) вважають, що для таких осіб після імунізації високий ризик потенційної індукції небезпечних реакцій, подібних до реакції Коха, тому прогрес щодо оцінки ефективності післяекспозиційної вакцинації обмежений. Їх експерименти з імунізації дванадцятьма антигенними препаратами *M. tuberculosis* і вакцинами, проведені на мишах, інфікованих різними дозами ТВ, показали, що ризик виникнення подібних ускладнень невеликий, але автори застері-

гають про необхідність крайньої обережності при переході від доклінічних випробувань до початкової фази клінічного тестування післяекспозиційних вакцин. Тому є необхідним не лише створювати подібну до *BCG* бустер-вакцину, але і післяекспозиційну вакцину – підхід, який несе свій, власний набір проблем та викликів. Згодом, вважають Т.М. Doherty і Р. Andersen (2005), єдиним практичним виходом може стати змішаний підхід, тобто багатофазна вакцина, котру призначають безвідносно інфекційного статусу особи і котра є активною і безпечною як для незараженої, так і для вже інфікованої особи.

Заміна *BCG* буде не легким завданням; *BCG*-вакцина буде, можливо, найбільш використовуваною у світі вакциною і, всупереч її обмеженням, дешевою і такою, що заслуговує на довіру. Неонатальна вакцинація *BCG* забезпечує надійний захист проти більшості тяжких дитячих проявів захворювання, таких як туберкульозний менінгіт. В Європі, де *BCG*-вакцинація об'єднана з кампаніями з виявлення та ізоляції дорослих, хворих на туберкульоз, у санаторії (або призначення нового курсу хіміотерапії для лікування), цього виявляється достатньо для швидкого зниження показників захворюваності. Однак у більшості країн світу, де туберкульоз залишається ендемічним, бракує ресурсів для виявлення і ізоляції або лікування нових випадків, і *BCG*-вакцинація сама по собі не в змозі знизити кількість захворювань у дорослих. У гіперендемічних регіонах, зазвичай це перенаселені халупи та міські нестрі, захворюваність настільки висока (у найгірших випадках сягає 1000 на 100 тис.), що більшість дорослих є постійно уразливими до інфекції, – наголошують Т.М. Doherty і Р. Andersen (2005). У такому оточуючому середовищі будь-яка особа без міцного імунітету незабаром буде інфікована. Щоб попередити це лише вакцинацією, потрібно стимулювати імунну відповідь, яка зберігається десятиріччями.

Залишається нез'ясованим, чи є це реальним завданням. Моделі на лабораторних тваринах (та й поточні дослідницькі парадигми, що фінансуються) є погано відповідними для визначення ефективності вакцин через роки або навіть десятиріччя. Це означає, що найбільш часто перед випробуваннями на людях дослідники намагаються вийти за межі ефективності *BCG* у короткотривалих експериментах у сподіванні, що більш сильна первинна імунна відповідь також веде до довготривалої імунної пам'яті. У протилежність даним, зареєстрованим у випробуваннях на людях, *BCG* взагалі забезпечує високі рівні захисту на моделях туберкульозу на тваринах (особливо на морських свинках). І хоча досягнуто значний прогрес у розробці дієвих субодичних вакцин, ще не існує повідомлень про їх ефективність, яка перевищувала б таку для *BCG* у незаражених осіб, – повідомляють Т.М. Doherty і Р. Anderson (2005). Отже, за такого підходу вакцини, які б виявилися настільки перспективними, щоб замінити *BCG*, мають бути знайдені серед живих мікобактеріальних вакцин.

Першою з вакцин для введення в клінічну практику є вакцина *BCG30*, котра пройшла першу фазу клінічних випробувань, про що повідомляти М.А. Horwitz і G. Harth в 2003 році. Ця вакцина походить від вакцинного шта-

му *BCG*, котрий було генетично модифіковано, щоб підсилити експресію імунодомінантного антигену Ag85B. Ідея цієї вакцини – покращити *BCG* шляхом експресії вищих рівнів антигену, які вже було показано як протективні. Крім того, ґрунтуючись на спостереженні, що *BCG* виявилася ефективною в ранніх зареєстрованих випробуваннях, але була гіршою – в пізніших дослідженнях, на чому наголошують G.A. Colditz й співавт. (1995) та M.A. Behr (2001), було припущено, що “сучасні” штами *BCG* були занадто атенуйовані і втратили в значній мірі імуногенність через безперервну втрату генів з вакцинного запасу. Це може допомогти пояснити тривалий період захисту, наданий *BCG*, оснований на реаналізуванні ранніх кампаній вакцинації, – стверджують N.E. Aronson й співавт. (1994).

Хоча можна сперечатися щодо варіацій в ефективності, які можуть пояснюватися тим фактом, що пізніші випробування були здійснені, порівняно з ранніми іспитами, за інших обставин і на іншому населенні; гіпотезу “атенуації” підтримують дві лінії досліджень. Першою є вакцина *rBCG30* як така: M.A. Herwits і G. Harth в 2003 році повідомили, що вона має безсумнівно покращену ефективність, ніж вихідний вакцинний штам. Покращена ефективність *rBCG30* виявилася дещо несподіваною, тому що *BCG* має функціональний ген для Ag85B. Однак робота V. Rao й співавт. (2003) показала, що надекспресія гена може змінювати імунну відповідь на антигени, які вони кодують, нагадуючи, що всього лише присутність гена мало говорить нам про його експресію *in vivo*, що ефекти такого гена можуть бути модульовані присутністю чи відсутністю інших генів.

Другою лінією підтримуючого свідчення є спостереження G.W. de Lisle й співавт. (2005), що нові вакцини, основані на атенуації *Mycobacterium bovis* (материнського штаму *BCG*), є більш вірулентними і дають більшу протективну ефективність, ніж *BCG*. На доповнення, високоатенуйовані мутанти *M. tuberculosis*, хоча і зберігають протективність у вакцинах, є менш вірулентними – і менш протективними, – ніж *BCG*, на це вказують V.K. Sambandamurthy й співавт. (2005). Ці результати сумісні з розбіжностями щодо *BCG*, яка стала “занадто атенуйованою”. Базуючись на цій самій концепції, A.S. Pyt й співавт. в 2003 році повідомили, що *BCG*, в яку було введено *RD1* локус (дозволяє їй секретувати ESAT-6-CFP10 комплекс), є більш вірулентною, але і більш протективною, ніж материнський *BCG*-штам. Цікаво, що цей вакцинний штам (названий *BCG:RD1*), як показали L. Majlessi й співавт. (2005), ініціює імунну відповідь, яка є якісно більш подібною до такової *M. tuberculosis*, ніж *BCG*. Це свідчить про те, що антигени, кодовані *RD1* (і втрачені під час атенуації *BCG*), можуть значно модифікувати тип імунної відповіді, викликаной мікобактеріальною вакциною, або певний рівень вірулентності (можливо, більший, ніж у сучасних вакцинних штамів), є необхідним для оптимальної індукції сильної імунної відповіді живими вакцинами. До речі, повідомляють A.T. Kamath й співавт. (2005) ефективність є сумнівною, якщо такі гіпервірулентні вакцинні штами будуть мати профіль безпеки, необхідний для масової вакцинації, особливо в зонах високої захворюваності на вірус імунодефіциту людини.

Остання з похідних з *BCG* вакцин, котра наблизилася до клінічного тестування, використовує інший і більш технічно складний підхід. *rBCG::ureC-110+* вакцина є урезадефіцитним мутантом *BCG*, котрий експресується геном лістеріозлізину *O* *Listeria monocytogenes*. Ці бактерії не здатні затримувати дозрівання фагосоми внаслідок відсутності уреазы і є менш вірулентними, ніж *BCG* дикого типу в імунодефіцитних (гострий комбінований імунодефіцит) мишей. Це, як стверджують J.M. Comros й співавт. (1996), може робити вакцину більш безпечною для населення, в якого поширений вірус імунодефіциту людини (котрий, звичайно, тяжіє до регіонів з найвищим рівнем захворюваності на туберкульоз), і де *BCG*-вакцина може спричиняти поодинокі випадки дисемінованого *BCG*озу. На доповнення, знижений рН у фагосомі, що зріє, забезпечує оптимальні умови для лістеріозлізину, котрий, вважається, ушкоджуючи мембрану фагосоми, дозволяє проникнення рідини у цитозоль і потенційно підвищує кількість антигену бактеріального походження, придатного для презентації CD8 Т-клітинам через шляхи цитозольного очищення, як описано Р. Conzadf й співавт. (1999) та L. Grode й співавт. (2002).

Інші групи дослідників спробували розробити нові вакцини шляхом атенуації *M. tuberculosis* замість експресії підсилення гена в *BCG*, виходячи з того, що це дасть найкращу стимуляцію природного імунітету, який створюється після інфекції *M. tuberculosis*. Однак *M. tuberculosis* чудово пристосована до уникнення ерадикації імунною системою; навіть вилікована інфекція *M. tuberculosis* не обов'язково дає довготривалий захист (de Boer A.S. співавт., 2000). Слід зауважити, що захист, індукований вилікуваною інфекцією *M. tuberculosis* (моделі на тваринах), не завжди перевищує імунітет після вакцинації *BCG* незараженого реципієнта (Mallenropf H.J. й співавт., 2004). У стані розробки знаходяться принаймні дві ТВ вакцини, засновані на атенуованій *M. tuberculosis*. Одним з найбільш суперечливих питань, чи потребує зусиль подібна стратегія, є ризик, що вакцинний штам, який базується на *M. tuberculosis*, може реверсувати до вірулентної форми; і обов'язково постане питання: наскільки багато атенуації є достатньою, – стверджують N. Brown й співавт. (2005).

Кращий підхід – створити мутації двох ключових генів, щоб зменшити потенціал для реверсії до вірулентної форми. Одна така вакцина, розроблена у Госпіталі Альберта Ейнштейна в Нью-Йорку, PanD. Leu. auxotroph of *M. tuberculosis* (Sampson S.L. й співавт., 2004; Sambandamurthy V.K. й співавт., 2005), продемонструвала і безпечність на імунодефіцитних scid мишах, і протективну ефективність на інфекційній моделі у високосприйнятливих морських свинок. Мутант *ArhoP/R*, у якому *rhoP*-фактор вірулентності інактивований шляхом вставки гена антибіотику, є другою вакциною, яка виглядає багатонадійною на тваринних моделях, про що повідомляють С. Raynand й співавт. (2002). Надія полягає в тому, що ці вакцини індукують кращі, можливо, триваліші імунні відповіді, ніж *BCG*, але з можливістю бустер-ревакцинації у пізніший строк, за необхідності. Однак, якщо ревакцинація є необхідною, то вакцини малоймовірно будуть успішними в такій ролі.

Подібно до *BCG*, усі обговорювані вакцини передбачаються для імунологічно інтактних реципієнтів, що обмежує їх застосування новонародженим у країнах, що розвиваються. В експериментах С.С. Leung й співавт. (2001) бустер-*BCG* створений імунітет після другої дози *BCG* в пізніший строк багаторазово демонстрував відсутність будь-якого покращеного ефекту. Ця невдача збігається з результатами на тваринах, котрі показали, що *BCG* (і можливо, будь-яка мікобактеріальна жива вакцина) потребує періоду розмноження і дисемінації в організмі хазяїна, щоб стимулювати захисну імунну відповідь. Якщо цей процес блокувати хіміотерапією незабаром після вакцинації, то протективний ефект вакцинації анулюється, про що повідомляють С.О. Siebenman (1951) та J. Francis (1956). Існуюча імунна відповідь (будь-то завдяки попередній *BCG*-вакцинації або перехресним імунним відповідям після контакту з іншими мікобактеріями з навколишнього середовища), виявляється, має той самий ефект, який веде до швидкого очищення від *BCG*, – стверджують Е. Lozes (1997); В.М. Buddle й співавт. (2002) та L. Brandf й співавт. (2002). Це можна пояснити і продемонстрованим ефектом *BCG*-вакцинації у новонароджених, і в дорослого населення, де було виключено осіб зі шкірнопозитивним тестом (Coldifx G.A. й співавт., 1995), і його невдачею у випробуваннях, до яких було включено мікобактеріально сенсibiliзованих дорослих осіб. У разі, як очікувалося, нові мікобактеріальні вакцини не в змозі стимулювати довготривалий імунітет, неонатальна вакцинація може потребувати підсилення немікобактеріальними вакцинами, так званими бустер-вакцинами, доводять Т.М. Doherty і Р. Andersen (2005).

У протилежність до вакцин, сконструйованих для заміни *BCG*, пізні бустер-вакцини націлені на одержання вигоди широкого використання *BCG* шляхом бустер-імунізації в молоді, вже первинно щепленої шляхом ранньої вакцинації в дитинстві. За повідомленнями Р. G. Smith в 1994 році, приблизно 3 млрд населення, половина населення світу, одержали *BCG*, і більшість з них мешкає в регіонах, де ТВ є ендемічним захворюванням. Навіть якщо протективний ефект нових вакцин триває не довше, ніж індукованих *BCG*, він все ще значно зменшує кількість нових випадків ТВ шляхом зменшення захворюваності на піковому віці для ТВ (від 25 до 35 років). Діхотомія «грундування/бустер» дещо уводить в оману. Навіть в регіонах, де *BCG*-вакцинація є плановою, не кожна особа буде вакцинована *BCG* і не кожний вакцинований буде мати ефективну імунологічну пам'ять. Таким чином, бустер-вакцини потребуватимуть і здатності стимулювати, і ефективних первинних відповідей. Але вимоги дещо відмінні від вимог до вакцин, призначених замінити або конкурувати з *BCG* для неонатальної вакцинації.

Вакцина, призначена замінити *BCG*, щоб серйозно розглядатися, як стверджують Т.М. Doherty й співавт. (2004); Y.A. Sreiky й співавт. (2004); А. Williams й співавт. (2005), повинна продемонструвати кращу за *BCG* ефективність, тоді як бустер-вакцини часто не є більш ефективними, ніж *BCG*, під час генерування первинних імунних відповідей. Але вони мають додаткову умову – бути ефективними як у сенсibiliзованих, так і в інтактних реципі-

ентів, критерій, котрого *BCG* напрочуд не достас. Більш того, при конструюванні вакцин для ТВ-ендемичних регіонів з високою перевагою латентного ТВ, потрібно мати на увазі їх потенційну активність у вже інфікованих осіб (післяекспозиційні вакцини). Це може потребувати включення цілком відмінного набору генних продуктів, націлених на гени, які можуть регулюватися мікобактеріями у відповідь на довготривалу експозицію в антагоністичному середовищі активованого макрофага.

Різноманітні живі вакцини створювались як бустер-вакцини, в тому числі рекомбінантна аденовірусна вакцина і рекомбінантний штаб *Shigella*, сконструйовані як система-носії для ДНК вакцини (Voqels R. й співавт., 2003; Fouts T.R., 2003). Ці вакцини все ще перебувають в стадії розробки, і не зрозуміло, коли вони будуть готові для клінічних випробувань. Проте, як повідомляють Н. Мо Шане й співавт. (2004), одна жива бустер-вакцина наразі знаходиться у клінічному випробуванні. Йдеться про MVA-85A, де рекомбінантний, реплікаційно-дефіцитний вакцинний вірус експресує сильноімуногенний антиген 85A *M. tuberculosis* (Goonetillere N.P. й співавт., 2003). Вакцина добре досліджена на тваринних моделях, і дані з перших клінічних іспитів, як свідчать Н. Мо Шане й співавт. (2004) та N.P. Goonetillere й співавт. (2003), показують, що вона імуногенна і вочевидь безпечна для людини.

Серед першої хвилі нових ТВ-вакцин, що проходять клінічні іспити, є продукти, основані на рекомбінантних протеїнах. Як стверджують R.K. Gupta й співавт. (1995) та E.B. Lindblad й співавт. (1997), в минулому рекомбінантні білкові вакцини були не дуже успішні у стимуляції сильної Th1-відповіді через нестачу адекватного ад'юванту для генерування сильних клітинно-опосередкованих імунних відповідей у людини без виникнення неприйнятних побічних ефектів. Протягом багатьох років єдиним ад'ювантом, санкціонованим для людини, були гідроксид та фосфат алюмінію, ефективні для вакцин, що генерують гуморальний імунітет (дифтерійна, правцева, гепатитна В вакцини). Дійсно, оскільки цей ад'ювант, стверджують J.M. Brewer й співавт. (1999), впливав на імунну відповідь в напряму пулу Th2, було показано E.B. Lindblad й співавт. (1997) зниження захисту, викликане вакцинацією проти *M. tuberculosis*. 2003 року A. G. Podda й співавт. повідомили, що для використання в людських вакцинах був санкціонований ад'ювант MF59, але він був обмежений для тих профілактичних препаратів, де ключовим є генерування гуморальної відповіді, таких як грип.

Зараз до клініки надходять нові ад'юванти, і деякі з них продукують сильні Th1-відповіді, що робить їх перспективними кандидатами для вакцин проти *M. tuberculosis*. Ці нові вакцини, як свідчать повідомлення J.T. Ulrich і K.R. Myers (1995); K. Linquan й співавт. (2002); T.M. Doherty й співавт. (2002); S. Reppoloni й співавт. (2003); P. Hoqarth й співавт. (2003); L. Holten-Andersen й співавт. (2004), зобов'язані своїм успіхом на тваринних моделях покращеному розумінню активації імунної системи у відповідь на збережені молекули патогенів, побудовані навкруги бактеріальних ліпідів, бактеріальних токсинів або аналогів цих молекул. У деяких випадках (монофосфорилліпід А, напри-

клад) рецептори відомі і є частиною родини Toll-подібних рецепторів. Іншими словами, ми починаємо використовувати деякі з технік, що використовує *M. tuberculosis*, щоб маніпулювати імунними відповідями. Ми можемо очікувати побачити більше вакцин, які використовуватимуть цей підхід у майбутньому, тому що обидва рекомбінантних антигени і ад'юванти можуть бути легко синтезованими за великою шкалою під час використання у вакцинному виробництві.

Першою з цих субодиничних вакцин, що ввійшли до клінічних іспитів, є вакцина 72f, розроблена Corixa і GSK разом (Sreiry F. A. й співавт., 2004). Ця вакцина є зрощеною молекулою, що складається з двох протеїнів, з PPE родинним членом Rv1196, вставленим усередину вірогідно серин-протеазою Rv0125, котра є представленою, двома фрагментами. Використаний ад'ювант містить сапонін похідний QS21, змішаний з TLR4 ліганд монофосфорилліпідом А (Sreiry F.A. й співавт., 2004). На доповнення його активності для праймування, ця вакцина продемонструвала також *BCG*-бустер ефект, – стверджують L. Brandt й співавт. (2004). Другий рекомбінантний протеїн, хоча одержаний незалежно Statens Serum Institute, є дуже подібним за своєю філософією розробки. Це зрощена молекула, що складається з двох імунодомінант, декретованих білків з *M. tuberculosis* (ESAT-6 і Ag85B) і має доведену на тваринних моделях високу ефективність, ранжовану від мишей до приматів, фактично більш ефективну, ніж одиничні антигени (Doherty T.M. й співавт., 2004; Weinrich Olsen A. й співавт., 2001). Вакцини мають також доведену ефективність як бустер для *BCG* і підсилюють її ефективність, навіть хоча компонент вакцини ESAT-6 не представлений у *BCG*, про що повідомляють T.M. Doherty і P. Andersen (2005).

Ag85B-ESAT-6, зрощений протеїн, випробовували двома клінічними іспитами у 2005–2006 рр. Перший з них тестував вакцину в традиційній парентеральній стратегії вакцинації, котра використовує суміш олігодеоксинуклеотидів і полікатіонних амінокислот як ад'ювантів (Linqau K. й співавт., 2002). Другий тест, який проводили паралельно, тестував той самий антиген за периназального застосування, використовуючи LTK63, модифікований, термолабільний ентеротоксин з *Escherichia coli* як ад'юванту (Peppoloni S. й співавт., 2003). ESAT-6 застосовується також як діагностичний засіб виявлення клітинно-опосередкованих імунних відповідей, котрі специфічно сигналізують про присутність активної інфекції (Ravn P. й співавт., 1999; Lalvani A й співавт., 2001; Doherty T. M. й співавт., 2002). Нові зрощені молекули, які не містять ESAT-6, є предметом поточного дослідження. І цікаво, чи єдиний антиген, знайдений у такий спосіб, може бути здатним замінити ESAT-6, і є членом тієї ж невеликої родини генів, але, у протилежність до ESAT-6, він представлений у *BCG*, про що повідомляють K. Linqau й співавт. (2002); I. Brosgt й співавт. (2002); S. Peppoloni й співавт. (2003); J. Dietrich й співавт. (2005).

Вочевидь, ці дві рекомбінантні вакцини можуть розглядатися як *M. tuberculosis* в мініятурі – вони містять два імунодомінантні антигени і використовують як ад'юванту модифіковані молекули, що походять від па-

тогенів людини, що стимулюють Th1-відповіді. Такий мінімалістський підхід визначає певні переваги. Шляхом вибору обмеженого числа ретельно тестованих імунодомінантних антигенів можна згенерувати сильну захисну відповідь, уникаючи можливості індукування небажаної модуляції відповіді або презентації антигену. Шляхом використання молекул ад'юванту (дещо модифікованих, щоб зменшити їх токсичність), які походять від людських патогенів, викликано саме той тип запальної відповіді, яким у нормі організм відповідає на бактеріальну інфекцію.

Усі описані вакцини є профілактичними препаратами, які мають вводитися ще до інфікування *M. tuberculosis* і, тим більше, до виникнення захворювання. Не зрозуміло, чи будуть вони ефективними, або навіть безпечними, якщо їх вводити вже інфікованим *M. tuberculosis* макроорганізмам. Для бустервакцин це є серйозним підходом; у ТВ-ендемичних регіонах до цільового населення, як можна очікувати, будуть включеними багато латентно інфікованих осіб. Незначна кількість (з доступних даних) експериментів на тваринах, повідомляє J. Turner й співавт. (2000), не дозволяє вважати, що провідні вакцини-кандидати індукують в інфікованих реципієнтів ефект, подібний до феномену Коха, та навіть вважати ці вакцини ефективними проти латентної фази захворювання. Вірогідно, що імунопрофілактика мільйонів людей, які потенційно латентно інфіковані *M. tuberculosis*, потребує комбінованої стратегії, яка використовує мультифазну вакцину, ефективну проти гострої та латентної інфекції. Стверджується (Sorensen A.L. й співавт., 1995), що гостра фаза інфекції *M. tuberculosis* характеризується швидким бактеріальним ростом і розвитком імунної відповіді, спрямованої на бактеріальні антигени, активно секретовані в першій ростовій фазі, такі як ESAT-6. Вакцини, розроблені наразі проти цих гострофазних антигенів, як повідомляють A. Weinrich Olsen й співавт. (2001); T.M. Doherty й співавт. (2004), можуть зменшувати гостроту початкової бактеріємії і захворювання, але вони не запобігають викоріненню інфекції. Однак, доводять K. Honer zu Bentrup й співавт. (2001) та J. Melrotra (2001) оскільки *M. tuberculosis* пристосована до гіпоксичного і ворожого середовища макрофагів хазяїна, то вона піддається істотній зміні в генній транскрипції, характерній, вважається, для латентного існування, і ця зміна в експресії генів може надати патогену можливість персистувати в оточенні сильних відповідей імунної пам'яті. Ця латентна стадія інфекції, повідомляє T.M. Doherty і P. Andersen (2005), є звичайно асоційованою з виживанням деяких бактерій у так званому "сплячому стані" з низькою або зміненою метаболічною активністю.

V. Vuan й співавт. (1996); D. R. Sherman й співавт. (2001) та M.I. Vosruil й співавт. (2003) повідомили, що вирощені *in vitro* в умовах, що імітують ті, що, вважається, мають існувати *in vivo*, *M. tuberculosis* пристосовуються спеціальними наборами генів, які частково перекриваються. Підвищена експресія генів, таких як HspX (так званий кристалін, Rv2031c, тощо), протягом стаціонарної фази росту (Vuan V. й співавт., 1996) виявляється критичною для виживання мікроорганізму (Vuan V. й співавт., 1998). В узгодженні з цими

спостереженнями *in vitro* L. Shi й співавт. (2003) повідомили, що транскрипція ряду генів регулюється зі зниженням, тоді як інші регулюються в інфікованих тварин строго з підвищенням після ініціації сильної імунної відповіді. Надлишок регуляторних протеїнів у геномі *M. tuberculosis*, повідомляють S.T. Cole й співавт. (1998), показує важливість здатності патогену адаптуватися протягом інфекції до різних умов середовища. Ця регуляторна пластичність може лежати в основі його здатності переключатися поміж гострим прогресуючим захворюванням і довготривалою латентною інфекцією.

На доповнення до викладених експериментальних даних, розпочинаються дослідження на людях, щоб одержати доказ в підтримку гіпотези, що імунні відповіді у здорових, але латентно інфікованих осіб націлені на інші антигени, ніж відповідь на гостру інфекцію (Doherty T.M. й співавт., 2002; Ravn P. й співавт., 1999). Є сподівання, що вакцинація іншими антигенами, такими як HspX, ідентифікованими *in vitro* методами, описаними вище, може сприяти імунній відповіді, котра буде допомагати запобіганню реактивації захворювання. Існує доказ, що подібний підхід може дійсно працювати. D.B. Lowrie зі співавторами в 1999 році з успіхом використали HSP65-based DNA вакцину на латентно інфікованих мишах, але ці дані дещо дискусійні, стверджують O.C. Turner й співавт. (2000) і підкреслюють необхідність подальших досліджень в цій сфері, особливо з використанням суворо обгрунтованих тваринних моделей.

Сферою, яка викликає подібний інтерес, є “активуєчий оживлення фактор” (“resuscitationpromoting factor”) або *rpf* гени. *Micrococcus luteus* експресує *rpf* ген, продукт якого потрібен, щоб оживити ріст сплячої культури *Micrococcus luteus* і який є істотним для росту цього організму. J.M. Tufariello й співавт. (2004) та K.J. Downing й співавт. (2005) продемонстрували, що *M. tuberculosis* має, щонайменше, п’ять *rpf* гомологів. І це знову наводять на думку про важливість латентності й оживлення для виживання *M. tuberculosis*. Припускаючи, що вони є суттєвими для повернення зі сплячого стану і імуногенними, декретованими антигенами, то вони й можуть бути спокусливими мішенями для вакцинації (Yegemeev V.V. співавт., 2003). Область післяекспозиційної вакцинації сьогодні інтенсивно досліджується, хоча вакцина ще в майбутньому. Пропонується ідея мультифазної вакцини, котра індукує відповіді проти антигенів гострої фази, забезпечуючи у такий спосіб захист, якщо реципієнт буде надалі інфікованим, а також проти антигенів, пов’язаних з латентним станом, так що захворювання знаходиться в ремісії навіть якщо реципієнт вакцини вже інфікований (Doherty T.M. й співавт., 2005).

ТВ-вакцини зараз лише надходять до клініки, проте шлях тестування вже добре прокладений: ризик індукування тяжкої реакції у вже інфікованих осіб і високий рівень співпадіння ТВ і вірусу імунодефіциту людини в багатьох регіонах означає, що вакцини вперше тестовані на безпечність і імуногенність в імунологічно інтактних осіб (ні вакцинованих *BCG*, ні шкірно-позитивних) ще до переходу до вірус-позитивного імунодефіциту людини і латентно ТВ-інфікованих осіб. Паралельно з цим, бустер-вакцини будуть потребувати

тестування у вже *BCG*-вакцинованих суб'єктів, щоб побачити можливе підсилення імунних відповідей. Перша з нових бустер-вакцин-кандидатів вступила до цієї фази у 2005 році. Вона вже пройшла екстенсивне тестування на тваринних моделях, приматах включно. Отже, виникнення проблем безпечності малоймовірне (Doherty Т.М. й співавт., 2005).

Залишаються два великих бар'єри для нових вакцин. Першим є питання ефективності. Давні іспити ТВ-вакцини, засновані на визначенні ефективності *BCG*, використовували простий клінічний кінцевий пункт: як багато випадків ТВ в групі вакцинованих цією вакциною порівняно з групами, вакцинованими плацебо або невакцинованими. ТВ розвивається поступово, і навіть у регіонах з високою захворюваністю показник захворюваності набагато менший за 1 %. Це означає, повідомляє G.V. Baily (1980), що для одержання надійних даних вивчення ефективності має тривати десятиріччя і охоплювати надто велику кількість учасників (типово понад 100 000). Це коштовний захід, не привабливий ані для виробників вакцини, ані для системи охорони здоров'я, яка має справу з мільйонами випадків щорічно. Праймінгові вакцини, такі як рекомбінантна *BCG* і атенуйована *M. tuberculosis*, повинні, як обговорювалося вище, використовуватися в імунологічно інтактного населення. Отже, кінцевий їх ефект щодо легеневого ТВ дорослих буде визначений лише через десятиріччя.

Швидшим шляхом визначення ефективності вакцин буде вплив їх на ТВ у дітей порівняно зі стандартною *BCG*-вакцинацією. Хоча таке дослідження має бути широким, його можливо завершити в декілька років, і для початку це є більш прийнятним напрямом. Бустер-вакцини мають коротший строк поміж вакцинацією і піковим віком для захворюваності ТВ дорослих, оскільки вірогідно вводяться молоді в підлітковому періоді. Однак це означає, що очікувати десятиріччя, щоб отримати чіткий можливий ефект. Таким чином, пізні бустер-вакцини, щоб оперативніше продемонструвати ефективність їх для людей, мають бути передусім тестовані проти педіатричного ТВ.

Сучасний прогрес у сфері діагностики ТВ може виявитися дуже важливим засобом у майбутніх клінічних випробуваннях. Число інфекції *M. tuberculosis* є набагато більшим, ніж кількість клінічних випадків, і недавнє покращення у діагностичних засобах, основане на визначенні імунних відповідей на фактори вірулентності *M. tuberculosis* (такі, як ESAT-6, котрі не є експресованими в *BCG* або в більшості мікобактерій оточуючого середовища), виявилось, як свідчать повідомлення M. Harboe й співавт. (1996); P. Ravn й співавт. (1999); L.A.H. van Pinxteren й співавт. (2000); A. Lalvani й співавт. (2001); Т.М. Doherty й співавт. (2002) перспективним для діагностики субклінічного і латентного ТВ. Останні дані Н. М. Vordermeier й співавт. (2002), вказують, що величина ESAT-6 відповіді може відображати тяжкість інфекції і прогнозувати пізніше захворювання (Doherty Т.М. й співавт., 2002). До того ж визначення рівня початкового захворювання (і високої ESAT-6 реактивності) краще, ніж рівень подальшого захворювання, може пропонувати можливість набагато скорішої оцінки ефективності вакцини і можливості використовувати значно менші

групи населення. Проте цей підхід до використання потребує валідації, і такі дослідження вже проводяться.

Інше питання полягає в тому, які наслідки навіть покращена вакцина буде мати на захворюваність ТВ, зважаючи на існування широкого резервуара латентного ТВ. Математичне моделювання прогнозує, що післяекспозиційна вакцина, ефективна для попередження захворювання в латентно інфікованих осіб, буде викликати значне зниження кількості нових випадків у короткий строк, але згодом преекспозиційна вакцина буде мати більш значний ефект повідомляють С.Л. Daby і S. Blower (2004). Тому ідеальним підходом буде використання єдиної мультифазної вакцини, котра виявиться ефективною і проти гострої, і проти латентної інфекції. Але сьогодні такої вакцини не існує.

У роботі, яку опубліковано в 2012 році В.О. Бусолом, відзначено, що запропоновані багатьма дослідниками різні методологічні підходи щодо конструювання протитуберкульозних вакцинних препаратів не дали бажаних результатів. Учений рекомендує інший шлях вирішення цієї проблеми: дослідних тварин імунізують вакциною, до складу якої входять мікобактеріальні туберкулопротеїни, полісахариди, ліпіди, нуклеїнові кислоти та мікроорганізми непатогенного патотипу *M. bovis*, а також формалін. Парентерально тваринам вводять препарат специфічного олігорибонуклеопептиду, а на 14 добу – вакцину. В імунізованих тварин, пояснює В.О. Бусол, розвивається стан імунної відповіді (алергія на ППД для ссавців) протягом двох місяців які лишалися здоровими 90 діб, у той час як контрольні тварини проявляли ознаки, характерні для туберкульозу.

Таким чином, хоча в розробці ТВ-вакцини пройдений довгий шлях, ще існують значні пробіли в знаннях, які мають заповнитися до того, як ми зможемо дійсно контролювати туберкульоз через нову стратегію вакцинації.

Утім, за даними ряду дослідників, вірулентність мікобактерій, тобто їх здатність розмножуватись в організмі і викликати патологічні зміни в ньому, залежить від певних умов.

Ю.К. Вейсфейлер в 1975 році вказував на те, що за безпосереднього пасажування від тварини до тварини культури зі слабкою вірулентністю не вдається посилити останню. У морських свинок з третього пасажу змін в органах не спостерігалось, відповідно слабка вірулентність цього штаму виявилася стійко закріпленою. Такі самі результати отримували і в разі пасажування атенуйованої культури.

Учений стверджує також, що молоді клітини мікобактерій більш вірулентні, ніж старі.

Існують повідомлення Р.О. Драбкиної (1963) та Т.Н. Ященко й И.С. Мечева (1973) про те, що за старіння та росту культури в несприятливих умовах спостерігається втрата нею вірулентності. Але останню можна поновити шляхом пересіву культури. Водночас відомо, що довготривале культивування на живильних середовищах сприяє втраті вірулентності мікобактерій, хоча шляхом пасажів через тварин можна її поновити.

Проте Ю.К. Вейсфейлер (1975) наголошує, що спонтанне зниження вірулентності лабораторних культур відбувається, можливо, внаслідок появи мутантів з пониженою вірулентністю, які ростуть швидше і при пересівах витісняють вихідні вірулентні особини.

Із літературних даних також відомо, що не завжди можна змінити ступінь вірулентності культур мікобактерій за її генетичного закріплення. Так, Н.Л. Кричевському в 1930 році не вдалося посилити вірулентність штаму *BCG* навіть при зараженні морських свинок різними методами (підшкірно, внутрішньочеревно, інтратестикулярно).

У дослідах Л.М. Моделя 1958 року виявилось, що вирощування культур на середовищі з підвищеною кислотністю призводить до зниження їхньої вірулентності.

Р.О. Драбкина (1963) та Р. Дюбо (1948) вважають, що вірулентність мікобактерій бичачого виду може бути послаблена, якщо вирощувати їх при рН 6,0–6,4. За цих умов краще ростуть R-форми колоній, ніж S-форми. Для останніх оптимальним є рН 6,8 – показник, який найбільш сприятливий для зберігання вірулентності. Хоча Р.О. Драбкина (1963) стверджує, що вірулентність мікобактерій туберкульозу не залежить від характеру їхніх колоній – гладких S-форм чи шорстких R-форм, але шорсткі R-форми все ж таки частіше бувають більш вірулентними, ніж гладкі S-форми. Вірулентність мікобактерій можна послабити дією на них ізоніазиду та його похідних. Пасажі мікобактерій на середовищах зі зростаючими дозами цих препаратів роблять їх стійкими до ізоніазиду, але вірулентність різко послаблюється.

Через наявність специфічних ліпідів у мікобактерій, спостерігається залежність рівня вірулентності від змін у складі їхніх ліпідів. Наприклад, вдалося з біомаси мікобактерій петролійним ефіром вилучити фракцію ліпідів, яка чітко відповідала ступеню вірулентності. Генетично пов'язані штами мікобактерій бичачого виду – вірулентний Ravenel-44, атенуйований-35 та авірулентний-852_п – містять; відповідно 22,9; 14,84 та 8,95 % ліпідів (від абсолютно сухої маси мікобактерій), повідомляє в 1967 році В.Г. Петровська. У зв'язку з цим ступінь імуногенності тієї чи іншої сконструйованої вакцини цілком може залежити від мікобактерій, їх вірулентності. Звісно, високовірулентні штами, за умови одночасного проникнення в імунований макроорганізм, можуть зумовлювати прорив штучно набутої специфічної стійкості.

Отже, аналітичні дані свідчать про те, що вірулентність мікобактерій, її ступінь залежать від різноманітних умов, факторів впливу на мікроорганізм. Проте обмеженість досліджень з цього питання, а отже, і результатів, особливо в динаміці пасажів збудника на живильних середовищах з різним рН, підтверджують непізнаність явища і необхідність подальших експериментів. Продовжувати дослідження конче важливо, оскільки отримані результати не тільки різноманітні, але й зовсім протилежні та суперечливі.

8.2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Аналіз спеціальної літератури з глибини історії питання до сьогодні, що вкрай було необхідним для повного розуміння специфічної профілактики туберкульозу, не дав змоги виявити повідомлень стосовно використання дослідниками для конструювання вакцини *M. bovis* дисоціативних форм, що культивуються за 3 °C із втраченою / зниженою сенсibiliзувальною здатністю, біологічні властивості яких в основному різносторонньо вивчені нами і викладені в попередніх розділах монографії. Тому на першому етапі дослідження вивчали ефективність BCG у виробничих умовах на великій рогатій худобі. У подальшому оцінювали нешкідливість, стабільність та імуногенність *M. bovis* дисоціативних форм 117а, б, в варіантів та 118 субкультури із втраченою / зниженою сенсibiliзувальною здатністю. Досліди проводили на морських свинках.

8.2.1. Епізоотологічна ефективність виробничого застосування вакцини BCG в системі оздоровчих заходів за туберкульозу великої рогатої худоби

Система боротьби з туберкульозом великої рогатої худоби базується на виявленні джерела збудника інфекції, нейтралізації механізму передачі та підвищенні несприйнятливості тварин.

Така організація протитуберкульозних заходів комплексної системи боротьби забезпечує ліквідацію інфекції та її профілактику не лише в окремих господарствах, а й в межах більш великих природно-географічних територій.

Крім епізоотологічно виправданих та перевірених часом методів ліквідації туберкульозної інфекції (метод систематичних алергічних досліджень та метод повної заміни скопрометованого поголів'я) пропагандуються інші, наприклад, з використанням у загальному комплексі протитуберкульозних заходів вакцини BCG. Загальновизнаним протягом десятиліть є її здатність стримувати лише розвиток прогресуючого генералізованого туберкульозу, що породжує до цього часу існування різних думок відносно епізоотологічної ефективності вакцин. Одні автори твердять про непомітне значення вакцини BCG, інші, навпаки, відмічають доцільність та перспективність її застосування.

Водночас, узагальнюючи великомасштабні результати використання BCG останніх десятиліть в Російській Федерації, дослідникам остаточно не вдалося зробити однозначні висновки стосовно цього препарату, особливо по дорослому поголів'ю (Авилов В.М. і Пылинин В.Ф., 1992).

Враховуючи різні дані з цього надзвичайно важливого питання, нами на виробничому та експериментальному матеріалі уточнена епізоотологічна доцільність використання вакцин BCG у загальному комплексі протитуберкульозних заходів у Дніпропетровській області.

Досліди з вивчення частоти адаптації вакцинного штаму BCG щодо організму різновікової великої рогатої худоби. На початку досліджень, для

оцінки епізоотологічної ефективності вакцини BCG у подальшому, необхідно було уточнити частоту адаптації послаблених мікобактерій щодо організму тварин.

Згідно з “Настановою по застосуванню вакцини BCG при туберкульозі великої рогатої худоби” було імунізовано 11 173 різновікових тварин у п’яти господарствах з різною епізоотичною ситуацією щодо туберкульозу при трьох контрольних групах. У неблагополучних пунктах імунізували тільки молодняк (136 голів), а в благополучних, окрім цього (37 голів), ще й 10 корів.

Підвищену концентрацію вакцини BCG вводили семи коровам одного благополучного господарства.

Алергічні дослідження молодняку та корів, імунізованих вакциною BCG, через 45–60 діб показали, що інтенсивність прояву туберкулінових реакцій у тварин усіх епізоотичних груп статистично не відрізнялася, хоча менш значний алергічний набряк формувався у корів (*табл. 132*). Це свідчить про незначну імунобіологічну реакцію у цієї групи тварин. Напевне, враховуючи масу корів та телят, яка вірогідно відрізняється, це явище може бути пояснено інокулюванням рівної кількості мікобактерій в організм різновагових тварин. На підтвердження цього семи коровам благополучного господарства (КСП “Зоря” Криничанського району) інокулювали 2 мг, а іншій такій же кількості тварин – нормативну дозу вакцини BCG. За алергічного дослідження через 45 діб інтенсивність реакцій у корів першої групи виявилася практично однаковою з тією, що проявилася в телят, – $6,4 \pm 1,0$ мм, а у корів – $4,7 \pm 0,6$ мм ($P > 0,05$).

Крім цього, через 45–60 діб у більшої (в 1,8 раза) частини імунізованих корів, порівняно з молодняком благополучних господарств, не спостерігалася імунологічна перебудова макроорганізму у формі туберкулінової реакції, що обумовлено як і в першому випадку меншою дозою вакцини в перерахунку на масу тварини.

Ці дані свідчать про те, що імуногенні властивості послаблених мікобактерій не проявляються не лише у значної частини дорослих тварин, але й у молодняку (у межах 8,2–9,4 %), штучно набута специфічна стійкість якого, власне, і є передумовою для забезпечення подальшого благополуччя того чи іншого господарства.

У неблагополучних пунктах нереагуючих на туберкулін імунізованих тварин відправляли на забій, а в благополучних господарствах лишали на місця утримання. Під час контрольно-діагностичного забою 13 тварин з неблагополучних господарств змін, властивих туберкульозу, не встановили (через 45–50 діб з часу імунізації). За подальших алергічних досліджень кількість реагуючих на ППД-туберкулін для ссавців в обох категоріях господарств зменшувалась і на 120–130 добу становила 37,6–50,9 %.

Тенденція зниження спостерігалась і в інтенсивності алергічних реакцій на ППД-туберкулін для ссавців.

Проведені алергічні обстеження через 12 місяців виявили алергію у 16 (13,0 %) із 123 тварин неблагополучних пунктів, із 34 у 8 (23,5 %) голів мо-

132. Динаміка інтенсивності алергічних реакцій на ППД-туберкулін для ссавців у різновікових тварин, імунізованих вакциною ВСС

№ господарства	Кількість тварин			Інтенсивність реакцій (M±m)		Кількість реагуючих через 90–100 діб		Інтенсивність реакцій (M±m)		Кількість реагуючих через 120–130 діб		Інтенсивність реакцій (M±m)		
	імунізованих		всього	молодняк	корови	абс.	%	корови	молодняк	абс.	%	корови	молодняк	
	корови	молодняк												
Неблагополучні господарства														
1	40	-	92,5	-	-	6,7±1,03	30	81,1	-	5,8±1,09	18	48,6	-	4,4±0,9
2	39	-	89,7	-	-	6,0±1,08	28	80,0	-	5,3±0,9	15	42,8	-	4,6±1,01
3	57	-	89,5	-	-	6,8±1,07	43	84,3	-	4,9±1,03	26	50,9	-	4,5±0,8
Контроль (n = 10)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Благополучні господарства														
1	19	5	94,7	60,0	4,75±0,62	6,4±1,0	10	55,5	3,6±0,8	5,4±1,08	7	38,8	3,5±0,9	4,8±1,03
Контроль	5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	18	5	98,9	40,0	4,7±0,6	6,5±1,05	9	56,2	3,5±0,5	5,3±1,01	6	37,5	3,4±0,7	4,9±0,8
Контроль	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

лодняку та в 1 (20,0 %) із 5 корів другої епізоотичної групи. Інтенсивність набряків становила, відповідно $3,0 \pm 0,8$; $3,0 \pm 0,3$ та $3,0 \pm 0,2$ мм. Ці дані узгоджуються з повідомленнями інших авторів (Кассич Ю.Я. й співавт., 1981). Між тим дослідження контрольного неімунізованого поголів'я (20 гол. молодняку) у двох епізоотичних гуртах не виявили алергічних реакцій на ППД-туберкулін для ссавців.

Для встановлення патолого-анатомічного прояву туберкульозу в імунізованого поголів'я та частоти персистенції в макроорганізмі мікобактерій провели контрольно-діагностичний забій реагуючих на ППД-туберкулін для ссавців тварин та лабораторне дослідження біологічного матеріалу від тварин з кожного господарства.

У результаті проведених патолого-анатомічних досліджень виявлено неспецифічні зміни у вигляді крововиливів, гіперемії та гіперплазії в лімфатичних вузлах у 8 (50 %) із 16 тварин з неблагополучних щодо туберкульозу гуртів (табл. 133). У тварин благополучних стад макроскопічних змін не виявлено.

Між тим лабораторними дослідженнями 15 проб біологічного матеріалу виділено мікобактерій бичачого виду в $33,3$ – $66,6$ % з кожного благополучного господарства, а атипові мікобактерії IV групи за класифікацією Раніо-

133. Результати патолого-анатомічного розтину та лабораторного дослідження біологічного матеріалу імунізованих реагуючих на ППД-туберкулін для ссавців дослідних тварин

Господарство, район	Кількість забитих тварин (абс.)	Встановлені зміни		Досліджено лабораторно, абс.	Виділено культур мікобактерій			
		кількість тварин	характер змін		бичачого виду		атипових	
					абс.	%	абс.	%
Неблагополучні господарства								
1. КСП “Україна”, Криничанський	3	2	гіперемія	3	1	33,3	-	-
2. “Межирічі”, Павлоградський	4	2	крововиливи	3	1	33,3	-	-
3. Ім. Б. Хмельницького, Нікопольський	9	4	гіперемія, крововиливи	3	2	66,6	-	-
Благополучні господарства								
1. КСП “Зоря”, Криничанський	5	-	-	3	-	-	-	-
2. Ім. Шевченка, Томаківський	4	-	-	3	-	-	1	33,3

на від однієї корови з двох благополучних господарств. Ці дані свідчать про можливу персистенцію, на імунізованому тлі, в організмі досліджуваного поголів'я як мікобактерій туберкульозу, так і атипових мікобактерій. Тому на підтвердження такого висновку проведені наступні дослідження.

Частота персистенції видів мікобактерій в організмі великої рогатої худоби, імунізованої вакциною BCG. Для встановлення частоти персистенції мікобактерій в макроорганізмі нереагуючих дослідних тварин реімунізували і дослідили туберкуліновою пробою через 12 місяців. У результаті в кожному господарстві виявлено реагуючих на туберкулін тварин від 17,1–30 % у неблагополучних до 8,0–40,0 % у благополучних господарствах (табл. 134). Проте більш виражена інтенсивність алергічного набряку ($P < 0,01$) встановлена серед імунізованого молодняку неблагополучних гуртів. Із числа тварин, що знаходилися в контролі, також виявлені реагуючі, але інтенсивність алергічних реакцій в першій категорії господарств була в 1,6 раза більшою, ніж в аналогічного поголів'я благополучних гуртів ($6,9 \pm 1,4$ – $7,8 \pm 1,3$ проти $3,1 \pm 4,1$ – $3,2 \pm 0,6$ відповідно), що підтверджує можливо, розвиток інфекційного процесу, який обумовлений патогенним для великої рогатої худоби штамом мікобактерій.

За контрольно-діагностичного забою імунізованих реагуючих 15 та 3 контрольних тварин неблагополучних гуртів виявлені патолого-анатомічні зміни туберкульозу у 20–66,6 % оглянутих на секції, які локалізувалися в підщелепових, середостінних та бронхіальних лімфатичних вузлах і характеризувалися різностадійними деструктивними процесами.

Бактеріологічними дослідженнями макроскопічно незміненого матеріалу (лімфовузлів) від імунізованих та неімунізованих реагуючих виділено мікобактерії бичачого виду в 25,0–100,0 % та культури атипових мікобактерій від однієї тварини (25,0 %), від корів благополучних гуртів – тільки культури атипових мікобактерій IV групи за класифікацією Раніона (в 25,5–50,0 % пробах).

Порівняльним аналізом (КСП “Межирічі” Павлоградського району) частоти алергічних реакцій та патолого-анатомічного прояву туберкульозу у тварин на одній неблагополучній фермі, з використанням вакцини BCG та без її застосування (одна ферма), так само, як і в науково-виробничих дослідах, не визначено позитивного впливу імунізації на стан оздоровлення гуртів від інфекції. Так, серед імунізованих та реімунізованих 457 тварин, у тому числі 205 корів за чотири туберкулінізації (інтервал два місяці), реагувала 201 (43,98 %) тварина, у тому числі 157 (76,58 %) корів. Неімунізований молодняк віком до 1 року не реагував на туберкулін.

Практично за такий же період на другій фермі (три дослідження) алергію виявлено у 166 (46,76 %) з 355 неімунізованих тварин, у тому числі у 154 (46,38 %) корів. Молодняк віком до 1 року, як і на першій фермі, на туберкулін не реагував.

Контрольно-діагностичним забоем (по п'ять тварин з кожної ферми) встановлено патолого-анатомічний прояв туберкульозу в 40 % з першої та в 20,0 % з другої ферми тварин.

134. Результати діагностики туберкульозу в реімунізованого поголів'я

№ господарства	Кількість тварин			Інтенсивність реакцій (М±m)		Забито з діагностичною метою (абс.)		Виявлені зміни, %		Лабораторні дослідження, % позитивних проб	
	досліджених (абс.)		реагуючих, %	корови	молодняк	всього	коров	всього	коров	М. бичачого виду	атипові мікобактерії
	всього	коров	всього								
Неблагополучні господарства											
1	35	-	17,1	-	7,8±1,3	5	-	40,0	-	33,3	-
2	35	-	20,0	-	7,6±1,6	5	-	20,0	-	25,5	25,5
3	48	-	22,9	-	7,8±1,2	5	-	60,0	-	50,0	-
Контроль			30,0	-	6,9±1,4	3	-	66,6	-	100,0	-
Благополучні господарства											
1	11	3	18,2	33,3	3,2±0,6	4,0±0,1	3	2	-	-	33,3
Контроль	50	25	8,0	8,0	3	-	2	2	-	-	50,0
2	10	4	40,0	25,0	3,1±0,4	4,6±1,1	4	3	-	-	25,5
Контроль	50	25	10,0	12,0	3,1±4,1	-	1	1	-	-	-

Аналізуючи вікову структуру 78 реагуючих на туберкулін тварин у КСП “Україна” Криничанського району (1039, у тому числі 256 голів неімунізованого поточного року народження молодняка), встановлено, що частота прояву туберкульозної інфекції починає зростати з річного віку тварин та значно збільшується серед корів чотирирічного віку, тобто первісток, і реально на такому рівні утримується до 10-річного віку корів (табл. 135).

135. Частота прояву алергічних реакцій у різновікових тварин неблагополучного щодо туберкульозу пункту, % до кількості тварин вікової групи

Рік народження	Корови									Молодняк		
	1985	1986	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996
% хворих	50,0	60,0	80,0	100,0	7,02	93,7	27,9	54,7	71,6	6,8	1,5	0,0

Цей та попередній аналізи епізоотологічної ефективності вакцини ВСГ свідчать про те, що молодняк досліджених господарств з досить напруженою епізоотичною ситуацією, навіть неімунізований, значно рідше хворіє туберкульозом і порівняно з іншими віковими групами тварин за більш систематичного надходження в організм збудника туберкульозу. Дослідження показали, що мікобактерії часто виділяються з молоком як реагуючих, так і нереагуючих на туберкулін імунованих вакциною ВСГ корів (табл. 136).

136. Частота виділення мікобактерії бичачого виду з молока корів, імунованих вакциною ВСГ, реагуючих і нереагуючих на ППД-туберкулін для ссавців

Господарство	Досліджено проб молока	Від корів					
		реагуючих	одержано позитивних проб		нерагуючих	одержано позитивних проб	
			абс.	абс.		%	абс.
КСП “Україна”	10	5	3	60,0	5	2	40,0

Під час дослідження проб молока від реагуючих та нереагуючих на туберкулін імунованих тварин мікобактерії бичачого виду виділені в 60,0 та 40,0 % корів відповідно. Ці дані підтверджують, що імунований фон, який, без сумніву, в певній мірі формується в імунованого поголів'я, може сприяти тривалій персистенції в макроорганізмі патогенного збудника і створювати щоденну загрозу для сприйнятливих тварин, та, що дуже важливо, людини.

Отримані результати досліджень повністю узгоджуються з літературними даними про те, що тварини, заражені туберкульозом, набувають несприйнятливості лише відносно нового зараження. Мікроби, які залишаються від

першого зараження, досить часто пристосовуються до імунного організму, персистують в його тілі і продовжують свою руйнівну дію (Кокуричев, П.М. 1954).

Тенденція інтенсивних показників епізоотичного процесу туберкульозу великої рогатої худоби, імунізованої вакциною BCG в умовах господарства. Матеріали досліджень, викладені в попередніх розділах обґрунтували подальші дослідження епізоотичного процесу туберкульозу великої рогатої худоби, імунізованої вакциною BCG в умовах виробництва. Для цього провели епізоотологічне обстеження в чотирьох господарствах (ім. Ілліча, ім. Леніна, “Росія”, “Мир”) з поголів’ям 5868 тварин, у тому числі 2358 корів, де вакцину BCG застосовували на тваринах з 10–20-денного віку протягом 3–4 останніх років.

У результаті досліджень встановлено, що напруженість епізоотичного процесу туберкульозу тварин, незважаючи на застосування вакцини BCG, має динамічний характер, без зрушень в бік його послаблення (табл. 137).

137. Частота прояву алергічних реакцій та туберкульозних змін у неімунізованої та імунізованої вакциною BCG великої рогатої худоби*

Господарство	% реагуючих		% патанатомічних змін	
	до застосування вакцини	після імунізації	до застосування вакцини	після імунізації
ім. Ілліча	16,3	12,7	34,3	42,8
ім. Леніна	10,0	10,2	32,0	44,0
“Росія”	18,5	18,5	44,4	42,2
“Мир”	17,5	21,1	40,0	54,0
* % реагуючих підраховано за 12 місяців (до і після імунізації тварин).				

Розглядаючи доцільність застосування вакцини як допоміжного заходу в сукупності з комплексною протитуберкульозною системою в загальнобіологічному аспекті формування природного протитуберкульозного імунітету у тварин неблагополучних гуртів, дійшли висновку, що спонтанно перебігаючий інфекційний процес туберкульозу в прихованій формі, який, без вагань, спостерігається в таких випадках на загальному тлі явної хвороби, супроводжується формуванням недостатньо напруженого та тривалого в часі імунітету (рис. 160). На підтвердження, в середньому за чотири роки спостережень за тваринами п’яти (КСП “Україна”, “Колос”, “Україна”, “Апостолівський”, “Нива”) гуртів майже усі дорослі тварини реагували на ППД-туберкулін для ссавців: з 2368 тварин інфіковано 1986 (83,7 %. Патологоана-томічними дослідженнями (25 тварин) виявляли у 48–92 % різної форми туберкульозні зміни.

Незважаючи на значний клініко-патологічний прояв туберкульозу в дорослих тварин, у молодняку до 12-місячного віку інфекція рееструвалася лише у 0,0–10,0 %. Про це повідомляють й інші автори (Кузин А.И., 1992), які ре-

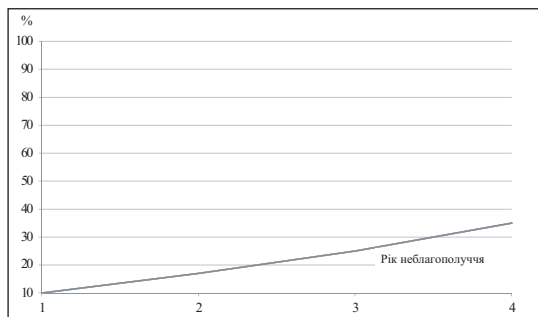


Рис. 160. Загальна захворюваність репродуктивних тварин туберкульозом

мікобактерій, у якого імуногенні властивості, за давно відомих загальнобіологічних положень, значно нижчі порівняно з епізоотичним штамом.

З цього приводу ще в 1954 році П.И. Кокуричев підкреслив: “На жаль, організм, заражений великими дозами мікробів, сприяє у тварин загостренню старих і появі нових туберкульозних вогнищ. Іншими словами, зараження послабленими туберкульозними мікробами створює імунітет лише проти невеликих доз вірулентних мікробів”.

Враховуючи чітко виражену, звичайно до певної межі, вікову сприйнятливність клініко-патолого-анатомічного прояву туберкульозу, можна стверджувати, що не природне перехворювання і більше того не штучна імунізація стримують розвиток типової форми туберкульозу, а еволюційно закладені фактори неспецифічного захисту (аналогії з молодняком), ретельне пізнання та корекція яких у дорослого поголів'я, поряд із традиційними заходами профілактики та боротьби, сприятиме стійкому благополуччю великої рогатої худоби по цій інфекції. Хоча існують повідомлення про значне поширення туберкульозу у тварин молодого віку, що свідчить про необхідність з'ясування такого явища зі встановленням чинників.

Досить показовим з цього приводу виявилися результати досліджень епізоотологічної ефективності вакцини BCG у господарствах Васильківського району. Після ретельної туберкулізації і негайного відправлення на забій інфікованих збудником туберкульозу тварин усе поголів'я, в тому числі і доросле, було імунізоване вакциною BCG.

Через 45–60 діб нереагуючих на ППД-туберкулін для свавців тварин відправлено на забій, а інших алергічно обстежено через рік. Частина реагуючих тварин обслідували на секції м'ясокомбінату. Результати показали, що частота туберкульозних уражень не тільки лишалася на попередньому діагностичному рівні, а навпаки, зросла з 20,8 до 23,2% (табл. 138).

Збільшення частоти знахідок туберкульозу у великої рогатої худоби після імунізації може бути обумовлено провокацією приховано перебігаючої інфекції чи латентного мікробізму протягом 12 місяців, коли алергічні дослідження імунізованих тварин не проводилися.

естрували більш виражену стійкість щодо збудника туберкульозу молодих тварин.

Тому, неспроможність природно набутого специфічного імунітету, який безперечно формується у тварин неблагополучних гуртів, стримувати патогенний вплив мікобактерій, на наш погляд, спростовує хитку думку про епізоотологічну ефективність атенуйованого штаму

**138. Прояв патолого-анатомічних змін туберкульозу
у великої рогатої худоби господарств Васильківського району**

Кількість господарств	До імунізації			Після імунізації (через 12 місяців)		
	обстежено реагуючих (за останні 12 місяців)	виявлено змін		обстежено реагуючих	виявлено змін	
		абс.	%		абс.	%
16	3162	658	20,8	491	114	23,3

Проте застосування вакцини VCG протягом наступних семи років також не призвело до зниження напруженості епізоотичного процесу туберкульозу (табл. 139). Напроти, в дев'яти господарствах, в яких вихідний рівень патолого-анатомічного прояву туберкульозу у тварин був найнижчим, з перебігом часу епізоотична ситуація суттєво ускладнилася. У кожному з господарств цієї групи, після імунізації поголів'я відсоток туберкульозних змін тварин не знизився до вихідного рівня.

**139. Тенденція прояву туберкульозних змін
у часі в імунізованих реагуючих на ППД-туберкулін
для ссавців тварин Васильківського району**

Кількість господарств	Вихідний рівень туберкульозних змін, % до імунізації	Рік						
		1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994
		патолого-анатомічний прояв туберкульозу, %						
9	до 5	15,9	7,6	13,3	28,0	5,8	11,8	41,5
3	6–10	13,9	2,7	7,4	4,0	7,0	9,2	35,0
4	11 і більше	39,9	23,0	27,4	23,8	19,1	6,0	34,7

Поряд з цим встановлено, що в господарствах, де застосовується вакцина VCG, розраховуючи на її здатність стимулювати імунітет певної напруженості та тривалості в часі, спеціалістами, адміністративно-господарським персоналом не здійснюються в повному об'ємі спеціальні ветеринарно-санітарні та загальні організаційно-господарські заходи, що вірогідно сприяє розповсюдженню збудника та поширенню хвороби серед сприйнятливої поголів'я (Исхаков О.З., 1967; Сафон М.А. й співав., 1982; Донченко А.С. й співав., 1995; Жумашев А.С. і Накиспеков Ж.Т., 1995).

Одержані в ряді господарств результати, які повністю співпадають з повідомленнями інших дослідників (Кассич Ю.Я. й співав., 1981), свідчать про те, що щеплення тварин не лише не сприяє викоріненню туберкульозної інфекції, але й значно ускладнює, за такої форми організації протитуберкульозних заходів, епізоотичну ситуацію. Процес періодичної імунізації, реімунізації тварин та їх мічення у визначені строки інколи не лише призводить до

помилку, але й суттєво ускладнює працю фахівців ветеринарної медицини, що не може бути, як показують дослідження, виправданим.

До того ж тривале збереження збудника туберкульозу на об'єктах зовнішнього середовища створює передумови постійного проникнення мікобактерій в організм сприйнятливих тварин, особливо корів, у тканинах організму яких унаслідок технологічних порушень створюються найбільш оптимальні для репродукції мікобактерій умови.

Крім цього, особливо небезпечним є застосування вакцини VCG в умовах реформування аграрного сектору економіки, коли активізуються міжгосподарські зв'язки, які, без сумніву, спричиняють поширення збудника різних інфекційних захворювань, у тому числі і туберкульозу, та усугублення напруженості епізоотичного процесу в недалекому майбутньому.

Таким чином, дослідження засвідчили, що лише у 88,8–94,7 % імунізованих вакциною VCG молодих тварин спостерігається стимуляція імуногенезу, а у корів цей показник виявився ще нижчим (40–60 %). В організмі імунізованих реагуючих і нереагуючих на ППД-туберкулін для ссавців тварин персистують мікобактерії туберкульозу, які досить часто виділяються з молоком (40–60 %). Це може свідчити про те, що мікобактерії штаму VCG реверсують в патогенний варіант збудника, а можливо, й проникають в макроорганізм з довілля.

Результати досліджень дали підставу рекомендувати управлінню ветеринарної медицини Дніпропетровської облдержадміністрації призупинити застосування вакцини VCG.

Отже, виробниче застосування вакцини VCG не сприяє зниженню частоти патолого-анатомічного прояву й відповідно напруженості епізоотичного процесу туберкульозу в цілому, що свідчить про необхідність подальших пошуків мікобактерій нових імуногенних штамів.

8.2.2. Досліди з вивчення імуногенної активності *M. bovis* дисоціативних форм, культивованих і накопичених за 3 і 37 °С

Без сумніву літературні повідомлення та наші експериментальні і виробничі випробування імуногенної активності вакцини VCG незаперечно обґрунтовують необхідність досліджень, спрямованих на селекціонування штамів мікобактерій з більш високим запасом генів імунної активності й одночасно низькою сенсibiliзувальною здатністю.

Для вирішення цього питання використали культивовані за 3 і 37 °С дисоціативні L- та інші форми *M. bovis* 118 варіанта 40 та 50 пересівів, патогенного штаму (100 субкультура), морських свинок та ППД-туберкулін для ссавців. Досліджувані мікобактерії у визначених дозах вводили морським свинкам одноразово.

Сенсибилізувальні та патогенні властивості залежно від дози дисоціативних форм M. bovis 40 та 50 субкультур. На першому етапі досліджували вплив на сенсибилізувальні й патогенні властивості дози мікобактерій.

При цьому вивчення патогенних й сенсibiliзувальних властивостей *M. bovis* дисоціативних форм, культивованих за 3 та 37 °С, не виявило відхилень від фізіологічної норми. Середня по групах маса тіла тварин динамічно підвищувалася, що може свідчити про нормальний фізіологічний стан. Оцінка та аналіз цього показника в динаміці експерименту показали певну закономірність його тенденції (рис. 161). У перші 20 днів після інокуляції морським свинкам дисоціативних форм мікобактерій в дозі 1; 2; 3 мг/см³ відмічалася тенденційне підвищення маси тіла, на 30 добу – зниження (у середньому на 20–30 г), а вже на 40 добу – збільшення практично вище рівня, що передувало зниженню маси тіла. За цього не виявлено різниці в динаміці маси тіла морських свинок залежно від дози інокульованих дисоціативних форм мікобактерій. Інша динаміка приросту маси тіла спостерігалася в контрольних морських свинок, які були заражені мікобактеріями патогенного материнського штаму. Тільки в перші 10 днів у них виявлено підвищення маси тіла на 5 г, у подальшому – динамічне зниження (втрата 20 г і більше щодоби).

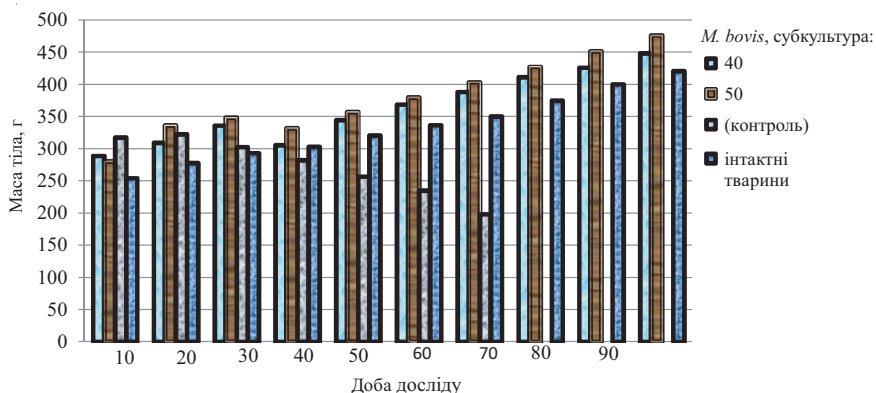


Рис. 161. Маса тіла морських свинок, одноразово імунізованих дисоціативними L- та іншими формами *M. bovis* та заражених патогенним штамом (100 генерація)

В інтактному контролі (без інокуляції мікобактерій) не зафіксовано будь-яких змін; крім поступового підвищення маси тіла протягом дослідження.

У ділянці введення завису мікобактерій не спостерігалася утворення виразок, за винятком двох свинок – контроль, заражених патогенними мікобактеріями. Виразки з'явилися через 14 днів від початку дослідження: за 7–8 днів у місці утворення виразки реєстрували ущільнення в горошину та його поступове збільшення з утворенням у центрі спочатку невеликого отвору, а потім виразки.

Алергічні дослідження експериментальних тварин через 30, 60 та 90 днів не виявили підвищеної чутливості сповільненого типу. Проте у контрольних морських свинок, які були заражені вихідним материнським патогенним шта-

мом мікобактерій, алергічні реакції на ППД-туберкулін для свавців у дозі 25 та 125 МО з'явилися вже на 30 добу досліду.

Проведені евтаназія та патолого-анатомічний розтин дослідних тварин через 90 діб досліду не виявили змін, притаманних туберкульозу, за винятком 23 свинки (заражена мікобактеріями, які культивувалися за 3 °С у дозі 3 мг/см³ – 50 генерація), у якої в печінці та селезінці зафіксовано один та два відповідно сіро-жовтих туберкульозних вузлики. Враховуючи незначну кількість туберкульозних вогнищ у незмінених за формою і величиною органах на фоні динамічного збільшення маси тіла дослідної тварини, можна стверджувати про доброякісний перебіг інфекційного процесу, який, напевно, викликається зміненими формами *M. bovis* у більших дозах. Однак це не супроводжувалося розвитком сенсibiliзації, яка б могла бути виявленою нормативною дозою алергену (25 МО). Під час загибелі контрольних тварин через 46 та 56 діб після зараження та їх розтину виявлено значні туберкульозні зміни в лімфатичних вузлах легеневої групи (bronхіальні, середостінні), колінної складки та в тканині легень, печінки, селезінки.

Ці результати досліджень засвідчили відсутність патогенності (зараження 1 та 2 мг/см³) та сенсibiliзувальної (зниженої) здатності в дисоціативних форм *M. bovis* 40 та 50 субкультур 118 варіанта, пасажованих через щільне живильне середовище за температури 3 °С.

Крім цього, поодинокі туберкульозні вогнища в окремих дослідних тварин, заражених 3 мг мікобактерій 50 генерації (3 °С), можуть указувати на залишкову вірулентність досліджуваних змінених форм *M. bovis* з можливим формуванням специфічного протитуберкульозного імунітету без розвитку алергічного стану (та утворення виразки в ділянці введення завису мікобактерій). З цього приводу необхідно було з'ясувати, який термін і в якій морфологічній формі персистують L- та інші форми мікобактерій в організмі морських свинок. Щоб отримати відповіді на ці запитання, були проведені дослідження.

Тривалість персистенції дисоціативних форм M. bovis 118 генерації 27 субкультури в організмі морських свинок. З метою вивчення персистенції L- та інших форм мікобактерій, які культивувалися за температури 3 °С, ми вважали за необхідне з'ясувати в експерименті: 1) здатність L-форм й інших елементів мікобактерій вегетувати в організмі морських свинок за їх експериментального інфікування; 2) тривалість персистенції в організмі тварин.

Для цього були використані мікроорганізми в дозі 1 мг/см³ фізіологічного розчину, некіслотостійкі, дещо (інколи) червонуватого кольору зерна і L-форми, які інкубували та накопичували при температурі 3 °С, та 9 морських свинок.

Дослід тривав 9 місяців, кожні три місяці проводили евтаназію трьох морських свинок з подальшим патолого-анатомічним дослідженням. З органів тварин (печінка, легені, селезінка та бронхіальні, середостінні лімфатичні вузли) готували мазки-відбитки, а приготовленою суспензією з органів засівали середовище Левенштейна-Йенсена та заражали морських свинок. При одержанні культури-ревертанта заражали морських свинок.

У результаті досліджень встановлено, що змінені форми мікобактерій тривало персистують в організмі морських свинок: 9 місяців (тривалість досліду) – *табл. 140*.

140. Тривалість персистенції дисоціативних L- та інших форм *M. bovis* 118 генерації 27 субкультури в організмі морських свинок

Кількість тварин	Результат бактеріологічного дослідження, міс.					
	3		6		9	
	абс.	%	абс.	%	абс.	%
9	3	100	3	100	2	22,2

Всіх морських свинок мікроскопічно, в мазках-відбитках з органів, за винятком однієї тварини, зі суспензії біологічного матеріалу якої не виділено культуру, виявляли як некіслотостійкі, так і кіслотостійкі палички.

При цьому за мікроскопії мазків-відбитків з органів морських свинок, еванізованих через 3 і 6 місяців, виявляли тільки некіслотостійкі палички й зерна, через 9 місяців – кісло- та некіслотостійких паличок й зерен L-форм (овали) не було виявлено.

Культуральними дослідженнями біологічного матеріалу дослідних морських свинок виділені, через 3–7 діб від посіву суспензії, культури помаранчового забарвлення.

Водночас тривалість персистенції мікобактерій в організмі морських свинок не вплинула на строки появи культури на щільному живильному середовищі. Так, з матеріалу еванізованих морських свинок через 3 місяці одна культура виявлена на 5 добу, одна – на 3 добу, одна – на 7 добу; через 6 місяців – на 6; 3 та 5; через 9 місяців – на 3 та 5 добу.

Між тим за мікроскопії мазків, приготовлених з одержаних культур від свинок, еванізованих через 3 та 6 місяців, виявлялися тільки некіслотостійкі палички та зерна, у двох культурах, одержаних від тварин, через 9 місяців виділені кіслотостійкі елементарні тільця (зерна) та типові морфологічні форми паличок.

Це свідчить, по-перше, про часткову реверсію змінених мікроорганізмів, у тому числі й L-форм в типові клітини мікобактерій; по друге – про подальшу конверсію L- та інших форм в елементарні тільця. Однак за дев'ятимісячний період персистенції вони не викликали туберкульоз у морських свинок.

Безумовно, вивчення біологічних властивостей багаторазово пасажованих через щільне живильне середовище дисоціативних L- та інших форм *M. bovis* та виявлення незвичайних, непритаманних патогенним *M. bovis*, властивостей (практично в три рази нижчий вміст загальних ліпідів, продукування пігменту, швидкий ріст тощо) обгрунтувало нові дослідження – з'ясування імуногенної активності в експерименті на морських свинках. Для цього використано тільки один варіант L- та інших форм мікобактерій 118 генерації (їх субкультури).

Особливості імуногенної активності дисоціативних L- та інших форм 118 варіанта 40 субкультури, культивованих і накопичених за 3 °С. Для визначення ефективності імуногенної активності дисоціативних форм мікобактерій 118 генерації 40 субкультури провели експеримент на морських свинках. У досліді використали культури мікобактерій, накопичених на живильному середовищі за 3 °С. Необхідно зазначити, що за 37 °С культивування мікобактерії слабо росли за систематичних пасажів. Крім цієї особливості культивування варіанта дисоціативних форм *M. bovis* (118 пересів), існує й інша – втрата сенсibiliзувальної властивості. Про це свідчать результати неодноразових алергічних досліджень морських свинок, наведені в цій роботі, коли не проявлялася алергічна реакція на введений у нормативній дозі для цього виду тварин ППД-туберкулін для ссавців (25 МО).

Проте з цього приводу нами повідомлено (О.А. Ткаченко, 1999), що інтенсивність прояву алергічної реакції на ППД-туберкулін для ссавців і КАМ у великої рогатої худоби має певну закономірність, суть якої полягає в такому: велика рогата худоба, яка експериментально заражена атипovими мікобактеріями (*M. intracellulare*) в 5 разів частіше реагує на КАМ, ніж на ППД-туберкулін для ссавців, а інтенсивність алергічної реакції становить $4,65 \pm 0,7$ та $3,12 \pm 0,08$ мм відповідно. Разом з цим зазначається, що алергічні реакції у тварин тільки на КАМ більш короткочасні, ніж на ППД-туберкулін для ссавців. Але в корів, які одночасно реагували на два алергени, підвищена чутливість сповільненого типу щодо КАМ зберігається більш тривало і майже в половині випадків (45,8 %) виявляється на тлі вже сформованої зміненої реактивності, яка визначається КАМ. Підкреслюється, що таке явище обумовлено гомологічністю препарату КАМ, який більш чутливий до несуттєво зміненої атипovими мікобактеріями реактивності макроорганізму в цілому та шкіри тварин, зокрема. Подібне спостерігалось й при дослідженні тварин, інфікованих атипovими й патогенними мікобактеріями, досліджених туберкуліном в дозі 5 і 10 тис. МО. За цього тварини з низькою сенсibiliзацією (за інфікування тільки атипovими мікобактеріями) на 30 % менше реагують на діагностикум у дозі 5 тис. МО, ніж на дозу 10 тис., у той час як тварин, заражених патогенними мікобактеріями, виявляється однакова кількість.

Тому, враховуючи ці повідомлення та наші результати досліджень властивостей дисоціативних форм *M. bovis*, які набули ознак атипovих мікобактерій, а отже і здатності слабо сенсibiliзувати макроорганізм, визначили використання вищої концентрації ППД-туберкуліну для ссавців в імунізованих морських свинок досліджуваними мікобактеріями. Такий методологічний підхід може підтвердити або ж спростувати попередні повідомлення.

Встановивши залишкову вірулентність у змінених L- та інших форм 118 пересіву (яка виявлена за підвищення дози збудника), визначивши тривалу їх персистенцію в організмі свинок з частковою реверсією в кислотостійкі форми (елементарні тільця), вивчали імуногенну активність у досліджуваних мікобактерій на морських свинках. Для цього тварин поділили на 5 груп (по 5 тварин), 3 свинки в кожній, перших чотирьох груп дворазово імунізу-

вали (1 мг/см^3) та через 40 діб заражали патогенним штамом у розведенні: 1 група – 10^{-4} ; друга – 10^{-5} ; третя – 10^{-6} ; четверта – 10^{-7} . Ще дві тварини з кожної групи (контрольні) заражали патогенним штамом *M. bovis* у дозі відповідно кожної дослідної групи тварин.

Тварин (три свинки) п'ятої групи не імунізували і не заражали, проте досліджували на виявлення алергічної реакції туберкуліном у строки як дослідні тварини.

Попередньо дослідних та контрольних морських свинок перевірили ППД-туберкуліном для ссавців у концентрації 25 та 125 МО. Реагуючих на діагностикум не виявлено.

Встановлено, що імуногенна активність досліджуваних дисоціативних форм *M. bovis* залежить від кількості вірулентних мікобактерій, інокульованих в організм імунізованих морських свинок (табл. 141): зі зниженням концентрації вірулентних мікобактерій знижується кількість загиблих тварин та частота туберкульозних знахідок. Але це тільки на перший погляд, бо, аналізуючи таку можливу тенденцію в контрольних тварин, заражених тільки патогенними мікобактеріями в таких самих концентраціях, що й імунізовані, то вона відсутня: практично в одні строки відмічена загибель тварин. Ці дані обґрунтовують думку про те, що в такому явищі більше значення має вірулентність, ніж кількість мікроорганізму. Результати наших дослідів практично повністю співпадають з повідомленнями Ю.К. Вейсфеллера (1975).

141. Імуногенна активність дисоціативних L- та інших форм (40 субкультура 118 пересіву), культивованих за 3°C , залежно від дози патогенного штаму *M. bovis* (на морських свинках)

№ групи тварин	Імунізовані дворазово (через 45 діб) *	Доза зараження (через 40 діб)	Кількість свинок у групі	Загибло, на добу	Виявлено тварин зі змінами	Евтанізовано через 2 місяці після зараження		
						у тому числі		
						всього	зі змінами	без змін
1	<i>a</i>	10^{-4}	3	42–43	3	-	-	-
	<i>в</i>	10^{-4}	2	39–40	2	-	-	-
2	<i>a</i>	10^{-5}	3	45–47	2	1	1	-
	<i>в</i>	10^{-5}	2	40–41	2	-	-	-
3	<i>a</i>	10^{-6}	3	-	-	3	2	1
	<i>в</i>	10^{-6}	2	44–45	2	-	-	-
4	<i>a</i>	10^{-7}	3	-	-	3	2	1
	<i>в</i>	10^{-7}	2	46–49	2	-	-	-
5 (інтактний контроль)	-	-	3	-	-	3	-	-

* Тварини: *a* – імунізовані мікобактеріями (1 мг/см^3);
в – заражені тільки патогенним штамом *M. bovis*.

Утім, можна стверджувати, що мікобактерії, культивовані за 3 °С, володіють імуногенною активністю, так як вони забезпечили захист організму морських свинок (3 та 4 групи) від патогенного збудника туберкульозу: при загибелі контрольних тварин цих груп за 44–49 діб з ознаками генералізованого туберкульозу дослідні морські свинки залишалися живими протягом двох місяців, хоча в них були виявлені туберкульозні зміни – по дві тварини з кожної групи.

Виразка в ділянці введення завису відмічалася тільки після інокуляції мікобактерій вірулентного штаму у свинок дослідних і контрольних груп.

Алергічні реакції виявлялися в усіх дослідних та контрольних тварин (на 25 та 125 МО туберкуліну) тільки після зараження вірулентним штамом *M. bovis*. У інтактних тварин туберкулінових алергічних реакцій не спостерігалось.

Морські свинки, імунізовані дисоціативними L- та іншими формами й заражені в дозі 10^{-6} та 10^{-7} патогенними мікобактеріями, залишалися живими протягом 2 місячного спостереження. Контрольні тварини загинули від туберкульозу через 44–45 та 46–49 діб відповідно.

Ці результати засвідчили імуногенну активність дисоціативних L- та інших форм *M. bovis* 118 пересіву (40 субкультура), яка всупереч усталеним традиційним поглядам відбувається на тлі відсутньої сенсibiliзації макроорганізму (без розвитку алергічної реакції на ППД-туберкулін для ссавців в інструктивних і підвищених концентраціях).

Звичайно, одержані результати досліджень сенсibiliзувальної здатності, яка на тлі певної імуногенності досліджуваних дисоціативних форм 118 генерації відсутня, потребують гіпотетичного пояснення, бо традиційна думка свідчить про нерозривність цих двох феноменів. На наш погляд, відштовхуючись від одержаних даних, це відбулося на тлі трансформації (модифікації або мутації) генетичного коду мікобактерій, що, напевно, передбачено закономірними еволюційними процесами, які до того ж пов'язані з біологічним циклом розвитку.

Закономірно, що всі процеси відбуваються послідовно: на початку з'являються з кислотостійких традиційних розмірів і морфології мікроорганізмів некислотостійкі палички, ниткоподібні форми, L-форми, зерна, кислотостійкі елементарні тільця. Поряд з цим принципово змінюються й ліпідний склад (знижується вміст) та вміст вільних жирних кислот: підвищується вміст коротко- та знижується довголанцюгових, значна кількість яких не ідентифікується взагалі. Синтетазні системи мікобактерій паралельно цим процесам адаптуються до розмноження в умовах 3 °С. На такому тлі можливі втрата / зниження активності гена синсibiliзувальної здатності та збереження імуногенної активності.

Отже, вивчення дисоціативних форм мікобактерій, які культивуються та накопичуються за 3 °С, показало, що вони тривало персистують в організмі морської свинки, не викликають сенсibiliзації, яка могла б виявлятися інструктивною дозою ППД-туберкуліну для ссавців, але стимулюють доброякісний інфекційний процес з формуванням протитуберкульозного імунітету: морські свинки, дворазово імунізовані 1 мг/см^3 такими формами та заражені

в дозах 10^{-6} та 10^{-7} високовірулентними мікобактеріями, залишалися живими протягом 2-місячного спостереження, хоча в двох із трьох (з обох груп) тварин виявлені туберкульозні зміни. Контрольні тварини загинули від генералізованого туберкульозу за 44–49 діб.

Одночасно необхідно відзначити, що одержані результати досить обнадійливі навіть за умови використання високовірулентного штаму *M. bovis*. Можливо, в разі використання *M. bovis* середньої та слабкої вірулентності нами були б одержані зовсім інші результати з оцінки імуногенної активності, рівня захисту організму морських свинок від туберкульозу. Крім цього, більш виражена залишкова патогенність дослідних мікобактерій, яка нами встановлена у 50 субкультури (при зараженні морських свинок у дозі 3 мг/см^3), також могла б певною мірою сприяти розвитку туберкульозу у двох із трьох імунізованих дослідних тварин, що може свідчити про недостатню атенуїзованість використаних для експерименту дисоціативних L- та інших форм збудника туберкульозу. Враховуючи це необхідними виявилися наступні дослідження за яких буде використано в різних дозах штамів дисоціативні L- та інших форм 118 та 117 генерації з більшою кількістю пересівів (120–130), патогенний штам *M. bovis* іншої вірулентності тощо. Це значно розширить уяву про імуногенну активність дисоціативних форм, культивованих та накопичених за 3°C , уточнить значення гіперчутливості сповільненого типу за формування протитуберкульозного імунітету.

8.2.3. З'ясування стабільності та нешкідливості *M. bovis* дисоціативних форм 120 генерації, культивованих за 3°C

Для проведення цих досліджень в загальному використано попередню методику. Такі досліди виявилися необхідними також через недостатню атенуїзованість дисоціативних *M. bovis* 118 пересіву 50 субкультури. За імунізації (дворазова) цим штамом мікобактерій та зараження в подальшому патогенним (високовірулентним) збудником туберкульозу в окремих тварин по завершенні тримісячного досліду були виявлені поодинокі туберкульозні вогнища, що можливо зумовлено залишковою патогенністю мікобактерій (за введення морської свинці 3 мг/см^3 фізіологічного розчину виявлялися патолого-анатомічні зміни туберкульозу), яка при зараженні патогенним штамом посилилася (див. попередній підрозділ). Тому цей штам мікобактерій, як і інші (117а, б, в), пасажували через щільне яєчне живильне середовище ще 70 разів в умовах 3°C культивування та вивчали під імерсією морфологію, тинкторіальні властивості, характер росту культури, що ретельно описано в попередньому матеріалі і зафіксовано на рисунках.

За цього встановлена стабільність росту культури всіх чотирьох дослідних штамів мікобактерій, тинкторіальних властивостей та й в цілому морфології. Поряд з цим морфологія в мікобактерій 118 генерації дещо змінилася: зменшилася кількість L-форм (овалів з різною оптичною густиною поверхні) та їх вигляд – оболонка стала більш прозорою.

Для перевірки нешкідливості досліджуваних варіантів мікобактерій використали біологічну пробу на морських свинках та дисоціативний збудник туберкульозу в дозах 5 та 10 мг/см³ фізіологічного розчину. З цією метою сформували чотири групи дослідних нереагуючих на туберкулін тварин: групу ділили на дві по дві–три тварини в підгрупі. Тваринам кожної підгрупи парантерально ін'єктували мікобактерії. П'ята група – контрольна, дві морські свинки. Дослід тривав три місяці, кожні 10 днів проводили зважування дослідних тварин, 30 днів – туберкулінізацію та щодобове спостереження за наявністю виразок у ділянці введення завису мікобактерій. По закінченні плану робіт дослідних і контрольних тварин евтанізували з патолого-анатомічним, бактеріоскопічним, культуральним і біологічним дослідженням біологічного матеріалу. У подальшому провели ще два прямі пасажі біологічного матеріалу через морських свинок.

У результаті дослідження культуральних, тинкторіальних властивостей та морфології *M. bovis* штамів дисоціативних форм (117а, б, в та 118) 124 генерації (з початку пасажування через штучне живильне середовище одностридобової культури – 241 пересів) виявлено на початку поодинокі колонії, а зі 7, 8 доби суцільний ріст культури (рис. 162). У приготованих мазках з одержаних чотирьох культур під імерсійною системою зафіксовано неокислотостійкі мікобактерії у формі прямих і зігнутих паличок, зерна (рис. 163). У культурі 118 пересіву, крім згаданих елементів, встановлено і овалоподіб-

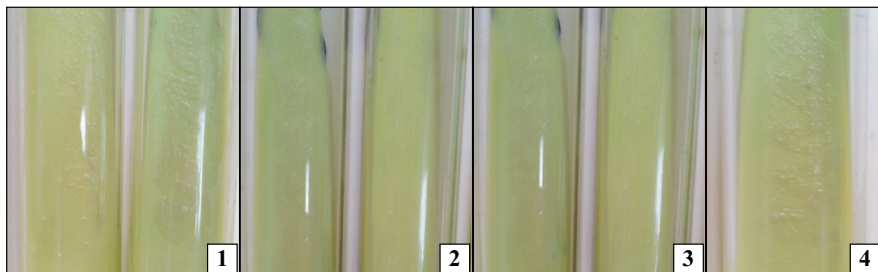


Рис. 162. Вихідні культури *M. bovis* дисоціативних форм 124 генерації: 1 – 118; 2–4 – відповідно 117а, б, в

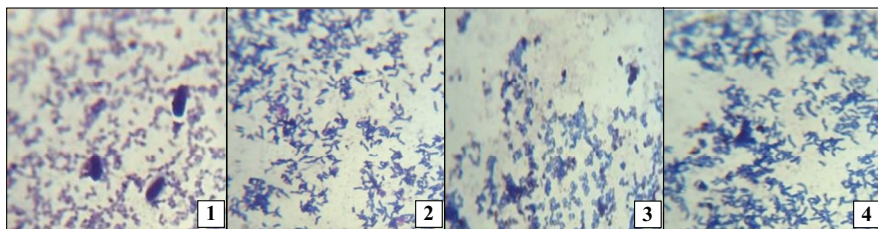


Рис. 163. Морфологія та тинкторіальні властивості вихідних *M. bovis* дисоціативних форм 124 генерації: 1 – 118; 2–4 – відповідно 117а, б, в
× 1600

ні L-форми з різною оптичною густиною поверхні, з білою зафарбованою оболонкою. Елементарних тілець (кислотостійких), які виявлялися в культурах попередніх пересівів, не було.

Приготувавши завис мікобактерій з одержаних культур та заразивши морських свинок прийнятими дозами, встановлено (табл. 142), що за дворазового алергічного дослідження експериментальних морських свинок, у тому числі 2 в контролі, реакцію на туберкулін було визначено тільки в трьох (15,78 %). Свинка № 2, заражена мікобактеріями в дозі 5 мг/см³, реагувала на туберкулін двічі (на 30 і 60 добу досліді); свинка № 8, заражена такою самою дозою, реагувала один раз, на 60 добу; № 13 отримала 10 мг/см³ і реагувала на 30 добу досліді.

142. Біологічний ефект у морських свинок залежно від дози багаторазово пасажованих *M. bovis* дисоціативних форм*

Культура	Доза зараження, мг/см ³	№ тварини	Алергічні дослідження, доба		Маса тварин на добу дослідження, г					Патолого-анатомічні зміни
			30	60	0	15	25	55	90	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
240/118	5	1	-	-	100	9,4	12,5	12,5	19,8	-
		2	+	+	100	5,6	3,7	1,9	3,1	-
		3	-	-	100	9,5	12,1	14,7	20,7	-
	У середньому					8,2	9,4	9,7	14,5	-
	10	4	-	-	100	10,6	12,9	12,1	25,8	-
		5	-	-	100	10,4	13,5	14,6	24,0	-
У середньому					10,5	13,2	13,4	24,9		
240б	5	6	-	-	100	7,1	13,3	11,2	25,5	-
		7	-	-	100	13,6	17,0	17,0	35,0	-
		8	-	+	100	47,8	63,0	117,4	160,9	-
	У середньому					22,8	31,3	48,5	73,8	
	10	9	-	-	100	3,7	10,2	13,9	20,4	+
		10	-	-	100	7,0	15,1	3,5	20,9	-
У середньому					5,4	12,7	8,7	20,7		
240а	5	11	-	-	100	16,7	35	56,7	91,7	-
		12	-	-	100	11,1	26,4	27,8	40,3	-
	У середньому					13,9	30,7	42,3	66	
	10	13	+	-	100	11,4	22,9	24,3	31,4	-
		14	-	-	100	8,3	25	46,7	93,3	-
У середньому					9,9	24	35,5	62,4		

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
240в	5	15	–	–	100	21,8	26,9	38,5	43,6	–
		16	–	–	100	15	21,3	40	40	–
		17	–	–	100	11,1	16,7	24,4	25,6	–
	У середньому					16	21,6	34,3	36,4	
	10	18	–	–	100	10,4	17,7	26	25	–
		19	–	–	100	11,5	13,5	14,6	21,9	–
У середньому					11	15,6	20,3	23,5		
Контроль	20	–	–	100	22,6	27,4	34	44,3	–	
	21	–	–	100	23,2	39,3	57,1	82,1	–	
	У середньому					22,9	33,35	45,5	63,2	

* Тут і в табл. 143, 144 – результати: (–) – негативний, (+) – позитивний.

Отже, на туберкулін реагували морські свинки, які заражалися мікобактеріями 118, 117б та 117а варіантів. Морські свинки, заражені мікобактеріями 117в варіанта, на діагностикум не реагували.

На туберкулін не реагували й контрольні (незаражені) тварини.

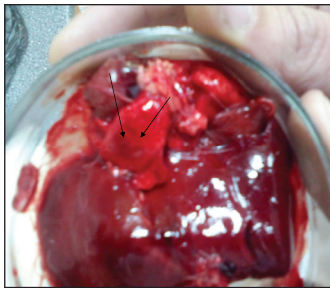


Рис. 164. Патолого-анатомічні зміни в легенях морської свинки

Виразок у ділянці введення завису мікобактерій не виявлено. Досить переконливими виявилися дослідження маси тіла дослідних морських свинок. Тварини динамічно набирали масу тіла, інтенсивність якої дещо відрізнялася і залежала від середньої маси тіла тварин тієї чи іншої дослідної групи: чим нижча маса тіла була на початку досліду, тим інтенсивніше морські свинки збільшували масу тіла в період досліду.

Протягом 3-місячного досліду всі свинки залишалися живими. Після евтаназії морських свинок патолого-анатомічні зміни, подібні до туберкульозу, були виявлені тільки в одній дослідній тварини № 9, яка була заражена дозою мікобактерій 10 мг/см³ субкультури 240б. Ураження характеризувалися поодинокими сіро-жовтими вузликами в легенях, які практично залишалися в нормі (рис. 164).

Підготовлену суспензію з біологічного матеріалу евтаназованих морських свинок висіяли на живильне середовище Левенштейна-Йенсена. За цього виявили ріст культури на 7, 8 добу (рис. 165): від морської свинки за № 4, 5 та 9. Культури характеризувалися окремими гладкими колоніями на тлі суцільного нальоту сірувато-білого (118) та окремими світло-сірого і зеленого кольорів (117б).

Приготувавши мазки з виділених трьох різних за виглядом культур та дослідивши під імерсійною системою, встановили (рис. 166), що зелена культура

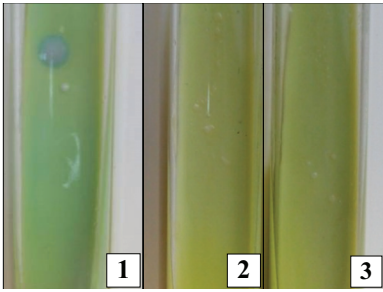


Рис. 165. Культури:
виділені від морських свинок
першого пасажу:
1, 2 – 117б; 3 – 118

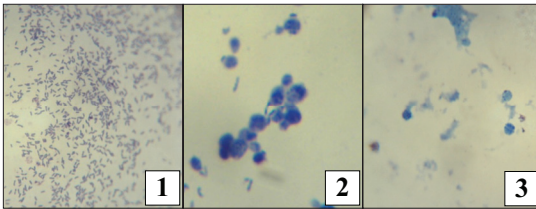


Рис. 166. Морфологія та тинкторіальні
властивості мікобактерій культур, виділених
від морських свинок: 1, 2 – 117б; 3 – 118
× 1600

117б варіанта формувалася некіслотостійкими зернами та короткими паличками із заокругленими кінцями, а світло-сіра – L-формами з різною оптичною густиною поверхні, що вміщують темно-сині зерна, які подекуди звільняються з овалів (L-форм), та некіслотостійкими паличками, зернами, а 118 варіанта (сірувато-біла) – некіслотостійкими зернами, паличками та L-формами з різною оптичною густиною поверхні, всередині та в оболонці яких вміщуються темно-сині зерна.

Отже, можна стверджувати, що дисоціативні форми мікобактерій, у тому числі й L-форми (сферопласти) в першому пасажі через організм морських свинок у великих дозах, персистуючи в ньому три місяці, не стимулюють розвиток патолого-анатомічних змін, виразок у ділянці введення мікобактерій та не змінюють морфології й тинкторіальних властивостей, хоча й стимулюють розвиток

алергічної реакції на ППД-туберкулін для ссавців у деяких дослідних тварин.

Ці дані переконливо можуть свідчити про стабільність морфології та тинкторіальних властивостей багаторазово пасажованих дисоціативних форм мікобактерій та їх нешкідливість для організму морських свинок. Проте для більшого переконання генетичної мутації чи модифікації досліджених мікобактерій необхідно було провести повторний їх пасаж через морських свинок. Для цього приготовану суспензію з біологічного матеріалу морських свинок, які заражалися культурами, паралельно висіву на живильне середовище ін'єктували морським свинкам в об'ємі 1 см³ парентерально з внутрішньої сторони стегна. За морськими свинками спостерігали три місяці.

У результаті досліджень встановлено (табл. 143), що протягом тримісячного дослідження всі морські свинки залишалися живими, тенденційно набираючи масу тіла.

Виразок у ділянці введення суспензії, приготовленої з біологічного матеріалу морських свинок, яким ін'єктували завис мікобактерій, виявлено не було.

У той же час туберкулінізація дослідних і контрольних тварин виявила алергічні реакції на 60 добу експерименту у чотирьох (30,8 %) дослідних морських свинок. Контрольна тварина на ППД-туберкулін для ссавців не реагувала.

**143. Біологічний ефект у морських свинок
за повторного прямого пасажу дисоціативних форм *M. bovis***

Суспензія від морських свинок за №	№ тварини	Алергічні дослідження, доба		Маса тварин на добу дослідження, г						Маса селезінки, г	I.C.
				0	15	30	60	75	90		
		30	60	%	%	%	%	%	%		
4–5	22	–	+	100	37,7	47,2	56,6	83	73,6	0,73	0,16
	23	–	–	100	35,5	48,4	54,8	87,1	77,4	1,02	0,19
	24	–	–	100	22,9	36,1	53	71,1	67,5	1,08	0,16
	У середньому				32	0,94	54,8	80,4	72,8	0,94	0,17
9	25	–	+	100	19,1	16,9	22,5	34,9	13,5	0,49	0,10
	26	–	+	100	32,5	26	40,3	50,6	37,7	0,6	0,11
	У середньому				25,8	0,55	31,4	42,8	25,6	0,55	0,105
10	27	–	–	100	31,7	43,3	50	75	75	0,8	0,15
	28	–	–	100	25	37,5	41,7	70,8	62,5	0,77	0,20
	У середньому				28,4	0,79	45,9	72,9	68,8	0,79	0,175
13–14	29	–	–	100	39,3	50	48,2	76,8	73,2	0,8	0,16
	30	–	–	100	32,2	35,6	37,3	66,1	57,6	0,85	0,18
	31	–	+	100	18	18	22,5	32,6	18	0,66	0,13
	У середньому				29,8	0,77	36	58,5	49,6	0,77	0,157
18–19	32	–	–	100	35,1	39	57,9	86	79	1,04	0,18
	33	–	–	100	43,4	41,5	56,6	92,5	98,5	0,52	0,10
	34	–	–	100	37,1	51,4	77,1	100	90	1,16	0,17
	У середньому				38,5	0,91	63,9	92,8	89,2	0,91	0,153
Контроль	35	–	–	100	28,7	51,7	80	103	104,7	0,88	0,14

За цього після евтаназії патолого-анатомічні зміни, характерні для туберкульозу, не були виявлені.

Разом з цим зараження біологічним матеріалом від морської свинки за № 9 (табл. 142) з подібними до туберкульозних змінами двох свинок за № 25 та 26 (табл. 143) не стимулювало розвитку туберкульозного інфекційного процесу та алергії. Це підтверджує правильність висновку лише про подібність змін, на якому було акцентовано на першому етапі з'ясування нешкідливості дисоціативних форм для морських свинок. Прояв алергічної реакції на туберкулін може характеризувати досліджувані мікобактерії як мікроорганізми, що зберігають певну здатність сенсibiliзувати макроорганізм (що правда, в дуже великих дозах та за повторного пасажу через морських свинок, коли число реагуючих збільшилося в два рази), тобто змінювати його імунобіологічний статус захисних систем на рівні фізіологічної норми організмів, які частіше всього реагують на розмноження патогенних мікобактерій,

зокрема селезінка. З даних аналізованої *табл. 143* видно, що в середньому маса селезінки дослідних свинок та контрольних була практично однаковою, в межах від 0,55 до 0,94 г, а індекс селезінки не перевищував 0,2.

Між тим, порівнюючи масу селезінки, яка в п'ять і більше разів більша у хворих на туберкульоз морських свинок, можна стверджувати, що в дослідних свинок відбувається перебудова та імунологічний захист організму, в який ін'єктовано мікобактерії дисоціативних форм. Аналогічні висновки повідомлені Ю.К. Вейсфейлером (1975), В.Д. Свиридовим (1984), які наголошують, що за туберкульозу селезінка суттєво збільшується, а за введення в організм культури штаму BCG та атипичних мікобактерій змін з боку цього органа не відмічається, що свідчить про розвиток та формування специфічного імунітету проти туберкульозу. Проте тривалість та напруженість імунітету може бути різною, оскільки імунологічний статус, здатність формувати імунітет кожного макроорганізму суттєво різняться.

Суспензію, приготовану з біологічного матеріалу морських свинок досліджених груп, висіяли на середовище Левенштейна-Йєнсена та підшкірно ін'єктували морським свинкам в об'ємі 1 см³ – третій прямий пасаж. Такі дослідження прикінцево з'ясують, чи мікобактерії дисоціативних форм змінилися на рівні фенотипу, чи все ж таки відбулася мутація генетичного коду й виявлені нові біологічні властивості закріпилися на молекулярному рівні, які зберігаються у нащадків, що може визначати нову расу мікроорганізмів.

Культуральними дослідженнями об'єднаної суспензії, приготованої з біологічного матеріалу морських свинок № 13 та 14 і 18 та 19, на 10 добу виявлено ріст колоній.

На *рис. 167, 168* видно, що колонії та відповідно мікобактерії вихідних дисоціативних форм відрізняються від виділених з біологічного матеріалу морських свинок, одержаних після другого пасажу (*рис. 169, 170*).

Необхідно зазначити, що з біологічного матеріалу морських свинок першого пасажу, заражених цими штамми мікобактерій, культура не була виділена. Водночас культури вихідних форм мікобактерій мали дещо жовто-помаранчове забарвлення й росли по лінії висіву. Культури, одержані з біологічного матеріалу морських свинок другого пасажу, характеризувалися ок-

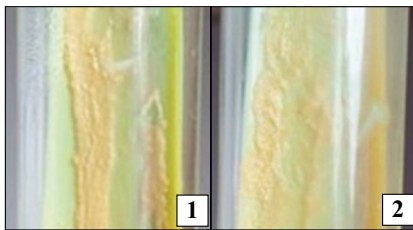


Рис. 167. Культура дисоціативних мікобактерій: 1, 2 – відповідно 117а, в

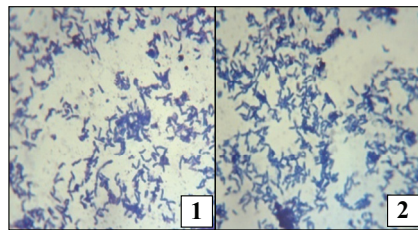


Рис. 168. Тинкторіальні властивості та морфологія вихідних дисоціативних мікобактерій: 1, 2 – відповідно 117а, в ×1600

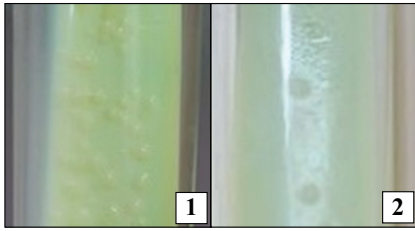


Рис. 169. Культура дисоціативних мікобактерій, виділена з біоматеріалу морських свинок другого прямого пасажу: 1, 2 – відповідно 117а, в

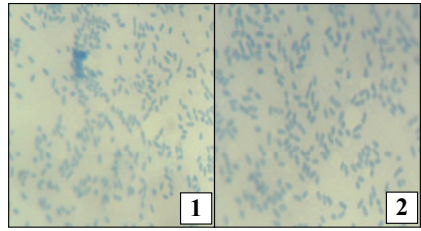


Рис. 170. Тинкторіальні властивості та морфологія дисоціативних мікобактерій, виділених з біоматеріалу морських свинок другого прямого пасажу: 1, 2 – відповідно 117а, в × 1600

ремими світлими колоніями (117 штам 240а) та суцільним ростом (117 штам 240в), щоправда, на початку останній штам мікобактерій формував окремі прозорі зеленого відтінку колонії.

Між тим на тлі зміни певних культуральних властивостей відмічені й морфологічні відмінності мікобактерій за збереження тинкторіальних властивостей: вихідні мікобактерії характеризувалися різноманіттям форм – некіслотостійкі зерна (дрібні, великі), зернисті короткі й більш довгі палички; одержані від морських свинок – не кіслотостійкі, практично тільки короткі зернисті палички та зерна.

Водночас, продовжуючи спостерігати за посівами, встановили ріст колоній на 69 добу культивування мікобактерій 118 генерації. Окрім цього, в ті самі строки встановлено ріст додаткових колоній на середовищі з висіяними мікобактеріями 240а і в. Колонії поодинокі, жовтого та помаранчового забарвлення. Під імерсійною системою в мазках, приготовлених із помаранчових колоній, через три тижні росту виявлені овальні L-форми з різною оптичною густиною поверхні, з яких виштовхуються некіслотостійкі зерна, елементарні тільця, що розташовуються біля і між овалами, а в мазках, приготовлених із жовтих колоній, – некіслотостійкі дрібні зерна та короткі палички.

Таким чином, від морських свинок першого та другого пасажів (через три місяці експерименту) ізолювано п'ять культур: 117а, б, в та 118, що свідчить про тривалу персистенцію в тканинах морських свинок дисоціативних форм *M. bovis*.

Того ж часу ці дослідження переконливо підтвердили мутацію генетичного коду дисоціативних форм мікобактерій. Проте деякі відмінності в культуральних властивостях та морфології досліджуваних мікобактерій можуть бути зумовлені віком культури: перші (вихідні) зберігалися в умовах низької плюсової температури 2,5 місяця, другі (виділені з біологічного матеріалу морських свинок) – два–три тижні. Без сумніву, це може впливати на аналізовані показники мікобактерій, що узгоджується з повідомленнями ряду дослідників, наведеними в оглядовому матеріалі першого розділу цієї роботи.

Спостерігаючи та досліджуючи морських свинок третього пасажу відмічено, що тварини, як дослідні, так і контрольні, динамічно набирали масу. Проте виразок у ділянці введення суспензії біологічного матеріалу від досліджених тварин другого пасажу не виявлено так само, як і алергічних реакцій на ППД-туберкулін для ссавців на 30 та 60 добу експерименту. Типових патолого-анатомічних змін, характерних для туберкульозу, через 90 діб досліду не зареєстровано. Водночас у деяких тварин виявлені поодинокі, невеликого розміру сіро-жовтого кольору вузлики (в основному в легенях, селезінці).

Отже, триразові прямі пасажі через організм морських свинок чотирьох штамів дисоціативних форм *M. bovis* (117a, б, в та 118) 240-ї генерації не призвели до реверсії досліджених мікроорганізмів у вихідний материнський патогенний варіант збудника туберкульозу, що переконує в наявності мутації генетичного коду мікобактерій. За цього залишається незрозумілою можливість мікобактерій з практично втраченою здатністю розмножуватися на штучному середовищі за 37 °С, тривало персистувати в макроорганізмі (розмножуватися) з подальшим, після виділення з біологічного матеріалу дослідних морських свинок, розмноженням за 3 °С на штучному живильному середовищі. Можна тільки припустити, що гени, які відповідають за метаболізм в різних температурних режимах культивування мікобактерій, достатньо лабільні, що створює умови для відносно легкого перелаштування (активізуватися чи пригнічуватися), забезпечуючи виживання в довкіллі. Проте на цьому тлі гени патогенності, морфології, тинкторіальних властивостей стабільно змінилися та, будучи, умовно стверджуючи, другорядними в складних процесах біологічного циклу розвитку мікобактерій, не ускладнюють виживання, а навпаки, полегшують, забезпечуючи розмноження на електричних та простих живильних середовищах, з умістом натрію саліциловокислого тощо.

Так забезпечується збереження того чи іншого штаму мікобактерій в природі, хоча й з втраченими деякими біологічними властивостями, які за певних умов довкілля, можливо, поновлюються за рахунок активізації генів, мутованих у попередніх поколіннях, а може, й не реверсують у вихідні активні.

У той же час тривала персистенція мікобактерій в тканинах макроорганізму (три місяці) та стимуляція ними в поодиноких морських свинок алергії (I та II пасажі) створює обнадійливі передумови формування імунітету, тривалість та напруженість якого буде встановлена шляхом повторних експериментів у подальшому, з урахуванням визначених особливостей біологічної активності досліджуваних мікобактерій.

Вивчення біологічної активності дисоціативних форм M. bovis, інкубованих за 3 та 37 °С. Для проведення таких досліджень завис культури мікобактерій 120 генерації розводили до 10^{-9} й останні 10^{-7} , 10^{-8} та 10^{-9} висівали на середовище Левенштейна-Йенсена і культивували за різних температур.

Звичайно, біологічна активність збудника інфекційної хвороби, у тому числі й туберкульозу, визначається сукупністю притаманних для конкретного мікроорганізму властивостей: патогенність, вірулентність, морфологія, культуральні, тинкторіальні й ін., здатність утворювати корд-фактор, біохімічна

активність та ін., зміна яких (або окремих з них) характеризує потенціальні можливості мікобактерій конкретного штаму.

Багаторічними дослідженнями швидкорослого високовірулентного штаму *M. bovis*, від якого відщепилася на 117 та 118 пересівах авірулентна раса, в умовах низьких плюсових температур з'ясовано ряд важливих питань. Однак окремі залишилися ще й невивченими. Серед них й здатність мікробних клітин авірулентної (дисоціативної) раси розмножуватися на живильному яєчному середовищі Левенштейна-Йенсена. З'ясування здатності дисоціативних форм *M. bovis* розмножуватися (формувати колонії) на середовищі залежно від тривалості зберігання культури та температури може суттєво вплинути на методику підбору дози мікобактерій для конструювання вакцини. Можливо, саме відсутність результатів з вивчення біологічної активності дисоціативних форм *M. bovis*, що наведено вище, дещо вплинула на об'єктивність оцінки імуногенної ефективності, оскільки, залежно від кількості активних клітин, швидкості формування колоній, могли б бути зовсім іншими вакцинуюча доза та тривалість періоду між імунізацією та зараженням дослідних тварин вірулентним штамом.

У результаті досліджень встановлено (табл. 144), що активність мікобактерій різна не тільки в умовах культивування за однієї температури, а і за різних. Найвищою вона виявилася у мікобактерій 117б варіанта як за 37 °С, так і 3 °С. Проте в розведенні 10⁻⁹ за температури 37 °С життєздатність мікобактерій, їх активність виявилася в 4,3 раза нижчою, ніж за 3 °С. Інші штами мікобактерій за 37 °С культивування не проявляли росту в усіх розведеннях. Це підтверджують попередні дослідження, які наведені раніше: дисоціативні форми мікобактерій не культивуються або погано культивуються за 37 °С.

144. Біологічна активність *M. bovis* штамів дисоціативних форм на середовищі Левенштейна-Йенсена залежно від температури культивування

<i>M. bovis</i> , штам	t °С	У розведенні кількість колоній на добу																	
		10 ⁻⁷						10 ⁻⁸						10 ⁻⁹					
		7	14	21	28	35	42	7	14	21	28	35	42	7	14	21	28	35	42
117а	3	–	3	3	4	6	6	–	3	3	3	3	3	–	6	7	7	7	7
	37	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
117б	3	–	–	25	28	30	40	–	–	13	17	20	31	–	–	6	6	6	13
	37	–	18	20	20	21	21	35	75	85	89	95	106	3	3	3	3	3	3
117в	3	–	–	–	10	16	17	–	–	–	2	2	2	–	–	–	–	–	–
	37	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
118	3	–	–	–	2	2	4	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
	37	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

За температури 3 °С найвищою виявилась активність у мікобактерій 117а варіанта, які формували колонії на 14 добу в усіх розведеннях. Достатньо низька біологічна активність відмічена в мікобактерій 118 штаму, бо їх ріст

проявився тільки в розведенні 10^{-7} , і до того ж на 28 добу культивування. Дещо вища, але також низька активність виявлена і у 117в варіанта – ріст проявився в розведенні 10^{-7} та 10^{-8} теж на 28 добу культивування.

Водночас звертає увагу те, що швидкість формування колоній різко подовжується за розведення мікобактерій. Це може свідчити про те, що клітин з потенційною здатністю швидко розмножуватися, які вмішувалися у вихідній культурі в попередніх дослідах, мало залишається в підготовленому (розведеному) завису й вони неактивні (слабко активні). Натомість мікобактерії з повільним розмноженням, які, без сумніву, вміщуються в тій чи іншій популяції, утворюють поодинокі, а інколи й значну кількість (варіант штаму 117б) колоній у віддалині строки. Тобто в расі мікобактерій того чи іншого штаму дисоціативних форм, які нами досліджено, наявні як швидко-, так і повільнорослі мікобактерії. Перші, вірогідно, володіють слабкою адаптивною здатністю до умов штучного живильного середовища, оскільки вони в незначній кількості також вміщуються в такому розведенні, але не розмножуються (не формують колонії).

Отже, ці дослідження засвідчили та підтвердили: 1) втрату здатності в мікобактерій генеруватися (розмножуватися) за 37°C (за винятком мікобактерій 117б варіанта), принаймні в перші 42 доби спостереження; 2) низьку біологічну активність у мікобактерій штаму 118 та 117в; 3) здатність тільки одного штаму (117б) активно розмножуватися як за низької плюсової (3°C), так і оптимальної традиційної температури (37°C).

З'ясування "чистоти" культури дисоціативних форм *M. bovis*. Таке питання, без сумніву, може виникати в дослідника. І це обгрунтовано, оскільки різноманітні морфологічні форми та й різні культуральні, тинкторіальні властивості можуть наводити на думку про забруднення досліджуваних культур мікобактерій сторонніми мікроорганізмами.

Для з'ясування "чистоти" культури з однієї клітини дисоціативних форм *M. bovis* використали попередній дослід, коли розводили культури мікобактерій та висів завису на середовище Левенштейна-Йенсена з подальшою інкубацією за 3 та 37°C . У динаміці досліджували одну окремо розташовану колонію, яка утворилася за максимального розведення. Це забезпечило дослідження морфології мікобактерій, які формували колонію з однієї клітини. Саме з такого (10^{-9}) розведення відбирали частку колонії в перші декілька діб її появи, готували мазки та досліджували їх під імерсійною системою. Періодично проводили аналогічну маніпуляцію з цієї ж колонії протягом 32 діб. Порівнювали морфологію мікобактерій, тинкторіальні та культуральні властивості з такими до і після посіву суспензії, приготовленої з однієї досліджуваної колонії.

У результаті проведеної роботи зі з'ясування "чистоти" культури дисоціативних форм *M. bovis* відмічено, що з початку росту колоній спостерігаються деякі відмінності в морфології досліджуваних мікобактерій від таких вихідних форм. Встановлено також, що на живильних середовищах дисоціативні форми *M. bovis* формували ізольовані колонії, які легко обліковуються. Проте колонії не мали чітко вираженого пігментоутворення, як їх вихідні культури 117а, 117б, 117в варіантів.

Культури дисоціативних форм *M. bovis* 1176 варіанта, одержані за температур 3 та 37 °С, різнилися не тільки між собою, але й від вихідних. Проте за морфологією мікобактерій суттєвих відмінностей не спостерігалося.

Мікобактерії культури 1176 варіанта, які культивувалися за 37 °С, виявлялися у формі некіслотостійких зернистих довгих (10–15 мкм) та некіслотостійких й кислотостійких поодиноких зерен. Мікобактерії вихідної культури були некіслотостійкими короткими паличками та зернами і тільки поодинокими некіслотостійкими довгими паличками (рис. 171). Мікобактерії, які утворювали колонії за 3 °С, виявилися некіслотостійкими різної довжини зернистими паличками та зернами, а також поодинокими кислотостійкими зернами і короткими паличками (рис. 172).

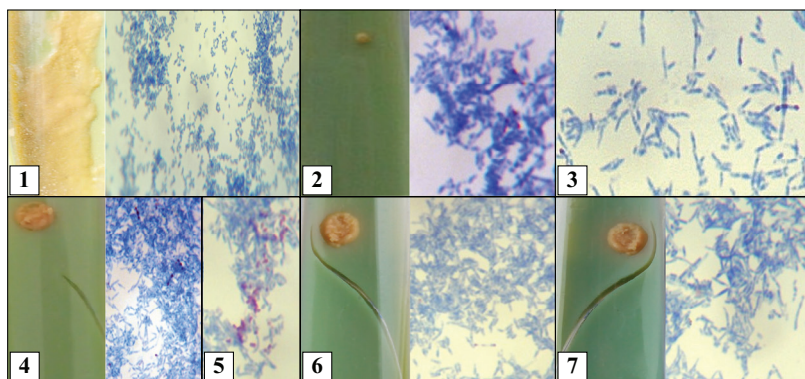


Рис. 171. Культуральні, тинкторіальні властивості та морфологія ($\times 1600$) *M. bovis* 1176 варіанта, культивованих за 37 °С; культура і мікобактерії: 1 – вихідні; 2 – 7 доба; 3 – 15; 4 – 21; 5 – 27; 6 – 30; 7 – 37 доба

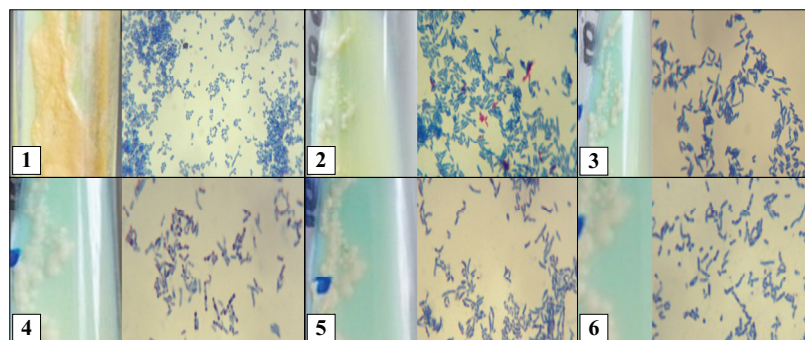


Рис. 172. Культуральні, тинкторіальні властивості та морфологія ($\times 1600$) *M. bovis* 1176 варіанта, культивованих за 3 °С; культура і мікобактерії: 1 – вихідні; 2 – 4 доба; 3 – 8; 4 – 20; 5 – 28; 6 – 32 доба

Проте зі збільшенням тривалості культивування мікобактерій дослідженого варіанта, як за 3, так і 37 °С, мікроскопією не зафіксовано кислотостійких зерен та паличок.

Мікобактерії 117а та 117в варіантів, які культивувалися за 3 °С, виявилися (рис. 173 та 174) некислотостійкими паличками різної довжини (короткі та довгі) й некислотостійкими поодинокими зернами протягом усього періоду дослідження.

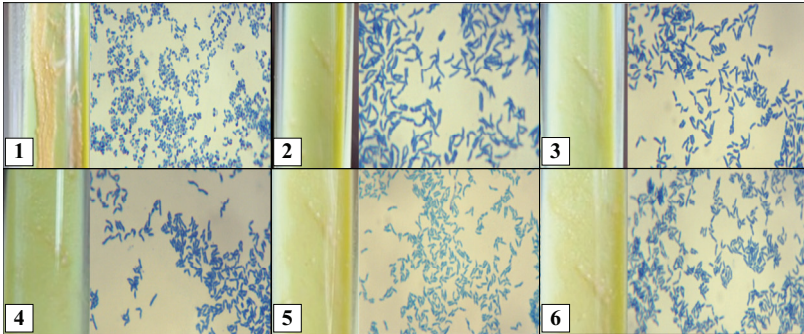


Рис. 173. Культуральні, тинкторіальні властивості та морфологія ($\times 1600$) *M. bovis* 117а варіанта, культивованих за 3 °С; культура і мікобактерії: 1 – вихідні; 2 – 4 доба; 3 – 8; 4 – 16; 5 – 24; 6 – 32 доба

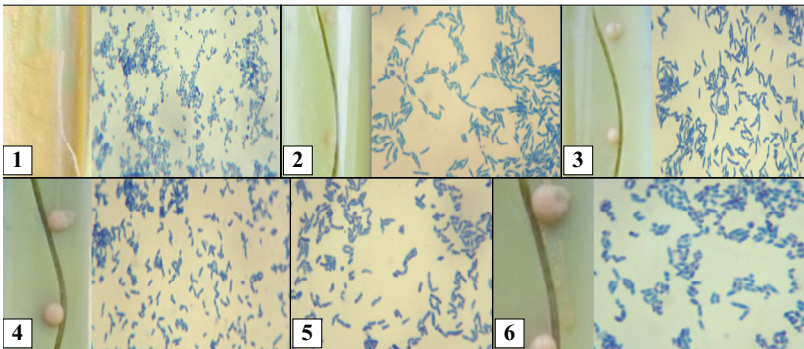


Рис. 174. Культуральні, тинкторіальні властивості та морфологія ($\times 1600$) *M. bovis* 117в варіанта, культивованих за 3 °С; культура і мікобактерії: 1 – вихідні; 2 – 4 доба; 3 – 12; 4 – 20; 5 – 24; 6 – 32 доба

Як зазначалося вище, дисоціативні форми мікобактерій 118 варіанта утворювали колонії за 3 °С (рис. 175) тільки в розведенні 10^{-7} . За кольором культури були подібними до вихідних. Мікроскопією виявляли некислотостійкі зернисті палички різної довжини та поодинокі некислотостійкі зерна.

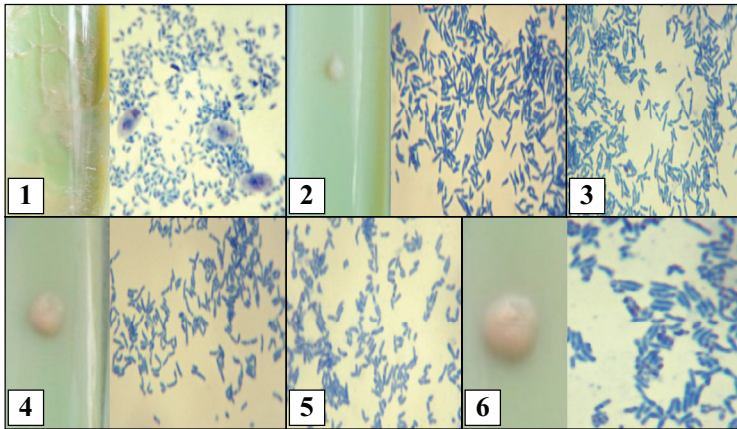


Рис. 175. Культуральні, тинкторіальні властивості та морфологія ($\times 1600$) *M. bovis* 118 варіанта, культивованих за 3 °С; культура і мікобактерії: 1 – вихідні; 2 – 4 доба; 3 – 12; 4 – 20; 5 – 24; 6 – 32 доба

Класичних (типових) варіантів (овалів) L-форм, які відмічалися у вихідній культурі, не виявлено, що, напевно, зумовлено суттєвим зниженням умісту ліпідів у клітинній стінці, через значну кількість пасажів та, швидше за все, біологічним циклом розвитку, коли сферопластні L-форми, усередині яких відмішується ядерна речовина, розпадаються на зерна. Вірогідно це і призвело до руйнації клітинної стінки L-форм.

Отже, дисоціативні форми *M. bovis* 117a, 117б, 117в, 118 варіантів зберігають морфологічну, тинкторіальну та культуральну стабільність та однорідність протягом усього періоду досліджень, що свідчить про “чистоту” культур.

Мікроструктурні зміни органів морських свинок, заражених дисоціативними варіантами Mycobacterium bovis швидкорослого штаму. Одержавши результати з біологічної активності мікобактерій в умовах штучного живильного середовища та “чистоти” культури, необхідно було з’ясувати на біологічній моделі, наскільки активно розмножуються дисоціативні форми мікобактерій у тканинах макроорганізму, чи стимулюють вони розвиток інфекційного процесу та якої складності. Для цієї роботи використали морських свинок, в організм яких (парентерально) ін’єктували досліджувані мікобактерії (штами 117a, б, в; 118) в дозі 10 мг/см³ фізіологічного розчину. Через три місяці від початку досліду тварин евтанізували, а біологічний матеріал від них досліджували гістологічним методом.

Для цього дослідження відбирали шматочки тканини селезінки та легень. Матеріал фіксували 10%-вим розчином нейтрального формаліну. Парафінові зрізи виготовляли на санному мікротомі і фарбували гематоксилін-еозином загальноприйнятим методом.

У результаті досліджень відмічено, що дисоціативні варіанти мікобактерій не викликали загибелі та розвитку явного інфекційного процесу, харак-

терного для туберкульозу, в експериментальних тварин. На розтині морських свинок характерних макроскопічних патоморфологічних змін (туберкульозних вузликів) також не спостерігалось.

Гістологічними дослідженнями зразків легень заражених тварин було встановлено порушення кровообігу у вигляді венозного повнокров'я, стазів, наявності червоних тромбів у просвіті судин з лімфоїдною інфільтрацією навколо (рис. 176.1). Мав місце нерівномірно виражений інтраальвеолярний набряк, міжальвеолярні перетинки були потовщені, місцями погано контуровані за рахунок запальної інфільтрації. Субплевральні ділянки тканини легень були з нерівномірною запальною інфільтрацією (рис. 176.2 та 176.3).

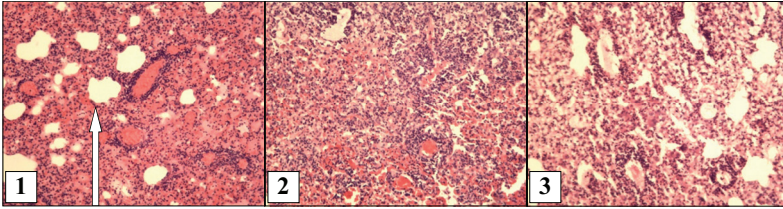


Рис. 176. Гістологічне дослідження зразків легень:

- 1 – червоні тромби в просвіті судин з лімфоїдною інфільтрацією навколо;
 2 – тканина легень зі запальною інфільтрацією $\times 400$; 3 – субплевральні ділянки тканини легень з нерівномірною запальною інфільтрацією.

Гематоксилін та еозин. $\times 100$

Запальний інфільтрат був представлений переважно лімфоцитами, макрофагами, зустрічалися клітини типу епітеліоїдних та сегментоядерні лейкоцити. Крім того, спостерігалися незначні відмінності ультраструктурних змін, спричинених різними дисоціантами *M. bovis*. Так, у зразках тварин, заражених варіантом 240/118, серед запального інфільтрату виявлялися групи гігантських багатоядерних клітин (рис. 177.1), варіантом 240б – клітини

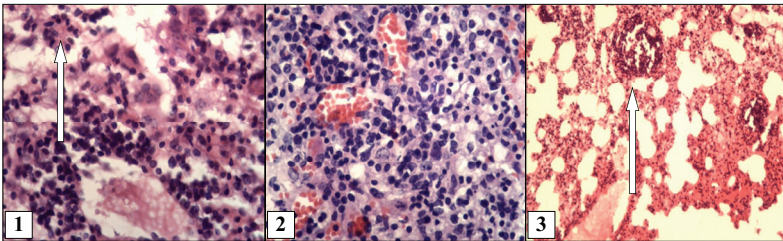


Рис. 177. Гістологічне дослідження зразків легень:

- 1 – група гігантських багатоядерних клітин; 2 – запальний інфільтрат, представлений лімфоцитами, макрофагами, клітинами типу епітеліоїдних, поодинокі клітини з великими поліморфними ядрами;
 3 – гранульомоподібні вогнищеві лімфоїдні інфільтрати.

Гематоксилін та еозин. $\times 100$

з великими поліморфними ядрами (рис. 177.2), варіантом 240a – гранульомоподібні вогнищеві лімфоїдні інфільтрати (рис. 177.3), варіантом 240a – у вигляді пневмонічних вогнищ зі залученням до процесу групи альвеол, а в складі інфільтрату були поодинокі еозинофіли (рис. 178.1 та 178.2).

У селезінці всіх тварин зміни мали однотипний характер. Спостерігалися помірне повнокров'я, гіперплазія червоної пульпи. Лімфоїдні фолікули мали ознаки гіперплазії у вигляді збільшення розмірів за рахунок розширення центрів розмноження. Стромальні елементи були набряклими, синуси погано контурованими (рис. 179).

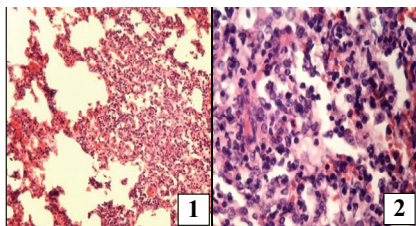


Рис. 178. Гістологічне дослідження зразків легень: 1 – пневмонічне вогнище зі залученням до процесу групи альвеол. $\times 100$;
2 – інфільтрат пневмонічного вогнища, представлений поодинокими еозинофілами. Гематоксилін та еозин. $\times 400$

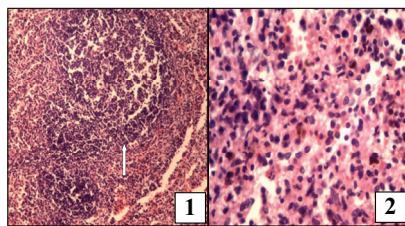


Рис. 179. Гістологічне дослідження зразків селезінки:
1 – гіперплазований лімфоїдний фолікул селезінки. $\times 100$;
2 – помірне повнокров'я та розпушення ретикулярної стромы селезінки. Гематоксилін та еозин. $\times 400$

Отже, встановлено, що в органах морських свинок персистуючі дисоціативні варіанти *Mycobacterium bovis* швидкорослого штаму спричинюють запальну інфільтрацію легень та гіперплазію лімфоїдних фолікулів селезінки, що підтверджує наявність доброякісного інфекційного процесу за напруженості клітинної фази імунної відповіді. Це свідчить про те, що дисоціативні форми *M. bovis*, подразнюючи захисні бар'єри макроорганізму, викликають імунологічну реакцію – прояв доброякісного інфекційного процесу, який безпосередньо пов'язаний з формуванням специфічного імунітету, напруженість та тривалість якого буде встановлена в подальшому.

З'ясувавши різну біологічну активність, певну стабільність морфології, тинкторіальні властивості та розвиток доброякісного інфекційного процесу в експерименті на морських свинках за інокуляції супервисокої дози дисоціативних форм досліджуваних мікобактерій (10 мг/см^3 фізіологічного розчину) обґрунтованими виявилися уточнення виду мікроорганізмів шляхом молекулярних досліджень.

Молекулярні дослідження. Матеріалом для досліджень були дисоціативні штами (240a, 240б, 240в, 240/118) *M. bovis* та материнський патогенний

швидкорослий штам. Як контроль використовували *M. bovis* музейних штамів (*Vallee*, BCG, “Шахтар”) та *M. avium* штаму “Курка”.

Морфологію та тинкторіальні властивості мікобактерій вивчали після виготовлення мазків із колоній і фарбування їх за методом Ціля-Нільсена.

Для детекції ДНК мікобактерій попередньо накопичували біомасу культури на живильному середовищі з рН 7,0–7,2 за 3 (дисоціативні варіанти) та 37 °С (вихідний варіант та музейні штами) протягом 30 діб із часу появи росту і готували 0,2 см³ завису мікобактерій у концентрації 1 мг/см³.

Для ПЛР використовували ампліфікатор iCycler iQ5 (виробник Bio-Rad, США) та комплект реагентів для ПЛР-ампліфікації ДНК (*M. tuberculosis*–*M. bovis* complex, у тому числі штаму BCG) з детекцією в режимі реального часу (“МИКО-ГЕН”, виробник НУО ДНК-технологія, Російська Федерація). Режим ампліфікації наведено в табл. 145.

145. Програма ампліфікації ДНК мікобактерій

№ циклу	Кількість повторів	Час	Температура, °С
1	1	1 хв	80
		1 хв 30 с	94
2	5	30 с	94
		45 с	64
3	45	10 с	94
		45 с	64

У результаті досліджень було встановлено, що за мікроскопії мазків, зафарбованих методом Ціля-Нільсена, виготовлених із колоній вихідного варіанта *M. bovis* швидкорослого штаму в полі зору мікроскопа виявлялися кислотостійкі короткі палички. Дисоціативні варіанти мікобактерій були представлені некіслотостійкими поліморфними кокоподібними та паличкоподібними мікроорганізмами. За мікроскопічних досліджень бактеріальних препаратів, виготовлених із колоній *M. bovis* музейних штамів (*Vallee*, BCG “Шахтар”), спостерігалися червоні товсті короткі палички, а з колоній *M. avium* – червоні тонкі поліморфні палички.

За результатами ампліфікації ДНК *M. bovis* штамів *Vallee*, “Шахтар” та BCG було виявлено ДНК-мішені збудника (табл. 146). Як бачимо, ДНК дисоціативних варіантів, на відміну від вихідної культури, *M. bovis* швидкорослого штаму не вдалося детектувати.

Таким чином, генно-молекулярними дослідженнями встановлено генетичні зміни ДНК-мішені дисоціативних варіантів *M. bovis* швидкорослого штаму, що вказує на мутацію збудника туберкульозу за дисоціації. Дисоціативні варіанти *M. bovis* швидкорослого штаму не детектуються до комплексу *M. tuberculosis*–*M. bovis* методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу внаслідок мутації мікроорганізмів.

146. Результати ампліфікації ДНК мікобактерій

Вид мікобактерій	Штам мікобактерій	Результат детекції продуктів ампліфікації
<i>M. bovis</i>	швидкорослий (вихідний)	+
	швидкорослий (240a)	–
	швидкорослий (240б)	–
	швидкорослий (240є)	–
	швидкорослий (240/118)	–
	<i>Vallee</i>	+
	“Шахтар”	+
	BCG	+
<i>M. avium</i>	“Курка”	–

Підсумовуючи результати, можна стверджувати, що швидкорослий високівірulentний штам *M. bovis* за численних пересівів через штучне щільне живильне середовище без індукуючих чинників змінився через різноманітні стадії морфологічних форм з одночасною зміною синтетазних систем й відповідно пригніченням одних й активізацією інших дримаючих до певного часу генів, набувши зовсім відмінних від материнського варіанта, але притаманних деякою мірою атипovим мікобактеріям та можливо родококам властивостей.

Тобто ці зміни мікобактерій не супроводжуються повною втратою сенсифілізувальної здатності та патогенності, оскільки супервисокі дози дисоціативних мікобактерій стимулювали доброякісний інфекційний процес та прояв алергії (хоча й у поодиноких тварин) на ППД-туберкулін для ссавців.

У цьому зв'язку можна було б стверджувати, що глибока трансформація генів досліджуваних мікобактерій є результатом численних пересівів з одномоментним довготривалим витримуванням за низької плюсової температури (2–3 °С; 117 та 118 генерація мікроорганізмів). Проте не виключається можливість проникнення в заводи мікобактерій й сторонньої мікрофлори, такої, наприклад, як родококи. Але враховуючи те, що в лабораторії з обмеженим доступом сторонніх осіб досліджувався лише один вид (штам) мікобактерій бичачого виду, то така думка (можливість) спростовується й підтверджує конверсію мікобактерій аж до принципової зміни біологічних властивостей, які певною мірою дещо нагадують атипovих мікобактерій та родококів.

ТЕЗИСНІ РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Сформовані протягом більш як 130 років тому погляди на біологічні властивості мікобактерій та відпрацьована й реалізована на їх основі система профілактики й викорінення туберкульозу тварин не зовсім відповідають фактичній дійсності. На це переконливо вказує той факт, що повна заміна скомпрометованого поголів'я тварин забезпечує в загальному надійне викорінення туберкульозу на тій чи іншій території, хоча й існують випадки, коли оздоровлення господарств, без рецидиву хвороби, досягається за використання методу систематичних алергічних досліджень з подальшим відправленням на забій інфікованих збудником туберкульозу тварин, що зазначено нашими дослідженнями економічних збитків у межах господарств України. Аналіз відповідних даних підтверджує наявність нез'ясованих проблем у біології збудника та системи профілактики й боротьби з туберкульозом. На наш погляд, це пов'язано з недостатнім вивченням властивостей збудника туберкульозу, оскільки сучасні молекулярні дослідження генетичного коду свідчать про більш широкі можливості мікобактерій змінювати свою активність залежно від умов довкілля.

Надзвичайно цінним є дослідження біологічних властивостей одного штаму мікобактерій в динаміці численних пасажів через штучне щільне елективне живильне середовище з різним умістом кислотно-лужних грам-еквівалентів. Такий методологічний підхід застосований в дослідженнях досить виправдано, бо він надає можливість різнобічно дослідити аспект властивостей, які принципово відрізняються від таких вихідного материнського штаму мікобактерій. Водночас переважна більшість змін у культуральних, тинкторіальних та інших властивостях під впливом індукуючих чинників спорадично описана різними дослідниками, але поряд з цим виявлено й ряд незвичайних, уперше ідентифікованих особливостей, які значно розширюють уяву про можливість мікобактерій виживати в довкіллі, на що, ми переконані, впливають рН та строки між черговими пересівами (пасажами) культури.

Вочевидь еволюційно закладеним генетичним набором ДНК мікобактерій передбачено послідовні зміни морфології, культуральних, тинкторіальних, патогенних й інших властивостей, які беззаперечно відбуваються на тлі вмісту загальних ліпідів, їх фракцій та вільних жирних кислот, фосfolіпідів у динаміці послідовних пересівів через щільне живильне середовище.

У цьому зв'язку патогенні мікобактерії, зокрема бичачого виду, поступово змінюють метаболізм, одночасно набуваючи здатності більш інтенсивно проявляти біохімічну активність порівняно з вихідним материнським патогенним (вірулентним) штамом, та, змінюючись морфологічно (видовжуючись), генерують некіслотостійкі як палички, так і ниткоподібні, утворюють іншу за будовою культуру (колонії). Це супроводжується незвичайною адаптивною здатністю й зміною на цьому тлі швидкості розмноження мікобактерій (формування культури), характером росту на штучному живильному середовищі: суцільний ріст по лінії висіву збудника туберкульозу. На цьому тлі змінюєть-

ся / знижується вміст загальних ліпідів мікробної клітини за стабільності їх фракцій та зменшується кількість і рівень умісту довголанцюгових і збільшення коротколанцюгових вільних жирних кислот.

Проте рівень умісту скелетних вільних жирних кислот мікобактерій пальмітинової, олеїнової та стеаринової, незалежно від тенденції умісту довго- та коротколанцюгових, залишається стабільно високим.

Того ж часу зниження вмісту тільки довголанцюгових вільних жирних кислот супроводжується зниженням вірулентності патогенних мікобактерій. Дані змін та інші показники приводять до набуття можливості мікобактерій культивуватися на простих живильних середовищах (МПА та МПБ), середовищі (щільному яечному) з умістом натрію саліциловокислого (0,5 та 1,0 %). З появою таких та інших властивостей мікобактерії продукують пігмент.

Напевно, зміна процесів метаболізму спонукає геном мікробної клітини активізувати до цього “дріманочі” гени, що стимулюють прояв до цього не ідентифікованих властивостей. З’являється раніше не описана й відповідно не досліджувана здатність мікобактерій розмножуватися та накопичуватися за низьких плюсових температур (3 °С) і в таких умовах розціплюватися на апатогенні клони мікробних клітин, які певний період здатні реверсувати у вихідні патогенні штами, а в подальшому зберігати й стабільно клонувати змінені форми мікобактерій – некислотостійкі палички, ниткоподібні, L- та інші форми (з різною оптичною густиною поверхні), кислотостійкі елементарні тільця. Останні мають властивості, які не притаманні іншим указаним вище морфологічним формам мікобактерій, бо з їх появою в колонії, поряд з іншими структурними елементами, змінюється характер росту культури, яка згодом зникає. Це стверджує іншу біохімічну активність. Водночас особливо важливим аспектом цього явища є те, що в динаміці пересівів та культивування за 3 і 37 °С мікобактерії мають різну характеристику. За 3 °С генеруються в основному некислотостійкі зерна, за 37 °С – кислотостійкі елементарні тільця, культури яких у суміші з іншими морфологічними формами мікобактерій на штучному живильному середовищі припиняють генеруватися, що свідчить про їх особливі властивості, які необхідно врахувати за розробки та вдосконалення елективного середовища. Це може свідчити й про останній етап біологічного циклу розвитку мікобактерій (елементарні тільця) і визначати необхідність їх вивчення в інфекційному процесі та імунитеті; за 3 °С – некислотостійкі, в основному зерна й L-форми (овали) стабільно тривало генеруються на живильному середовищі, проте кількість останніх (з 220 пересіву) зменшується, а їх клітинна стінка внаслідок зниження вмісту ліпідів, а можливо, й з інших причин, стає прозорою, крихкою. Це визначає залежність L-форм, їх мембранних структур від осмотичного тиску: за прямого пересіву вони чітко структуровані, темно-сині, хоча й зустрічаються поодинокі з блідо-синьою оболонкою; за пересіву завису таких форм кількість овалів (L-форм) різко зменшується в одержаних культурах з них, і всі вони блідо-сині.

Водночас у 2015 році деякими вченими (А.П. Лисенко й співавт.) формулюється досить прагматична гіпотеза щодо ролі змінених форм

мікобактерій в інфекційному процесі. А саме. Автори ідеї передбачають тісний зв'язок вірусу лейкозу великої рогатої худоби і мікобактерій. Зокрема, передбачається, що геном ДНК елементарних тілец (ультрадрібні форми) інтегрується в геном хазяїна, подібно до канцерогенних вірусів, та провокує розвиток інфекційного процесу, подібно до лейкозу.

Паралельно стверджується, що вірус лейкозу великої рогатої худоби є продуктом мінливості мікобактерій. Проте така думка спростовується тим, що в більшій частині господарств зі значним поширенням вірусу лейкозу ніколи не відмічалася циркуляція мікобактерій туберкульозу.

Зазвичай, звільнені зі сферопластів елементарні тільця персистують в організмі тварин та людини, викликаючи (стимулюючи) певний специфічний захист гемостазу від агресивного кислотостійкого збудника туберкульозу. Який механізм цього явища – незрозумілий. В яких тканинах локалізуються такі структурні елементи, яка тривалість персистенції й інше – не відомо як і те, як штам VCG, збудник якого вміщує в клітинній стінці практично однаковий уміст загальних ліпідів, що й дисоціативні, змінені *M. bovis*, кислотостійкі в переважній більшості, а останні (дисоціанти) – не кислотостійкі. Генетично змінений вакцинний штам VCG – кислотостійкі палички, меншою мірою не кислотостійкі ниткоподібні форми, зерна (елементарні тільця) в організмі людини, тварин – конверсує в певні періоди персистенції в L-форми різних варіантів, які стимулюють імунітет, на чому наголошують З.С. Земскова та И.Е. Дорожкова (1985).

Проте, як свідчать наші та інших дослідників дані, це не зовсім так, оскільки L-форми конверсують в елементарні тільця за 37 °С, які, персистуючи в різних тканинах, вірогідніше за все стимулюють й підтримують імунітет певної тривалості та напруженості.

З цього приводу у 2005 році В.М. Катала й співавт., досліджуючи конверсію *M. tuberculosis*, повідомили, що в макроорганізмі спочатку утворюються ниткоподібні форми, з яких виділяються елементарні тільця (0,32–0,167 мкм), які так само, тільки в меншому ступені, утворювалися зі сферопластів. Автори роботи стверджують, що кінцевим етапом морфогенезу мікобактерій туберкульозу є елементарні тільця.

Наші спроби в експерименті дослідити імуногенну активність у таких штамів мікобактерій 40–50 генерацій завершилися певними успіхами, оскільки L- та інші форми з утраченою / зниженою сенсibiliзувальною здатністю стимулювали захист морських свинок від туберкульозу, щоправда, за розведення вірулентних мікобактерій в 10^{-6} – 10^{-7} ступенях. З меншим розведенням патогенного збудника туберкульозу цього не спостерігалось. Можливо, це пов'язано з недостатньою атенуйованістю мікобактерій, оскільки за введення морським свинкам 3 мг/см³ дисоціативних форм 40–50 генерацій в деяких тварин було виявлено туберкульоз.

Такий самий дослід на морських свинках тільки з 10 мг/см³ пасажованих 240 разів мікобактерій не виявив патолого-анатомічних змін туберкульозу, що

свідчить про досить значну атенуйованість чотирьох варіантів дисоціативних форм *M. bovis*.

Біологічний матеріал дослідних тварин, заражених супервисокою дозою мікобактерій (перший пасаж), за повторного і третього введення морським свинкам не стимулював розвиток туберкульозу, що може підтверджувати, поряд з високою атенуйованістю мікобактерій, достатньо глибоку мутацію генів дисоціативних форм *M. bovis* й низьку / відсутню сенсibilізувальну здатність, бо тільки поодинокі морські свинки (7 із 32) реагували на туберкулін.

Одержана культура мікобактерій з матеріалу морських свинок, як засвідчили досліди, стимулювала імунітет проти туберкульозу при зараженні морських свинок патогенним збудником у розведенні від 10^{-5} до 10^{-9} ступеня.

Отже, селекціоновані штами із швидкорослого високовірulentного штаму *M. bovis* володіють імуногенністю на тлі низької / відсутньої сенсibilізувальної здатності і можуть бути використані для конструювання вакцини. Зазначимо, що не можна випустити з обговорення й думку, яка утверджується в науці протягом останніх десятиліть. Це зв'язок гіперчутливість сповільненого типу й імунний захист прийнято вважати, що алергічна реакція на туберкулін після введення в організм мікобактерій свідчить про формування специфічного імунітету проти туберкульозу, її відсутність – навпаки. Наші дослідження довели необхідність дискусії щодо цього питання, оскільки морські свинки, практично не реагуючи (за винятком поодиноких тварин) на туберкулін, проявили специфічну стійкість проти збудника туберкульозу.

Можливо, специфічна біологічна властивість *M. bovis* дисоціативних форм розмножуватися за 3 °C і не розмножуватися (як правило) за 37 °C на штучному живильному середовищі визначила незвичайну особливість. Водночас необхідно враховувати високу здатність у селекціонованих нами імуногенних штамів мікобактерій конверсувати в елементарні тільця, сенсibilізувальна здатність яких не пізнана, тому стає очевидним, певною мірою, що такі утворення стимулюють імунітет без вираженої сенсibilізації, яка б виявлялася ППД-туберкуліном для ссавців. Крім цього, здатність змінених мікобактерій володіти властивостями, які притаманні атипичним, значно поширеним у довкіллі мікобактеріям, та особливо, на відміну від усіх розмножуватися за культивування при 3 °C, визначила, можливо, мінімальну сенсibilізувальну здатність, яка не виявляється інструктивною та підвищеною дозою (концентрацією МО) ППД-туберкуліну для ссавців. Така сенсibilізація (низького рівня) може бути виявлена в окремих тварин (15,8 %), в організм яких введено супервисоку дозу дисоціативних форм мікобактерій (10 мг/см³). Це свідчить про те, що прояв туберкулінової реакції залежить швидше за все не від дози алергену, а від кількості мікобактерій і, відповідно, від форми інфекційного процесу, який розвивається латентно, приховано з низьким рівнем сенсibilізації. Мікроструктурні зміни органів морських свинок, заражених дисоціативними *M. bovis* швидкорослого штаму, за відсутності у тварин характерних патолого-анатомічних змін туберкульозу свідчать про доброякісний інфекційний процес за напруженості клітинної фази імунної відповіді.

Результати роботи підтвердили, що біологічні властивості досліджених мікобактерій бичачого виду принципово змінюють уявлення про збудника туберкульозу та суттєво впливають на проблему туберкульозу, як глобальну проблему тваринного світу.

Без сумніву, встановлений біологічний цикл розвитку мікобактерій, їх різні морфологічні форми певних етапів, звичайно, мають пристосовний, адаптивний характер, оскільки відбувається зміна складного метаболізму в організмі хазяїна до живлення на простих живильних середовищах.

Достатньо тривалі й різноманітні експериментальні дослідження одного швидкорослого високовірулентного штаму *M. bovis* дозволили встановити біологічний цикл розвитку та підійти до цього явища з більш широких загальнобіологічних позицій і сформулювати висновок: для мікобактерій туберкульозу, зокрема *M. bovis*, мутація генетичного коду, вірогідніше за все, не є випадковою, а зовсім закономірною; вона проявляється на штучних живильних середовищах без індукуючих і з індукуючими речовинами та в макроорганізмі, де такими, поряд з іншими, є лізоцим, що вміщується в різних тканинах макроорганізму.

У той же час морфологічний L-цикл за культивування нестабільних L-форм на середовищах з трансформуючим агентом чи стабілізованих L-форм на середовищах без трансформуючого агента, за даними різних авторів (Тюлянь, 1949; Дінес і Вейнбергер, 1951), виглядає, якщо відкинути деякі деталі, так, як це показано на *рис. 180, 181*. Клітини, які піддалися дії трансформуючого агента, припиняють ділення, збільшуються в довжину чи розвиваються у сферичні крупні тіла, всередині яких відміщується ядерна речовина у вигляді численних зерен. Такі крупні тіла розпадаються, звільняючи велику кількість зернистих елементів різної величини, до субмікроскопічних, які у свою чергу після попередньої агрегації Піз (1958) розвиваються в бактеріальні клітини (реверсія) чи в крупні шароподібні тіла (фіксований чи стабілізований тип),

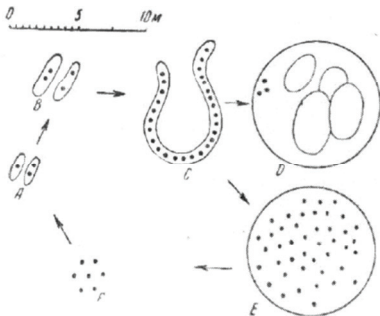


Рис. 180. L-цикл протеза за впливу пеніциліну. C, D, E – L-форми; F – субмікроскопічні форми (Тюлянь, 1949)

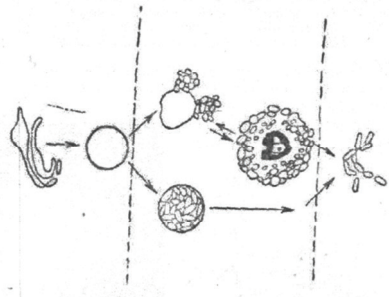


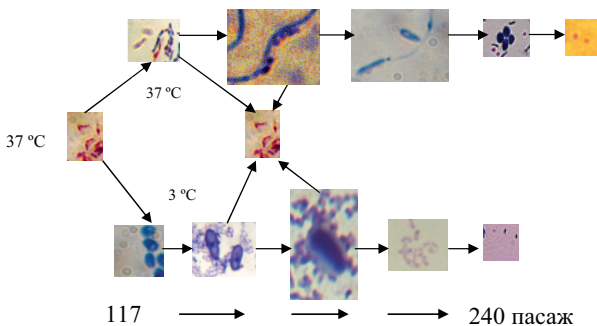
Рис. 181. Схема “циклу розвитку” клітин із L-форм (Дінес і Вейнбергер, 1951)

даючи початок новому “циклу” Клінебергер і Смайлс, 1942; Тюлянь, 1949; Дінес і Вейнбергер, 1951; Неллс, 1955.

Зернисті елементи різних розмірів складають другу суттєву приналежність L-цикла. Їх здатність фільтруватися через бактеріальні фільтри, зокрема через градоколові і целофанові мембрани, стала основою для ототожнення цих елементів з описаними раніше фільтривними формами.

Водночас з’ясувалося, що біологічний цикл мікобактерій на тлі відсутності впливу індукуючих чинників зводиться не тільки до конверсії в елементарні тілця (фільтруючі форми), що стверджують численні автори, а й в некіслотостійкі зерна, які стабільно генеруються за численних пересівів на штучному щільному живильному середовищі за низької плюсової температури (рис. 182). При цьому з овалоподібних сферопластних L-форм стабільно звільняються некіслотостійкі зерна, а з них, як з елементарних тілец, формуються, звичайно на певних стадіях розвитку, паличкоподібні кіслотостійкі форми мікобактерій. У більш пізніх генераціях утворюються практично тільки зерна. Наведений нами цикл розвитку в загальному співпадає не тільки з повідомленнями згаданих вище авторів середини ХХ ст., але й останніх десятиліть, коли досліджений цикл виявлено за 37 °С культивування (Green M.T. й співавт., 1974; Dominique G.J. і Woody H.B., 1994 та ін.). Принциповою відмінністю є те, що за низької плюсової температури сферопластні L-форми утворюються відразу з кіслотостійких паличок, минаючи фазу адаптації – ниткоподібних варіантів, а також те, що прикінцевою формою розвитку слугують некіслотостійкі зерна, а не елементарні кіслотостійкі тілця, як за 37 °С культивування.

Крім цього, за 37 °С культивування в процесі трансформування *M. bovis* виявляється ряд перетворень та змін морфології, того часу як за 3 °С узагалі тільки дві: везикулярні форми з виділенням (виштовхуванням) зерен



(рис. 183.1) та зникнення везикул (сферопластів) і генерація тільки некіслотостійких як макроскопічних, так і субмікроскопічних зерен – елементарних тілец (рис. 183.2).

Між тим, за введення в організм морських свинок L-форм (округлих утворень) в суміші з некіслотостійкими зернами (118 генерація 240 субкультура), які звільня-

Рис. 182. Морфологічний цикл біологічного розвитку *Mycobacterium bovis* швидкорослого штаму за численних пасажів через штучне живильне середовище Левенштейна-Йнсена за 3 і 37 °С × 1600

ються з них, через два прямих пасажі з біологічного матеріалу тварин (суспензії з нього), висіяного на щільне живильне середовище, на 69 добу утворюються поодинокі помаранчеві колонії за 3 °С культивування, які формуються (на 10 добу росту колонії) тільки овалоподібними формами (рис. 183.1), не вміщують зерен та елементарних тілець навколо них. Через сім діб за повторної мікроскопії сферопласти (L-форми) набувають різної оптичної густини поверхні з чітко видимими зернами всередині, значну кількість елементарних тілець біля і навколо них (рис. 183.2). Ще через сім діб інтенсивність відмивання ядерної речовини у сферопластах (зерен, елементарних тілець) суттєво підвищується (рис. 183.3). Це свідчить про персистенцію в макроорганізмі поодиноких мікобактерій у формі сферопластів, які здатні культивуватися (розмножуватися) на щільному живильному середовищі за 3 °С з відмиванням ядерної речовини (елементарних тілець).

Проведені наступні дослідження морфології трансформованих *M. bovis* цієї ж колонії протягом 14 діб виявили (рис. 183.4, 5) закономірні динамічні зміни, які характеризуються, поряд зі згаданими раніше морфологічними формами, збільшенням кількості елементарних тілець, утворенням ниткоподібних варіантів, у яких чітко спостерігаються зерна великі й дрібні та овалоподібні утворення з однаковою оптичною густиною поверхні, що звільнюються з них. У дослідях морфології мікобактерій цієї ж колонії на 42 добу культивування встановлено пухкість ниток з умістом зерен (рис. 183.6), які виштовхуються та трансформуються в L-форми (овальні утворення з різною оптичною густиною поверхні) й різке збільшення кількості субмікроскопічних й мікроскопічних, як і в попередні дослідження, неісоглотостійких елементарних тілець. Ці дані ще раз підтверджують, за умови дослідження в динаміці росту однієї колонії, яка сформувалася з однієї L-форми сферопластного типу,

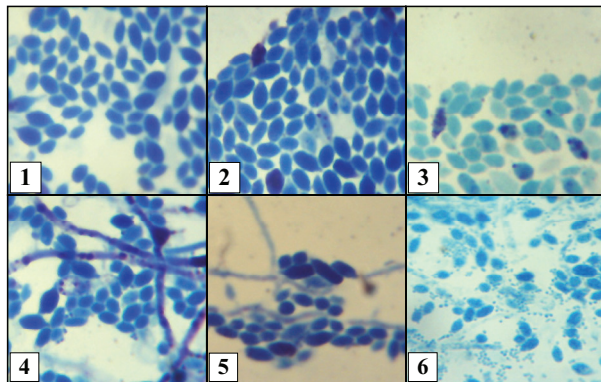


Рис. 183. Початкова й наступні стадії відмивання ядерної речовини у сферопластах *M. bovis* та утворення морфологічних форм: 1 – на 7; 2 – на 14; 3 – на 21; 4 – на 28; 5 – на 35; 6 – на 42 добу росту колоній (118 генерація 240 субкультура).

× 1600

що утворення сферопластів відбувається саме з ниткоподібних варіантів *M. bovis*, хоча поряд з цим в таких структурах відмішуються й зерна (елементарні тілця). Того ж часу наші дослідження не виявили чіткого механізму формування ниток, тобто з яких морфологічних форм вони утворюються. Швидше за все, можна тільки припустити, що з елементарних тілець, оскільки інших утво-

рень в досліджуваній колонії не виявлялося, а вони, елементарні тільця (ядерна речовина), відмішувалися в сферопластах: ниток до появи елементарних тілець в колонії не спостерігалось.

Отже, морфогенез *M. bovis* за різних умов довкілля (без індукуючих чинників на штучних живильних середовищах, у макроорганізмі тварини) характеризується різноманіттям. Проте можна беззаперечно стверджувати, що кінцевим етапом біологічного циклу розвитку вірулентного збудника туберкульозу є елементарні тільця, які дають початок розвитку різних морфологічних форм мікобактерій, у тому числі й дисоціантів.

Вочевидь підтверджена мінливість мікобактерій; їх біологічний цикл розвитку обґрунтовують сучасний методологічний підхід до встановлення штамових особливостей. У зв'язку з цими та іншими положеннями необхідно зазначити, що 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.

Найбільш показовим прикладом штамових відмінностей може бути BCG, 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 мутація генів, визначили можливість стверджувати одержання згаданими дослідниками штаму мікобактерій. Тобто не атенуйованого варіанта чи субштаму вихідного вірулентного штаму, а окремого штаму з відповідними властивостями. Тривале зберігання, відповідно багаторазові за різних умов пересиви в країнах світу, в які були доставлені селекціоновані Кальметтом та Гереном мікобактерії, сприяли появі нових штамів, що відрізняються від вихідного штаму BCG. За цього сучасні штами в тій чи іншій країні генетично поліморфні, за своєю морфологією, імуногенністю, вірулентністю та іншими властивостями, й тому суттєво різняться між собою: одні штами знизили імуногенність, інші набули певної вірулентності, 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.

На перший погляд все ясно та зрозуміло. Проте на тлі мутації чи модифікації генетичного коду мікроорганізмів штаму BCG за пасажів через штучне живильне середовище (що й визначає відмінності між штамми) відбувається конверсія в наступну морфологічну форму. Але як тоді можна стверджувати, що штам BCG є 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 дослідями з цього питання встановлено, що бактеріальна форма мікроорганізму штаму BCG однорідна 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* взагалі. Це зумовлено мутацією певних генів (у процесі пасажів, проведених Кальметтом і Гереном), що відповідають за конкретні властивості, й, напевно, вона не стосується біологічного циклу розвитку, а тільки вірулентності за збереження імуногенності. Наші досліді з цього приводу засвідчили, а деякі моменти підтверджені й іншими дослідниками, що передостанньою стадією біологічного циклу розвитку *M. bovis* взагалі є L-форми сферопластного, протопластного типів з різною оптичною густиною поверхні. 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 значить, і не ідентифікуються. Тобто якщо мікобактерії штаму BCG вибірково генетично мутовані, про що є багато повідомлень, то в макроорганізмі вони зберігають певну здатність змінюватися, принаймні морфологічно. Подібне виявляється і з іншими штамми.

Украй важливі 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.

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 типів, які в подальшому з однієї клітини на штучному живильному середовищі конвертують в ниткоподібні 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 досліді три місяці) виявлено розвиток інфекційного процесу туберкульозу, який ідентифікувався гістологічними дослідженнями біологічного матеріалу від них.

З'ясовуючи біологічні властивості швидкорослого високовірулентного штаму *M. bovis* (ріст колоній в перших субкультурах (генераціях) на 2–4 добу) у динаміці численних пересівів виявлено, 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. Це доводить, 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.

Паралельно з традиційними формами мікобактерій популяції перших генерацій утворюються й адаптивні їх варіанти (некислотостійкі палички та ниткоподібні форми). Відомо, що культури патогенних мікобактерій, які виділені з біологічного матеріалу реагуючої на ППД-туберкулін для свавців великої рогатої худоби одного господарства, мають різну вірулентність, що може свідчити про різні штами збудника туберкульозу, які циркулюють в 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 розмноження 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 виявлено поступове скорочення тривалості інфекційного процесу до 7'ятого пасажу, а в наступних – подовження, і вже на десятий пасаж патолого-анатомічно хвороба не виявлялася, але стан алергії збудник стимулював.

Такі результати прямих пасажів мікобактерій швидкорослого штаму через організм морських свинок, з однієї сторони, визначають особливості конкретного штаму, а з другої, 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.

У той самий час 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.

Поряд з цим, безумовно, на визначення штаму впливають і швидкість розмноження, і здатність культивуватися на середовищах. Саме тому традиційним вважається наявність повільнорослих й швидкорослих штамів, зокрема. Мікобактерії бичачого виду, штами, які культивуються на одних середовищах й не культивуються на інших (із натрієм саліциловокислим), свідчать про певні зміни в синтетазних системах, які відбулися внаслідок активізації одних й пригнічення інших генів мікроорганізму.

Явно, що такі особливості біологічної активності певних штамів пов'язані з хімічною будовою мікробної клітини. І це правомірно, оскільки 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. І, як свідчать дослідження, триразові прямі пасажі 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 в тих чи інших умовах. Проте фракції загальних ліпідів, незалежно від рівня їх загального вмісту, якісно стабільні, але кількісно динамічно змінюються, що, правда, не завжди із статистичною достовірністю. Це демонструє, що фракції ліпідів не можуть характеризувати відмінності штама мікобактерій.

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

Отже, детекція мікобактерій за вмістом ліпідів може свідчити про новий штам, оскільки мікобактерії з таким хімічним складом набувають й нових властивостей, непритаманних 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 такими чи іншими показниками. Звичайно, хімічний склад мікроорганізму безпосередньо зв'язаний з метаболізмом мікробної клітини, що визначає її біологічну активність у цілому та здатність проявляти (набувати) нову властивість, яка забезпечує виживання в довкіллі. Безпосередню участь у цих складних й донині ще остаточно нез'ясованих процесах беруть гени. Саме вони регулюють, активізуючись чи пригнічуючись, адаптивні процеси мікобактерій та визначають прояв необхідної здатності до виживання в тих чи інших умовах. На цьому тлі можуть з'являтися не ідентифіковані властивості: здатність розмножуватися за низьких плюсових температур, на простих живильних середовищах, з умістом різних індукуючих речовин.

Такі властивості мікобактерій, навіть за умови їх тимчасовості, можуть визначити специфічність штаму, оскільки ці мікроорганізми володіють досить

високою лабільною здатністю. Того ж часу змінена біологічна активність, здатність інтенсивно розмножуватися на простих живильних середовищах закріплюються досить стійко, бо протягом 140 пересівів через елективне живильне середовище вона не втрачається. 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 зазначають, 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 непритаманні патогенним мікобактеріям, натомість характерні атиповим.

Вочевидь, штамова особливість мікобактерій може визначатися й за можливістю 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 “джугути”.

Отже, деякі аспекти біологічних властивостей мікобактерій бичачого виду, досліджених у динаміці численних пересівів через штучне живильне середовище, організм морських свинок, свідчать про різноманітність та складність детекції штаму, особливо за умови біологічного циклу розвитку мікроорганізму. Морфологічні форми окремих стадій розвитку мають свої незвичайні біологічні властивості, свою активність у біологічному світі. За таких обставин нова субкультура, навіть з адаптивними морфологічними формами, одержана від материнського патогенного (різного ступеня вірулентності) штаму за деякими властивостями, 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.

Тому штамові відмінності необхідно визначати за наявністю певних специфічних біологічних властивостей конкретної популяції, раси мікобактерій (мікроорганізмів) субкультури незалежно від того, з якого джерела вони одержані.

Отримані результати досліджень, наведені в книзі, переконливо підтверджують необхідність перегляду сьогоденних методологічних підходів до системи профілактики, щоб пришвидшити і зробити ефективним викорінення туберкульозу тварин. Адже генетично закладена потенціальна здатність мікобактерій змінюватися до набуття нових властивостей, внаслідок активізації дрімаючих і переходу інших (відомих) діючих в дрімаючі, з одночасною втратою здатності культивуватися на звичайних елективних середовищах й відповідно неможливістю їх ідентифікації, постійно створює загрозу, й до того ж через синтез клітинної оболонки, реверсії змінених мікобактерій в патогенну форму збудника.

БІБЛІОГРАФІЧНИЙ СПИСОК

1. Адаптивна здатність мікобактерій щодо штучного живильного середовища з різним рН / О.А. Ткаченко, Г.І. Хільченко, М.В. Зеленська [та ін.] // Вет. медицина України. – 2004. – № 8. – С. 18–20.
2. 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.
3. Аспекти морфогенезу та біологічні властивості *M. bovis* дисоціативних форм за різних температур культивування / О.А. Ткаченко, І.М. Шендрик, В.В. Місків [та ін.] // Вісник Дніпропетр. держ. аграр. ун-ту. – 2013. – № 1(31). – С. 77–83.
4. 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.] // Ветеринарна медицина, міжвідомч. темат. науковий збірник. – 2013. – № 97 – С. 143–144.
5. 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.
6. 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: Вет. науки. – С. 85–90.
7. Біологічна активність епізоотичних та музейних штамів *M. bovis* / О.А. Ткаченко, Н.Г. Усєєва, В.В. Глебенюк [та ін.] // Наук. вісник Львів. нац. ун-ту ім. С.З. Ґжицького. – 2007. – № 3(34), ч. 1, т. 9. – С. 218–224.
8. Біологічна активність мікобактерій і резервна лужність живильного середовища / О.А.Ткаченко, М.І. Орлов, В.Ю. Хозей [та ін.] // Наук. вісник Львів. держ. акад. вет. медицини ім. С.З. Ґжицького. – 2001. – Вип. 3, т. 3 (№ 4). – С. 107–115.
9. 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.
10. 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.
11. Біологічні властивості збудника туберкульозу птиці, виділеного від курей Степової зони України / О.А. Ткаченко, В.В. Зажарський А.О. Шеремета [та ін.] // Збірник наук. праць Луган. НАУ. – 2011. – № 31. – С. 207–212.
12. Биологические свойства *Mycobacterium bovis*, диссоциативных L- и других форм при различных температурах культивирования / А.А. Ткаченко, И.Н. Шендрик, В.В. Мискив, А.В. Ковалёв, М.В. Билян // “Экология и животный мир”: Междун. научно-практический журнал. – Минск, 2013. – № 2. – С. 24–31.

13. Біологічні властивості дисоціативних L- та інших форм *Mycobacterium bovis* / О. Ткаченко, П. Давиденко, В. Зажарський [та ін.] // Вісник Дніпропетр. університету. Біологія, екологія. – 2016. – № 24(2). – С. 338–346.

14. Біохімічний склад швидкорослого штаму *M. bovis* в залежності від тривалості пасажування / О. Ткаченко, В. Бусол, М. Зеленська [та ін.] // Вет. медицина України. – 2006. – № 2. – С. 20–22.

15. Вейсфейлер Ю. Биология и изменчивость микобактерий туберкулеза и атипичных микобактерий / Ю. Вейсфейлер. – Будапешт: Изд-во АН Венгрии. – 1975. – 336 с.

16. Влияние температур культивирования *M. bovis* диссоциативных форм на морфологические признаки и тинкториальные свойства / О.А. Ткаченко, В.В. Зажарский, Н.В. Алексеева [и др.] // Материалы науч.-практ. конф.: “Аграрная наука – основа успешного развития АПК и сохранения экосистем”, (г. Волгоград, февраль 2012 р.). – Т. 2. – С. 205–208.

17. Внутрішньовенна туберкулінова проба: ефективність використання / О.А. Ткаченко, Г.І. Хільченко, М.В. Зеленська [та ін.] // Наук. вісник Львів. держ. акад. вет. медицини ім. С.З. Гжицького. – Львів, 2002. – Т. 4(2), ч. 5. – С. 80–85.

18. Вплив пасажування на біохімічний склад епізоотичного швидкорослого штаму *M. bovis* / О.А. Ткаченко, М.В. Зеленська, Г.І. Хільченко [та ін.] // Вісник Дніпропетр. держ. аграр. ун-ту. – 2005. – № 2. – С. 158–160.

19. 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 природ. ресурсів України, Вінницький національний техн. ун-т та ін., 2011. – Т. 2. – С. 485–488.

20. Давиденко П.О. Ліпідний склад, сенсibiliзуючі та вірулентні властивості *M. bovis* швидкорослого штаму за багаторазового пасажування на щільному живильному середовищі з рН 7,1 / П.О. Давиденко, М.В. Білан, О.А. Ткаченко // Матеріали міжнар. наук.-практ. конф., присвяч. 50-річчю заснування Інституту епізоотології УААН “Епізоотологічний моніторинг та системи ліквідації хвороб тварин”, (Рівне, 25–27 листопада 2009 р.) / М-во аграр. політики, Інст-т біології тварин, ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок. – Львів: наук.-техн. бюлетень Інституту біології тварин і ДНДКІ ветпрепаратів та кормових добавок, 2009. – Вип. 10. – № 4. – С. 124–129.

21. Давиденко П.О. Сенсibiliзуювальні, вірулентні властивості та ліпідний склад *M. bovis*, багаторазово пасажованих через щільне живильне середовище з рН 7.1 / П.О. Давиденко, М.В. Білан, О.А. Ткаченко // Вет. медицина України. – 2010. – № 2. – С. 20–22.

22. Деякі морфологічні особливості реверсійної здатності *M. bovis* / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, В.В. Зажарський [та ін.] // Вісник Дніпропетр. держ. аграр. ун-ту. – 2009. – № 2. – С. 130–135.

23. Дослідження швидкоростучого штаму *M. bovis* / О.А. Ткаченко, Г.І. Хільченко, М.В. Зеленська [та ін.] // Вісник Дніпропетр. держ. аграр. ун-ту. – 2004. – № 1. – С. 85–90.

24. Економічні збитки від туберкульозу великої рогатої худоби в Україні / О.А. Ткаченко, В.В. Зажарський, Н.В. Алексеєва [та ін.] // Вет. медицина України. – 2013. – № 1. – С. 6–10.

25. 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.

26. Закономірність морфологічних ознак та тинкторіальних властивостей *M. bovis* дисоціативних форм від температури культивування / О.А. Ткаченко, В.В. Зажарський, Н.В. Алексеєва, В.В. Місків, А.В. Ковальов // Науковий вісник Луганського національного аграрного університету. – Луганськ: Елтон-2. – 2011. – № 31. – С. 212–216.

27. Залежність адаптивної здатності *M. bovis* від впливу гідрогумату / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, Л.О. Ковальова [та ін.] // Вет. медицина України. – 2008. – № 7. – С. 30–33.

28. Залежність біохімічного складу швидкоростучого штаму *M. bovis* від рН штучного живильного середовища / О.А. Ткаченко, Л.О. Ковальова, Л.В. Кравцова [та ін.] // Вісник Дніпропетр. держ. аграр. ун-ту. – 2005. – № 1. – С. 77–81.

29. Залежність репродуктивної здатності атипичних мікобактерій від рівня неспецифічних захисних систем організму великої рогатої худоби. // Л.С. Короленко, В.О. Бусол, Н.Г. Драган [та ін.] // Вісник аграр. науки. – 1998. – Спец. випуск, січень. – С. 52–54.

30. Земскова З.С. Скрытопротекающая туберкулёзная инфекция / З.С. Земскова, И.Е. Дорожкова. – М.: Медицина, 1984. – 221 с.

31. Кейтс М. Техника липидологии. Выделение, анализ и идентификация липидов / М. Кейтс. – М.: Мир, 1975. – 322 с.

32. Контамінація тваринницьких об'єктів степової зони України збудником туберкульозу великої рогатої худоби / Г.І. Хільченко, О.А. Ткаченко, Л.С. Короленко // Вет. медицина України. – 2006. – № 3. – С. 33–35.

33. 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.

34. Ліпіди та пасажування швидкорослого штаму *M. bovis* / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, Л.В. Кравцова [та ін.] // Вет. науки: зб. наук. праць ЛНАУ, присвячений 10-річчю заснування факультету вет. медицини. – Луганськ, 2007. – № 78/101. – С. 237–241.

35. 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.

36. Ліпідний склад *M. bovis* тривало пасажованого швидкорослого штаму / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, Л.О. Ковальова [та ін.] // Наук. вісник Львів. нац. ун-ту ім. С.З. Гжицького. – 2008. – № 2(37), т. 10, ч. 1. – С. 353–357.

37. Ліпідний склад *M. bovis* за тривалого пасажу швидкорослого штаму на щільному живильному середовищі з рН 6,5/ О.А. Ткаченко, М.В. Білан, Л.О. Ковальова [та ін.] // Вет. медицина України. – 2009. – № 4. – С. 34–36.

38. L-форми мікобактерій туберкулеза / под. ред. З.Н. Кочемасовой. – М.: Медицина, 1980. – 165 с.

39. Морфологічні особливості реверсії невисотостійких *M. bovis* в бактеріальну висотостійку форму. / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, П.О. Давиденко [та ін.] // Вет. медицина України. – 2009. – №. 6 – С. 28–30.

40. Особливості внутрішньовенної туберкулінової проби при туберкульозі та мікобактеріозній інфекції великої рогатої худоби / О.А. Ткаченко, Г.І. Хільченко, М.В. Зеленська [та ін.] // Вет. медицина України. – 2003. – № 12. – С. 15–17.

41. Особливості культуральних, тинкторіальних та морфологічних ознак *M. bovis* дисоціативних форм, культивованих на простих живильних середовищах / О.А. Ткаченко, О.М. Кулішенко, А.В. Ковальов, О.С. Галатюк // Вісник Житомирського національного агроєкологічного університету. – 2012. – № 1(32). – Т. 3, ч. 1. – С. 222–228.

42. Пат. 68635 Україна МПК С 12 N 1/20, С 12 Q 1/02, G 01 N 33/569. Спосіб культивування *M. bovis* конверсованих форм за температури 3 °С / Ткаченко О.А., Білан М.В., Давиденко П.О. [та ін.]; заявник та власник Дніпропетровський держ. аграрний ун-т. – № u 201106946; заявл. 02.06.11; опубл. 10.04.12; Бюл. № 7.

43. Пат. на кор. мод. 28293 Україна, МКІ С 12 N 1/00. Живильне середовище для культивування мікобактерій / Ткаченко О.А., Кулішенко О.М. – № u 2007 03306; заявл. 27.03.2007; опубл. 10.12.2007, Бюл. № 20.

44. Пат. 93722 Україна МПК C07D 249/00 A 61K 31/00 “Похідне 3-тіо-1,2,4-триазолу, що проявляє туберкулостатичну дію” / Панасенко О.А., Книш Є.Г., Саліонов В.О., Ткаченко О.А., Зажарський В.В., Давиденко П.О., Білан М.В.; заявник та власник Панасенко О.А., Книш Є.Г., Саліонов В.О., Ткаченко О.А., Зажарський В.В., Давиденко П.О., Білан М.В. – № u 201405269; заявлено 19.05.2014; опубл. 10.10.2014; Бюл. № 19. – 6 с.

45. 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.

46. Практикум з ветеринарної вірусології: навч. посібник / О.А. Ткаченко, Г.І. Хільченко, Л.В. Кравцова, М.В. Зеленська. – К.: Вища освіта, 2005. – 208 с.

47. Проблема атипичних мікобактерій і зумовленої ними мікобактеріозної інфекції. Теоретико-експериментальні дані / О.А. Ткаченко, В.Ю. Хозей, М.І. Орлов [та ін.] // Вет. медицина України. – 1999. – № 3. – С. 26–27.

48. Ретроспективний аналіз фактичного економічного збитку від туберкульозу великої рогатої худоби / О.А.Ткаченко, В.В. Зажарський, Н.В. Алексєєва [та ін.] // Наук. вісник ветеринарної медицини Білоцерківського НАУ. – 2012. – № 9(92). – С. 173–178.

49. Сенсibiliзувальні, вірулентні властивості та ліпідний склад *M. bovis*, багаторазово пасажованих через щільне живильне середовище з рН 7,1 / О.А. Ткаченко, М.В Білан [та ін.] // Вет. медицина України. – 2010. – № 2 – С. 20–22.

50. Система комплексних науково обґрунтованих заходів профілактики та боротьби з туберкульозом великої рогатої худоби – службі ветеринарної медицини. УВМ Дніпропетровської облдержадміністрації / О.А. Ткаченко, М.И. Орлов, Л.В.Кравцова, О.Є. Дорошенко // Дніпропетр. держ. агр. ун-т. – Дніпропетровськ, 1996. – 48 с.

51. Сучасні методи діагностики та профілактики туберкульозу / О.А. Ткаченко, Г.І. Хільченко, М.В. Зеленська [та ін.] // Вет. медицина: міжвідомч. тем. наук. зб. – 2002. – Вип. 80. – С. 196–198.

52. Ткаченко А.А. Парааллергические реакции на туберкулин / А.А. Ткаченко // Ветеринария, 1985. – № 4. – С. 29–31.

53. Ткаченко О.А. Динамика некоторых иммунобиологических и бактериологических показателей при микобактериозе и туберкулезе / О.А. Ткаченко, В.А. Матузенко, В.А. Бусол // Материалы науч.-практ. конф.: “Основные научные исследования по проблеме туберкулеза и бруцеллеза с.-х. животных, профилактика и организация мероприятий по ликвидации болезней в регионе Сибири” (г. Новосибирск, 12–13 июля 1995 г.) / РАСХН. Сиб. отд.-ние ИЭВС и ДВ. – С. 45–46.

54. Ткаченко О.А. Некоторые аспекты иммуногенеза микобактериоза крупного рогатого скота. / О.А. Ткаченко, М.В. Шевців // Материалы науч.-практ. конф.: “Основные научные исследования по проблеме туберкулеза и бруцеллеза с.-х. животных, профилактика и организация мероприятий по ликвидации болезней в регионе Сибири” (г. Новосибирск, 12–13 июля 1995 г.) / РАСХН. Сиб. отд.-ние ИЭВС и ДВ. – Новосибирск, 1995. – С. 29–30.

55. Ткаченко О.А. Вивчення деяких імунобіологічних показників крові у різновікової реагуючої та не реагуючої на ППД-туберкулін для ссавців великої рогатої худоби. / О.А. Ткаченко, Л.С Короленко // Матер. науч.-практ. конф.: “Вет. та зоотехн. проблеми у Придніпровському регіоні” (м. Дніпропетровськ, березень 1996 р.) / Дніпропетр. держ. агр. ун-т – С. 62.

56. Ткаченко О.А. Вивчення ступеня та широти розповсюдження мікобактеріозу великої рогатої худоби в господарствах України / О.А. Ткаченко // Матер. науч.-практ. конф.: “Вет. та зоотехн. проблеми у Придніпровському регіоні” (м. Дніпропетровськ, березень 1996 р.) / Дніпропетр. держ. агр. ун-т. – С. 64.

57. Ткаченко О.А. Частота виділення атипівих мікобактерій із проб зовнішнього середовища / О.А. Ткаченко // Матер. науч.-практ. конф.: “Ветеринарні та зоотехнічні проблеми у Придніпровському регіоні” (м. Дніпропетровськ, березень 1996 р.) / Дніпропетр. держ. агр. ун-т. – С. 78–79.

58. Ткаченко О. Епізоотологічне обґрунтування механізму адаптації атипівих мікобактерій до організму великої рогатої худоби / О. Ткаченко // Вет. медицина України. – 1997. – № 7. – С. 22–24.

59. Ткаченко О. Поширення та напруженість епізоотичного процесу мікобактеріозів / О. Ткаченко // Вет. медицина України. – 1997. – № 6. – С. 12–14.

60. Ткаченко О.А. Тропізм мікобактерій та його обумовленість фактором Х5 живильного середовища / О.А. Ткаченко // *Вет. медицина України*. – 1997. – № 12. – С. 16–17.
61. Ткаченко О.А. Специфічність та активність туберкулінів при діагностиці туберкульозу великої рогатої худоби / О.А. Ткаченко, Л.С. Короленко // *Вет. медицина України*. – 1998. – № 7. – С. 12–13.
62. Ткаченко О. Удосконалене живильне середовище Левенштейна-Йєнсена для культивування мікобактерій / О. Ткаченко // *Вет. медицина України*. – 1998. – № 8. – С. 19.
63. Ткаченко О.А. Характеристика показників неспецифічної резистентності у різновікового поголів'я окремих видів тварин / О.А. Ткаченко // *Вісник БДАУ: зб. наук. праць*. – Біла Церква, 1998. – Вип. 4, ч. 1. – С. 124–127.
64. Ткаченко О.А. Економічні збитки від туберкульозу великої рогатої худоби / О.А. Ткаченко // *Вет. медицина України*. – 1999. – № 2. – С. 22–23.
65. Ткаченко О.А. Туберкульоз і мікобактеріозна інфекція великої рогатої худоби: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора вет. наук: спец. 16.00.08 “Епізоотологія та інфекційні хвороби” / О.А. Ткаченко. – К., 1999. – 36 с.
66. Ткаченко О. Епізоотологічні паралелі та особливості прояву туберкульозу і мікобактеріозної інфекції великої рогатої худоби / О. Ткаченко, Н. Драган, О. Мігур // *Вет. медицина України*. – 1999. – № 10. – С. 17–19.
67. Ткаченко О. Проблема атипичних мікобактерій і зумовленої ними мікобактеріозної інфекції / О. Ткаченко // *Вет. медицина України*. – 1999. – № 3. – С. 26–27.
68. Ткаченко О.А. Приховано перебігаюча мікобактеріозна інфекція великої рогатої худоби, обумовлена атипичними мікобактеріями / О.А. Ткаченко // *Вісник Дніпропетр. держ. аграр. ун-ту*. – 2001. – № 2. – С. 92–96.
69. Ткаченко О.А. Частота виділення мікобактерій від реагуючих на туберкулін тварин та інтенсивність епізоотичного процесу / О.А. Ткаченко, М.І. Орлов, В.Ю. Хозей / *Наук.-техн. бюлетень Ін-ту біології тварин присвячений 40-річчю створення ін-ту*. – Львів, 2001. – Вип. 1–2. – С. 184–187.
70. Ткаченко О.А. Характеристика причин тривалого епізоотичного процесу туберкульозу великої рогатої худоби / О.А. Ткаченко, Л.О. Ковальова // *Вісник Дніпропетр. держ. аграр. ун-ту*. – Дніпропетровськ, 2002. – № 1. – С. 72–74.
71. Ткаченко О.А. Ступінь персистенції атипичних мікобактерій в організмі великої рогатої худоби. / О.А. Ткаченко // *Матер. науч.-практ. конф.: “Вет. та зоотехн. проблеми у Придніпровському регіоні”* (м. Дніпропетровськ, березень 1996 р.) / Дніпропетр. держ. агр. ун-т. – С. 92.
72. Ткаченко О.А. Внутрішньошкірна туберкулінова проба, актуальні питання та деякі напрямки їх вирішення / О.А. Ткаченко // *Вет. медицина України*. – 2002. – № 1. – С. 11–12.
73. Ткаченко О.А. Епізоотичний процес туберкульозу великої рогатої худоби. Причини тривалості / О.А. Ткаченко // *Наук. праці Полтав. держ. аграр. акад.* – Т. 2(21): *Вет. науки*. – Полтава, 2002. – С. 218–220.

74. Ткаченко О.А. Ефективність методу збагачення передпосівного матеріалу та епізоотологічна доцільність його використання при діагностиці туберкульозу / О.А. Ткаченко // Вет. медицина України. – 2002. – № 6. – С. 9–12.

75. Ткаченко О.А. Швидкоростучі *M. bovis* у проблемі туберкульозу / О.А. Ткаченко // Вет. медицина України. – 2004. – № 8. – С. 15–17.

76. Ткаченко О.А. Вплив рН штучного живильного середовища на біохімічний склад швидкорослого штаму *M. bovis* / О.А. Ткаченко // Вет. медицина України. – 2005. – № 9. – С. 15–17.

77. 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.

78. 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.

79. Ткаченко О.А. Вільні жирні кислоти – фактори патогенності *M. bovis* / О.А. Ткаченко, М.В. Зеленська, Л.О. Ковальова // Збірник наук. праць Луган. нац. ун-ту “Вет. Науки”. – Луганськ, 2007. – № 78/101. – С. 613–620.

80. Ткаченко О.А. Вплив гідрогумату на швидкість росту атіпових мікобактерій / О.А. Ткаченко, О.М. Кулішенко // Вісник Дніпропетр. держ. аграр. ун-ту. – 2007. – № 2. – С. 86–88.

81. Ткаченко О.А. Вплив пасажу через морських свинок на біологічну активність та ліпідний склад *M. bovis* швидкорослого штаму / О.А. Ткаченко, В.В. Глебенюк // Наук. вісник Львів. нац. ун-ту вет. медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького. – Львів, 2008. – № 2(37), т. 10, ч. 2. – С. 276–281.

82. Ткаченко О.А. Вплив температури культивування на вірулентність мікобактерій / О.А. Ткаченко, В.В. Глебенюк // Вісник Дніпропетр. держ. аграр. ун-ту. – 2008. – № 2. – С. 112–114.

83. Ткаченко О.А. Динаміка ліпідів *M. bovis* авірулентного штаму / О.А. Ткаченко, П.О. Давиденко, М.В. Білан // Наук.-техн. бюлетень ін-ту біології тварин і держ. наук.-досл. контрольного ін-ту ветпрепаратів та корм. добавок. – Львів, 2009. – Вип. 10. – № 4. – С. 206–211.

84. Ткаченко О.А. Характеристика вільних жирних кислот *M. bovis* / О.А. Ткаченко, Л.О. Ковальова // Актуальні проблеми сучасної вет. медицини: [збірн. наук. праць Харків. держ. зоовет. акад.]. – Харків: РВВ ХДЗВА., 2008. – Вип. 16(41), т. 1, ч. 2. – С. 52–57.

85. Ткаченко О.А. Ліпідний склад *M. bovis* тривало пасажованого швидкорослого штаму / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, В.В. Глебенюк // Наук. вісник Львів. нац. ун-ту вет. медицини та біотехнологій ім. С.З. Гжицького. – Львів, 2008. – № 2(37), т. 10, ч. 1. – С. 353–357.

86. Ткаченко О.А. Закономірності поліморфізму та мінливості *M. bovis* швидкорослих та повільнорослих штамів / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, Л.О. Ковальова [та ін.] // Вісник Дніпропетр. держ. аграр. ун-ту. – 2009. – № 1. – С. 94–99.

87. Ткаченко О.А. Ліпідний склад, сенсibiliзуючі та вірулентні властивості *M. bovis* швидкорослого штаму за багаторазового пасажування на щіль-

ному живильному середовищі з рН 7,1. / О.А. Ткаченко, М.В Білан, П.О. Давиденко // Наук.-техн. бюлетень ін-ту біології тварин і держ. наук.-дослідн. контрольного ін-ту ветпрепаратів та корм. добавок. – Львів, 2009. – Вип. 10. – № 4. – С. 124–130.

88. Ткаченко О.А. Вплив температури культивування на ліпідний склад *M. bovis* дисоціативних форм, пасажованих через середовище з рН 7.1 / О.А. Ткаченко, П.О. Давиденко // Вісник Дніпропетр. держ. аграр. ун-ту. – 2011. – № 1. – С. 139–143.

89. Ткаченко О.А. Корд-фактор та вірулентність *Mycobacterium bovis* швидкорослого штаму та агипових мікобактерій / О.А. Ткаченко, В.В. Зажарський, В.В. Глебенюк // Ветеринарна медицина України. – 2012 – № 10. – С. 10–13.

90. Ткаченко О.А. Особливості перебігу туберкульозу птиці при застосуванні гумінових речовин / О.А. Ткаченко, О.О. Єфімова, В.Г. Єфімов // Вет. медицина України. – 2012. – № 10. – С. 14–16.

91. Ткаченко О.А. Біологічний цикл розвитку *Mycobacterium bovis* / О.А. Ткаченко // Вет. медицина України. – 2014. – № 10. – С. 15–20.

92. Ткаченко О.А. Фільтривні форми у біологічному циклі розвитку дисоціативних *Mycobacterium bovis* / О.А. Ткаченко, Н.В. Алексеева, В.В. Зажарський // Науково-технічний бюлетень НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК. – Дніпропетровськ, 2015. – Т. 3, № 2. – С. 78–84.

93. Ткаченко О.А. Методологічні засади визначення штамових особливостей (теоретико-експериментальні дані) / О.А. Ткаченко / Науково-технічний бюлетень НДЦ біобезпеки та екологічного контролю ресурсів АПК. – 2016. – Т. 4, № 4. – С. 6–12.

94. Ткаченко О.А. Ефективність полімеразної ланцюгової реакції за детекції дисоціативних варіантів *Mycobacterium bovis* швидкорослого штаму / О.А. Ткаченко, В.В. Глебенюк, О.Г. Глебенюк // Науковий вісник Львівського НУВМ та БТ ім. С.З. Гжицького. – 2016. – № 1(65), т. 18. – С. 185–189.

95. Туберкулез животных и меры борьбы с ним / под ред. Ю.А. Кассича. – К.: Урожай, 1990. – 304 с.

96. Туберкулез сельскохозяйственных животных / под ред. В.П. Шишкова, В.П. Урбана. – М.: Агропромиздат, 1991. – 255 с.

97. Характеристика деяких біологічних властивостей мікобактерій, виділених від морських свинок / В.В. Глебенюк, О.А. Ткаченко, В.В. Зажарський [та ін.] // “Проблеми зооінженерії та ветеринарної 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: Вет. науки. – С. 52–57.

98. 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.

99. Variable virulence and efficacy of bcg vaccine strains in mice and correlation with genome polymorphisms / Lu Zhang, Huan-weiRu, Fuzeng Chen [et al.] // Molecular Therapy. – 2016. – Vol. 24, № 2. – P. 398–405.



ТКАЧЕНКО Олексій Андрійович

Учений-епізоотолог народився 28 березня 1952 р. в селянській сім'ї в м. Звенигородка Черкаської області, де й отримав атестат про середню освіту.

Відслуживши армію і закінчивши ветеринарний факультет Білоцерківського сільськогосподарського інституту в 1977 році, за направленням працював ветеринарним лікарем районної ветстанції в м. Сарни Рівненської області, потім у м. Рівне – по боротьбі з хворобами тварин; напочатку ветеринарним лікарем відділу санітарії, а потім (1978–1984 рр.) – начальником протиепізоотичного загону по боротьбі з туберкульозом тварин. У 1984 році вступив до аспірантури денної форми навчання при кафедрі епізоотології та інфекційних хвороб ветеринарного факультету Білоцерківського сільськогосподарського інституту. По закінченні працював науковим співробітником лабораторії епізоотології Рівненської науково-дослідної ветеринарної станції (1988–1992 рр.). Тепер – Дослідна станція епізоотології НААН.

З 1992 року й дотепер працює у Дніпропетровському державному аграрно-економічному університеті на факультеті ветеринарної медицини: спочатку старшим викладачем, доцентом, з 1994 р. – завідувачем кафедри епізоотології та інфекційних хвороб.

Кандидатську дисертацію “Епізоотологія туберкульозу крупного рогатого скота в умовах спеціалізації по виробництву продуктів животноводства” захистив у 1988 році (науковий керівник – доктор ветеринарних наук, професор В.О. Бусол), отримав звання доцента у 1995 році. Докторську дисертацію захистив у 1999 році на тему “Туберкульоз і мікобактеріозна інфекція великої рогатої худоби” (теоретико-експериментальні дані). Отримав звання професора у 2002 році.

Читає курс “Епізоотологія та інфекційні хвороби” студентам факультету ветеринарної медицини. Наукова діяльність пов'язана з дослідженнями епізоотології та інфекційного процесу туберкульозу, мікобактеріозної інфекції, біологічних

властивостей видів мікобактерій та розробкою й удосконаленням методів бактеріологічної і прижиттєвої діагностики мікобактеріальних інфекцій великої рогатої худоби, а також удосконаленням заходів профілактики та боротьби. Він уперше виділив та вивчив головні властивості особливих швидкорослих патогенних штамів *M. bovis*. Встановив біологічний цикл розвитку мікобактерій і його особливості за температур 3 і 37 °С культивування. Селекціонував чотири імуногенних штами збудника туберкульозу та інтенсивно працює над конструюванням протитуберкульозної вакцини.

Опублікував понад 200 наукових і науково-методичних робіт, у т. ч. два підручники; “Практикум з ветеринарної вірусології” (2005); навчальні посібники: “Лабораторна діагностика туберкульозу тварин” (2010); “Інфекційні хвороби овець та кіз” (2012).

Чотири розробки ввійшли в Інструктивні положення з профілактики та боротьби з туберкульозом тварин, дві з яких стосуються діагностики, дві – спеціальних заходів.

Має п'ять авторських свідоцтв на винаходи.

Олексій Андрійович є членом редакційної колегії фахових журналів та спеціалізованої ради зі захисту дисертацій.

Під його науковим керівництвом захищено 8 кандидатських дисертацій, ведеться підготовка двох докторантів.

Нагороджений бронзовою медаллю ВДНГ СРСР (1984 р.), “Знаком Пошани” (2003 р.).

Олексій Андрійович – представник славної династії ветеринарних лікарів, започаткованої Ткаченком Андрієм Васильовичем (ветеринарний фельдшер), яка в цій номінації 2012 року посіла перше місце. Серед 19 лікарів династії (у тому числі дружина, донька) 16 закінчили ветеринарний факультет БНАУ, два доктори ветеринарних наук, професори, три кандидати наук.

НАУКОВЕ ВИДАННЯ

Олексій Андрійович ТКАЧЕНКО

**МІНЛИВІСТЬ
*MYSOBACTERIUM BOVIS***

МОНОГРАФІЯ

1 том

Редактор: *М.П. Гончаренко*
Комп'ютерна верстка: *В.О. Олексенко*

Редакційно-видавничий відділ
Дніпровського державного аграрно-економічного університету
вул. С. Єфремова, 25, м. Дніпро, 49600
Телефони: (056) 713-51-75, 745-53-76
E-mail: redviddday@i.ua, info@dsau.dp.ua
Web: www.dsau.dp.ua, ojs.dsau.dp.ua

Підписано до друку 03.11.2016. Формат 60×84/16
Обл.-вид. арк. 31,82. Ум.-друк. арк. 29,61.
Папір крейдований

Видавництво