

УДК 619:612.1:619.616.98

Турко І.Б., к.б.н., доцент**Куляба О.В.**, асистент**Семанюк В.І.**, к.б.н., професор**Пелень Р.А.**, к.в.н., доцент*Львівський національний університет ветеринарної медицини та біотехнологій
імені С.З.Гжицького*

ЦИРКУЛЯЦІЯ АТИПОВИХ МІКОБАКТЕРІЙ В ЗОВНІШНЬОМУ СЕРЕДОВИЩІ ТА ОРГАНІЗМІ ТВАРИН, ЯК ПРИЧИНА ПОЗИТИВНИХ АЛЕРГІЧНИХ РЕАКЦІЙ.

*Встановлено тісний корелятивний зв'язок між циркуляцією *Mycobacterium bovis*, атипових швидкоростучих мікобактерій IV групи та атипових нехромогенні мікобактерій III групи за класифікацією Раньона в зовнішньому середовищі та організмі тварин. Сприйнятливість тварин до контамінації мікобактеріями визначалась особливостями білкового статусу організму.*

Ключові слова: велика рогата худоба, докільля, ґрунт, мікобактерії, сироватка крові, білки.

Вступ. Мікобактеріози великої рогатої худоби, в тому числі і туберкульоз – захворювання, які широко розповсюджені у світі і боротьба з ними вимагає значних затрат. Сприяють виникненню і поширенню інфекції такі фактори як поява фармакорезистентних форм збудників, наявність мікобактерій у навколишньому середовищі, стійлове утримання та інші. Провідною концепцією заходів з ліквідації туберкульозу є спростування діагнозу на туберкульоз у тому випадку, коли сенсibiliзацію тварин до туберкуліну зумовили непатогенні мікобактерії.

Метою роботи було встановлення причин позитивного реагування тварин в алергічній діагностиці на туберкульоз, вивчення впливу атипових та патогенних мікобактерій на метаболічні процеси в організмі та встановлення зв'язку між циркуляцією мікобактерій в зовнішньому середовищі та організмі тварин.

Матеріал і методи. Об'єктом дослідження були корови, які позитивно реагували на введення туберкуліну, змиви з об'єктів докільля та проби ґрунту.

З метою встановлення кількості тварин інфікованих мікобактеріями усе поголів'я було піддане алергічному дослідженню на туберкульоз, з наступним забоем позитивно реагуючих тварин, оцінкою паткартини та відбором проб для бакдосліджень, з метою виділення чистих культур мікобактерій та подальшої їх ідентифікації. Аналогічні дослідження проводили з пробами ґрунту та докільля.

За результатами лабораторних досліджень було сформовано наступні групи:

- контрольна група, яку формували тварини з негативною алергічною пробою;
- I дослідна група утворена тваринами, з організму яких виділяли атипові мікобактерії;
- II дослідна група складалась з тварин, з організму яких виділяли патогенні мікобактерії.

Перед забом тварин проводився відбір крові з метою подальшого дослідження вмісту у сироватці крові метаболітів білкового обміну, який в значній мірі обумовлює імунітет, а саме:

- 1) загальний білок визначили рефрактометрично;
- 2) білкові фракції визначали методом електрофорезу в агаровому і поліакриламідному гелях;
- 3) загальну кількість імуноглобулінів визначали радіальною імунодифузєю за Манчіні

Результати досліджень. За результатами алергічних досліджень корів було виділено 11 позитивно-реагуючих тварин. Після забою позитивно реагуючих тварин характерних для туберкульозу казеозно-некротичних уражень не були встановлено у жодної з тварин. Проте у відібраному матеріалі ідентифікували атипові та патогенні мікобактерії.

У результаті бактеріологічного дослідження було виділено 20 чистих культури кислотостійких, грампозитивних, не рухливих паличкоподібних мікроорганізмів (таблиця 1), що не утворювали спори та капсули.

Таблиця 1

Основні морфологічні та тинкторіальні властивості виділених мікобактерій

№ груп культур	Фарбування		Форма мікроорганізмів	Особливості форми та угруповання	зернистість	спори	капсули	рухливість
	За Грамом	За Ціль-Нільсеном						
1	+	Кислото-стійкі	Палички	поодинокі, групами товсті, короткі мікроорганізми	+	-	-	-
2	+	Кислото-стійкі	Палички	поодинокі овоїдні, веретеноподібні, гілчаті мікроорганізми	-	-	-	-
3	+	Кислото-стійкі	Палички	поодинокі невеликі кокоподібні мікроорганізми	-	-	-	-

Мікобактерії мікробних культур:

- № 1, 8, 12, 14, 18 розташовувались в мазках поодинокі або групами у вигляді товстих коротких паличок (1 група),
- № 2, 4, 6, 10, 13, 15, 20 – поодинокі у вигляді овоїдів, веретеноподібних мікроорганізмів з відгалуженнями (2 група),
- № 3, 5, 7, 9, 11, 16, 17, 19 – поодинокі у формі кокоподібних мікроорганізмів (3 група).

Слід відмітити, що для мікроорганізмів 1 групи була властива чітко виражена зернистість цитоплазми.

Проведений поділ мікроорганізмів на три групи на підставі морфологічних та тинкторіальних властивостей знайшов своє підтвердження і в результатах дослідження культуральних властивостей (таблиця 2). Так найдовший період культивування був властивий мікроорганізмам 1 групи, що тривав 45-50 днів. Другою за продовженістю культивування була 3 група мікроорганізмів, період появи колоній яких становив 14-16 днів. Найкоротшим періодом культивування 5-6 днів характеризувалась 2 група мікроорганізмів. Такий розподіл терміну культивування дає підставу припустити, що мікобактерії 1 групи відносяться до патогенних, а 2 та 3 – до атипичних

Таблиця 2

Основні культуральні властивості виділених мікобактерій

№ груп культур	Швидкість росту (доби)	Характер росту на середовищі Левенштейна-Йенсена	Пігментоутворення	Ріст на яєчних середовищах (°C)			МПА, МПА при 37°C	Середовище із аліцлатом Na	Середовище із NaCl	Середовище з жовцю	Каталазна активність (шар піни в мм)
				20-22	37-38	45					
1	45-50	Сухі, дрібні, зернисті. кулясті колонії	Сіро-білий	-	+	-	-	-	-	+	4-10
2	5-6	Шороховаті з нерівними краями колонії	Оранжевий	+	+	+	+	+	+	-	50-53
3	10-14	Гладкі, блискучі, з рівними краями колонії	-	+	+	+	+	+	+	-	62-66

В підтвердження нашого припущення за результатами культивування на середовищі Левенштейна-Йенсена досліджувані мікробні культури теж можна було розділити на три групи, а саме:

- перша група характеризувалась утворенням сухих дрібних зернистих, кулястих колоній, що утворювали сіро-білий пігмент;
- другій групі були властиві шороховаті колонії з нерівними краями оранжевого забарвлення;
- третя група утворювала гладкі блискучі з рівними краями безпігментні колонії.

Таким чином, за результатами морфологічних, тинкторіальних та культуральних досліджень можна припустити, що культури 1 групи мікроорганізмів були утворені *Mycobacterium bovis*.

З метою подальшої ідентифікації оцінювався ріст в різних температурних умовах та на диференційних середовищах, що підтверджує наше припущення про видову приналежність мікобактерій 1 групи до *Mycobacterium bovis*. Мікобактерії ж 2 і 3 груп росли на живильних середовищах при усіх температурних режимах окрім середовища з додачею жовчі, що вказує на атиповість мікобактерій 2 і 3 груп.

Таким чином, аналізуючи результати лабораторних досліджень було ідентифіковано *Mycobacterium bovis*, атипові швидкоростучі мікобактерії IV групи та атипові нехромогенні мікобактерії III групи за класифікацією Раньона.

З відібраних проб ґрунту та змивів з об'єктів довкілля виділено 54 чистих культури мікроорганізмів. При дослідженні їх морфологічних, тинкторіальних та культуральних властивостей їх також можна було розділити на аналогічні три групи.

У результаті аналізу даних біохімічних досліджень встановлено ріст порівняно з контролем рівня загального білку на 3,6% у корів, контамінованих атиповими мікобактеріями (1 дослідна група), що, ймовірно, характеризує деяке прискорення білкового обміну, обумовлене антигенною стимуляцією атипових мікобактерій.

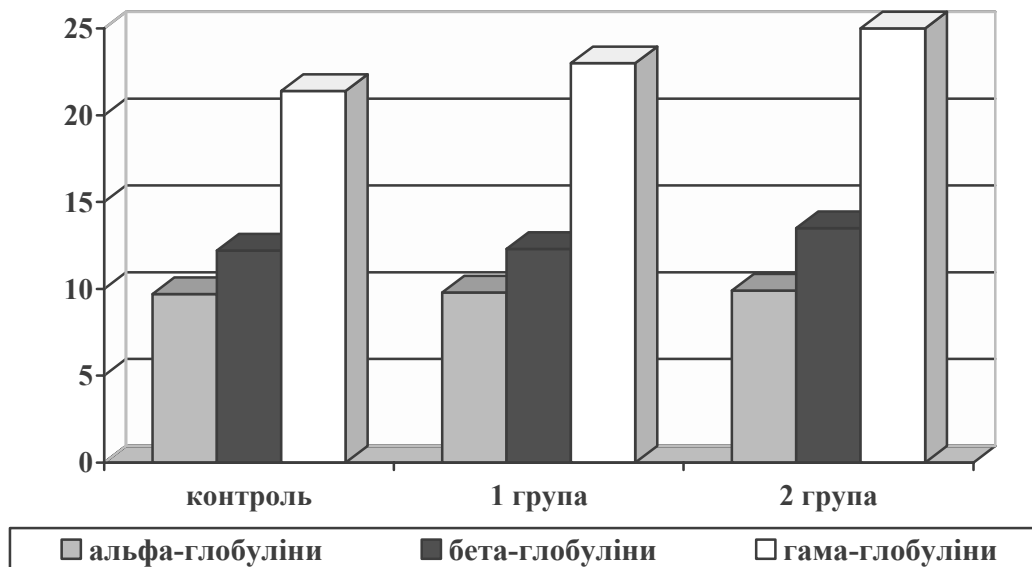
У тварин 2 дослідної групи, інфікованих *M.bovis*, рівень загального білку в сироватці крові достовірно ($p < 0,001$) зростає у порівнянні з контролем на 8,7%, що вказує на прискорення біосинтетичних процесів, які очевидно, обумовлені синтезом антитіл.

Також встановлено більшу кількість глобулінів у тварин обох дослідних груп, проте достовірність різниці можна було прослідкувати лише у тварин 2 дослідної групи ($p < 0,01$). У той час рівень альбумінів, що виконують функцію резервного пластичного білку, був майже однаковим у сироватці крові всіх груп корів.

Вміст глобулінових фракцій за результатами горизонтального електрофорезу в агаровому гелі показано на рис.1. Як видно з рисунку основні зміни відбуваються у фракції гама-глобулінів. Так, у корів 1 дослідної групи

цей показник виявився вищим на 4,4%, порівняно з контролем, а у тварин 2 дослідної групи – на 13% ($p < 0,01$). Встановлені особливості імуногенної фракції білків підтверджують припущення про більш активну антигенну стимуляцію патогенних мікобактерій у порівнянні з атиповими.

Рис. 1 Вміст глобулінових фракцій сироватки крові (агаровий гель, г/л)



Підтвердженням імуного походження встановлених змін є особливості динаміки вмісту білків бета-глобулінової фракції, в склад яких входить комплемент, який, як відомо, приймає участь в імунних реакціях. Проте зростання рівня бета-глобулінів спостерігався лише у інфікованих тварин (2 група) на 6,1%.

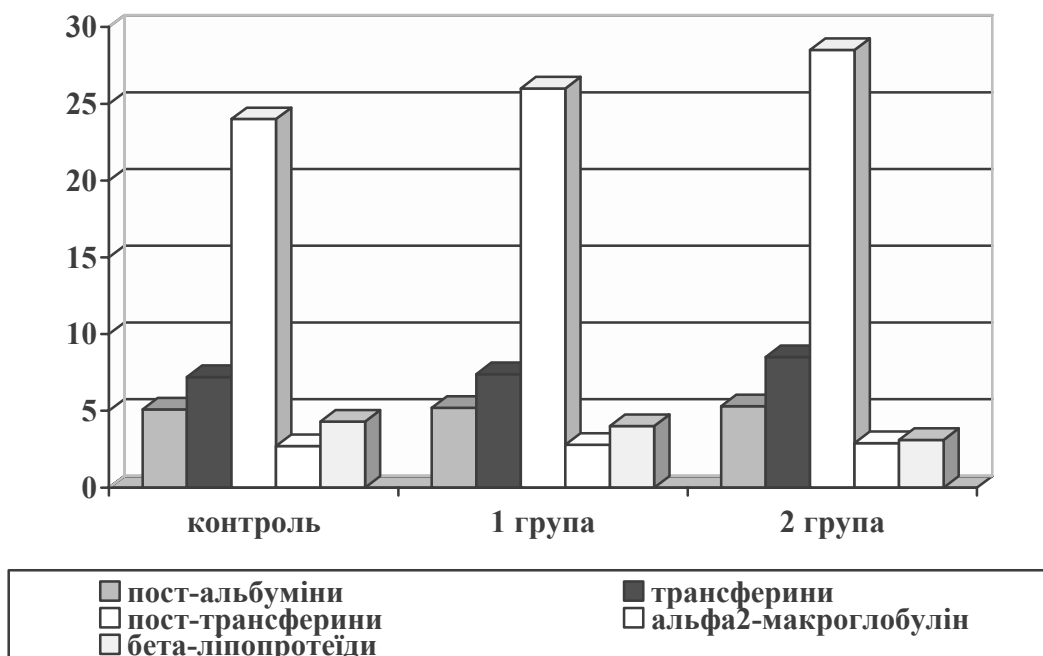
Відносно змін у концентрації різних груп імуноглобулінів встановлено, що при мікобактеріозах в значній мірі реагують імуноглобуліни класу G, на що також вказує загальне підвищення рівня білків пост-трансферинової зони при електрофорезі в поліакриламідному гелі.

Як відмічалось, у тварин 2 групи спостерігалась тенденція до збільшення бета-глобулінів, в склад яких входять білки трансферинової зони, що визначаються електрофорезом в ПААГ (рис. 2). Рівень трансферинів при контамінації мікобактеріями зростав у тварин 1 та 2 дослідних груп на 18% ($p < 0,001$). Враховуючи бактерицидні властивості трансферинів, зрозумілим є подібна їх динаміка, скерована, очевидно, на локалізацію та делімінацію мікобактерій, особливо патогенних.

Не слід забувати, що крім гуморальних факторів імунітету при туберкульозі активно задіяні також клітинні фактори, що проявляється зростанням кількості лімфоцитів, особливо суттєво у тварин 2 групи.

У тварин 2 групи, інфікованих *M.bovis*, нами встановлено вірогідне на 12% ($p < 0,02$) зниження рівня бета-ліпопротеїдів, порівняно з тваринами контрольної групи. Знаючи, що жири та жиропохідні речовини відіграють особливо важливу роль в фізіологічних процесах мікобактерій, стають очевидними подібні зміни.

Рис. 2 Вміст глобулінових фракцій сироватки крові (ПААГ, г/л)



Висновки.

1. Встановлено тісний корелятивний зв'язок між циркуляцією мікобактерій в зовнішньому середовищі та організмі тварин. З обстежуваного матеріалу, який був відібраний від корів, позитивно реагуючих на введення туберкуліну, об'єктів довкілля та ґрунту, було виділено *Mycobacterium bovis*, атипів швидкоростучі мікобактерії IV групи та атипів нехромогенні мікобактерії III групи за класифікацією Раньона.
2. Сприйнятливність тварин до контамінації мікобактеріями визначалась особливостями імунного статусу. Встановлено тісний корелятивний зв'язок між контамінацією мікобактеріями як атипівими, так і патогенними і такими показниками білкового обміну як загальний білок, гамма-глобуліни (імуноглобуліни), трансферини, пост-трансферини та бета-ліпопротеїди. При цьому вплив патогенних мікобактерій на показники білкового метаболізму був набагато суттєвіший по відношенню до гама-глобулінів, трансферинів та бета-ліпопротеїдів.

Література

1. Барбова А.І., Жемкова Г.А., Журило О.А., Миронченко С.В. Застосування автоматизованої системи MGIT для діагностики туберкульозу легень і визначення медикаментозної стійкості мікобактерій// НІФП АМНУ. – Методичні рекомендації. – Київ, 2007. – 26 с.
2. Бусол В.О., Ситнік В.А., Шевчук В.М. До питання сприйнятливості великої рогатої худоби до *M. tuberculosis*// Міжнародна науково-практична конференція "Епізоотологія і профілактика інфекційних хвороб великої рогатої худоби" (14-17 березня 2006 р., НАУ, Київ). – К.: Видавничий центр НАУ, 2006. – С. 16.
3. Бусол В.О., Ситнік В.А., Шевчук В.М. Рушійні сили епізоотичного процесу при туберкульозі великої рогатої худоби // Вісник СНАУ. Серія „Вет. мед.”. – Суми, 2004. – №7 (12). – С. 27-30.
4. Васильев А. В. Внелегочный туберкулез. – СПб.: ИКФ "Фолиант", 2000. – 568 с.
5. Фещенко Ю. І., Мельник В. М. Сучасні методи діагностики, лікування і профілактики туберкульозу. – К.: Здоров'я, 2002. – 904 с.
6. Thoen C.O. Karison A. G., Himes E.M. Mycobacterial infections in animals.// Rev. Infect. Dis. –1999, V.3. – P.360-372.
7. <http://www.baylorhealth.edu/Research/Grants/mycobacteriumtuberculosis.htm>

Summary**Circulation of atypical mycobacteria in the environment and the organism as a cause of positive allergic reactions.****Turko I.B., Kulyaba O.V., Semanyuk V.I, Pelenyo R.A.**

Lviv National University of Veterinary Medicine and Biotechnologies named after S.Z.Gzhytskyj, Lviv, Ukraine

Established a strong correlative relationship between circulating *Mycobacterium bovis*, the rapidly growing atypical mycobacterium group and atypical mycobacteria (group III and IV of the classification Runyon) in the external environment and animal organism. Susceptible animals to mycobacteria contamination defined features of protein status of the organism.