

УДК 619:616.98:579.873.21:636.5
© 2016

О.А. ТКАЧЕНКО,
доктор ветеринарних наук

М.В. БІЛАН,
кандидат ветеринарних наук

О.Г. ГЛЕБЕНЮК,
лікар ветеринарної медицини

Ю. СОКОЛ, Л. ГОРДІЄНКО,
магістри

Дніпропетровський державний
аграрно-економічний університет,
Україна

E-mail: bilan.m.v @ dsau.dp.ua
tkachenko.o.a@dsau.dp.ua

м. Дніпропетровськ, вул. С. Єфремова, 25

**З'ЯСУВАННЯ
БІОЛОГІЧНОЇ АКТИВНОСТІ
ТА "ЧИСТОТИ" КУЛЬТУРИ
ДИСОЦІАТИВНИХ
ФОРМ *M. BOVIS***

*Показано, що культури дисоціативних форм *M. bovis*, які пасажуються в умовах лабораторії кафедри, втратили здатність генеруватися (розмножуватися) за 37 °С (за винятком мікобактерій 117,б варіанта) принаймні в перші 42 доби спостереження; у мікобактерій варіантів 118 та 117,в низька біологічна активність; тільки один штаб (117,б) володіє здатністю активно розмножуватися як за низької плюсової (3 °С), так і оптимальної традиційної температури (37 °С). Дисоціативні форми *M. bovis* 117,а; 117,б; 117,в; 118 варіантів зберігали морфологічну стабільність протягом усього періоду, що свідчить про "чистоту" цих культур.*

Ключові слова: мікобактерії, дисоціативні форми, морфологія, біологічна активність, тинкторіальні та культуральні властивості.

Біологічна активність збудника інфекційної хвороби, у тому числі й туберкульозу, визначається сукупністю притаманних для конкретного мікроорганізму властивостей: патогенність, вірулентність, морфологія, культуральні, тинкторіальні, здатність утворювати корд-фактор, біохімічна активність та інше, зміна яких (або окремих з них) характеризує потенціальні можливості мікобактерій конкретного штаму [1, 2, 5, 7, 9].

За багаторічних досліджень швидкорозлого високовірулентного штаму *M. bovis*, від якого відщепилася на 117 та 118 пересівах авірулентна раса в умовах низьких плюсових температур, коли з'ясовано ряд важли-

вих питань, залишилися ще й не вивченими окремі з них, у тому числі й здатність мікробних клітин авірулентної (дисоціативної) раси розмножуватися на живильному яєчному середовищі Левенштейна-Йєнсена [2, 5].

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* дещо вплинула на об'єктивність оцінки імунологічної ефективності. Залежно від

кількості активних клітин, швидкості формування колоній могли б бути зовсім іншими вакцинуюча доза та тривалість періоду між імунізацією й зараженням вірулентним штамом [2, 5].

Мета роботи: з'ясувати біологічну активність та "чистоту" культури дисоціативних форм *M. bovis*.

Матеріал та методи дослідження. Роботу проводили в навчальній лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб тварин ДДАЕУ. Для дослідження застосували дисоціативні форми *M. bovis* 120 генерації (з часу дисоціації мікобактерій). У роботі застосували метод розведення культур мікобактерій в ізотонічному розчині. Завис культури мікобактерій розводили до 10^{-9} , й останні розведення 10^{-7} , 10^{-8} та 10^{-9} висівали на середовище Левенштейна-Йенсена і культивували за температури 3 та 37 °C [8].

Для з'ясування чистоти культури дисоціативних форм *M. bovis* після розведення та висіву завису визначали максимальне розведення, в якому на живильному середовищі формувалися колонії, враховуючи їх мінімальну кількість. Саме з такого розведення відбирали частку колонії в перші декілька діб її появи, готували мазки та досліджували їх під імерсійною системою. У подальшому кожні 3–4 доби проводили аналогічну маніпуляцію з цією ж колонією протягом 1,5 місяця. Порівнювали морфологію мікобак-

терій, тинкторіальні та культуральні властивості з такими до посіву та з попередніми даними досліджуваної колонії.

Результати дослідження та їх обговорення. Нами встановлено, що біологічна активність дисоціативних форм мікобактерій різна, не тільки в умовах культивування за тієї самої температури, а і за різних. Найвищою вона виявилася у мікобактерій 117,б варіанта як за 37 °C, так і 3 °C. Проте в розведенні 10^{-9} за температури 37 °C життєздатність мікобактерій, їх активність виявилася в 4,3 раза нижчими, ніж за 3 °C. Інші штами мікобактерій за 37 °C культивування не проявляли росту в усіх розведеннях (таблиця). Як бачимо, за температури 3 °C найвищою виявилася активність у мікобактерій 117,а варіанта, які проявили ріст колоній на 14 добу в усіх розведеннях. Достатньо низька біологічна активність зареєстрована в мікобактерій 118 штаму, бо їх ріст проявився тільки в розведенні 10^{-7} і до того ж на 28 добу культивування. Деяко вища, але також низька активність виявлена і у 117,в варіанті – ріст проявився в розведенні 10^{-7} та 10^{-8} і на 28 добу культивування.

У результаті проведеної роботи зі з'ясування "чистоти" культури дисоціативних форм *M. bovis* помічено, що з початку росту колоній спостерігаються деякі відмінності в морфології досліджуваних мікобактерій від таких вихідних форм. Встановлено також, що на живильних середовищах, в усіх розведеннях,

Біологічна активність *M. bovis* штамів дисоціативних форм на середовищі Левенштейна-Йенсена залежно від температури культивування

<i>M. bovis</i> , штам	t, °C	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
117,а	3	-	3	3	4	6	6	-	3	3	3	3	3	-	6	7	7	7	7
	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
117,б	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
117,в	3	-	-	-	10	16	17	-	-	-	2	2	2	-	-	-	-	-	-
	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
118	3	-	-	-	2	2	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	37	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

культури дисоціативних форм *M. bovis* формували ізольовані колонії, які легко можна було полічити. Проте колонії не мали чітко вираженого пігментоутворення як їх вихідні культури: 117,а, 117,б, 117,в варіанти (рис. 2–4).

Культури дисоціативних форм *M. bovis* 117б варіанта, одержані за 3 та 37 °С різнилися не тільки між собою, але й від таких у вихідної культури. Проте за морфологією мікобактерій суттєвих відмінностей не спостерігалось.

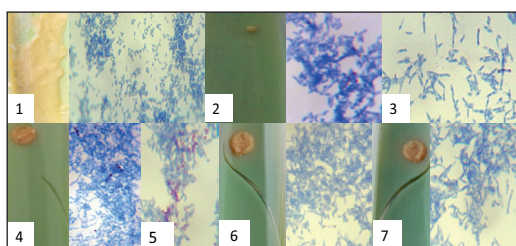


Рис. 1. Культуральні, тинкторіальні властивості та морфологія *M. bovis* 117,б варіанта за 37 °С; культура і мікобактерії: 1 – вихідні; 2 – 7 доба; 3 – 15; 4 – 21; 5 – 27; 6 – 30; 7 – 37 ×1600

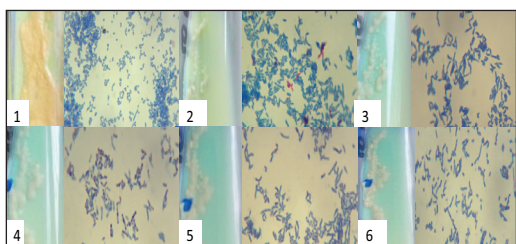


Рис. 2. Культуральні, тинкторіальні властивості та морфологія *M. bovis* 117,б варіанта, які культивувалися за 3 °С; культура і мікобактерії: 1 – вихідні; 2 – 4 доба; 3 – 8; 4 – 20; 5 – 28; 6 – 32 ×1600

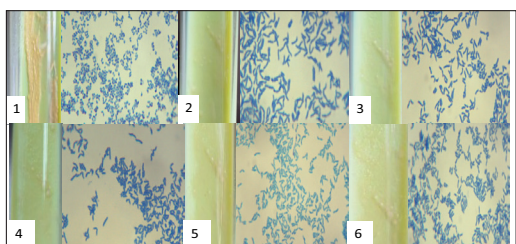


Рис. 3. Культуральні, тинкторіальні властивості та морфологія *M. bovis* 117,а варіанта за 3 °С; культура і мікобактерії: 1 – вихідні; 2 – 4 доба; 3 – 8; 4 – 16; 5 – 24; 6 – 32 ×1600

Мікобактерії культури 117,б варіанта за 37 °С виявлялися некіслотостійкими зернистими довгими (10–15 мкм) та некіслотостійкими й кислотостійкими поодинокими зернами. Мікобактерії вихідної культури характеризувалися некіслотостійкими короткими паличками та зернами і тільки поодинокими некіслотостійкими довгими паличками (рис. 1).

У той же час мікобактерії, які утворювали колонії за 3 °С, виявилися некіслотостійкими різної довжини зернистими паличками та зернами, а також поодинокими кислотостійкими зернами і короткими паличками (рис. 2).

Проте зі збільшенням часу культивування мікобактерій 117,б варіанта, які знаходилися як за 3, так і 37 °С, мікроскопією кислотостійких зерен та паличок не зафіксовано.

Мікроскопією встановлено, що мікобактерії 117,а та 117,в варіантів, які культивувалися за 3 °С, виявлялися некіслотостійкими паличками різної довжини (короткі та довгі) та некіслотостійкими поодинокими

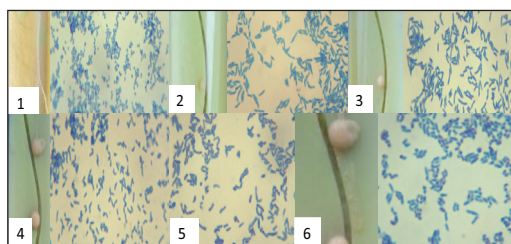


Рис. 4. Культуральні, тинкторіальні властивості та морфологія *M. bovis* 117,в варіанта, які культивувалися за 3 °С; культура і мікобактерії: 1 – вихідні; 2 – 4 доба; 3 – 8; 4 – 16; 5 – 24; 6 – 32 ×1600

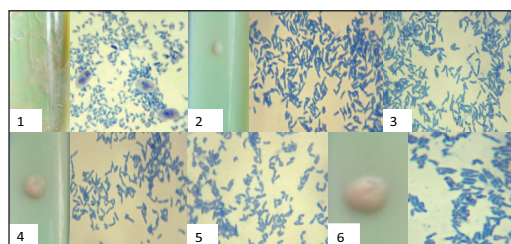


Рис. 5. Культуральні, тинкторіальні властивості та морфологія *M. bovis* 118 варіанта, які культивувалися за 3 °С; культура і мікобактерії: 1 – вихідні; 2 – 4 доба; 3 – 12; 4 – 20; 5 – 24; 6 – 32 ×1600

зернами впродовж усього періоду дослідження (рис. 3, 4).

Як зазначалося вище, дисоціативні форми мікобактерій 118 варіанта утворювали колонії за 3 °С тільки у розведенні 10⁻⁷. За кольором культури були подібними до вихідних (рис. 5).

Мікроскопією виявляли некіслотостійкі зернисті палички різної довжини, а також поодинокі некіслотостійкі зерна. Класичних (типових) варіантів (овалів) L-форм, які спостерігали у вихідній культурі, не виявлено, що напевно, зумовле-

но суттєвим зниженням вмісту ліпідів у клітинній стінці через значну кількість пасажів. Вірогідно все це і призвело до руйнації клітинної стінки класичних L-форм.

Отже, дослідження показали, що біологічна активність дисоціативних форм мікобактерій різна не тільки в умовах культивування за тієї самої температури, а і за різних. Це підтверджує дані попередніх досліджень: дисоціативні форми мікобактерій не культивуються або погано культивуються за 37 °С [2–4, 6].

Висновки

Культури дисоціативних форм *M. bovis*, які пасажуються в умовах лабораторії кафедри епізоотології та інфекційних хвороб тварин ДДАЕУ, втратили здатність генеруватися (розмножуватися) за 37 °С (за винятком мікобактерій 117,б варіанта), принаймні в перші 42 доби спостереження. Тільки один штаб (117,б) володіє здатністю активно розмножуватися як за низької плю-

сової (3 °С), так і оптимальної традиційної температури (37 °С). Мікобактерії варіантів 118 та 117,в володіють низькою біологічною активністю.

Усі варіанти дисоціативних форм *M. bovis* музейних штабів кафедри зберігають морфологічну стабільність протягом всього періоду, що свідчить про "чистоту" цих культур.

Бібліографія

1. Біологічна активність епізоотичних та музейних штабів *M. bovis* / [О.А. Ткаченко, Н.Г. Усєєва, В.В. Глебенюк, О.М. Кулішенко] // Науковий вісник Львівського НУВМ та БТ. – 2007. – Т. 9, № 3 (34), ч. 1. – С. 218–224.
2. Біологічні властивості дисоціативних форм *M. bovis*: культуральні особливості за температур 3 і 37 °С / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, В.В. Міські [та ін.] // Вет. медицина України. – 2010. – № 3 – С. 33–35.
3. 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.] // Ветеринарна медицина України. – 2010. – № 12 – С. 27–30.
4. Биологические свойства *M. bovis* диссоциативных L- и других форм при различных температурах культивирования / А.А. Ткаченко, И.Н. Шендрик, В.В. Мискив, М.В. Білан // Междунар. научно-практ. журнал. – 2013. – № 2. – С. 24–31.
5. Вейсфейлер Ю.К. Биология и изменчивость микобактерий туберкулеза и атипичных микобактерий / Ю.К. Вейсфейлер. – Будапешт, 1975. – 336 с.
6. Культуральні властивості та морфологічні і тинкторіальні ознаки дисоціативних форм *Mycobacterium bovis*, культивованих за 3 та 37 °С / О.М. Кулішенко, П.О. Давиденко, О.Г. Глебенюк [та ін.] // Науково-техн. бюлетень НДЦ біобезпеки та еколог. контролю ресурсів АПК. – 2015. – Т. 3, № 1. – С. 9.
7. Лабораторна діагностика туберкульозу тварин: практичний посібник / [О.А. Ткаченко, М.В. Білан, В.В. Зажарський, Л.О. Ковальова]. – Дніпропетровськ: "Свідлер А.Л.", 2010. – 208 с.
8. Палій А.П. Епізоотологічний моніторинг туберкульозу великої рогатої худоби та науково-експериментальне обґрунтування розробки і застосування засобів дезінфекції: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня доктора вет. наук: 16.00.03. / А.П. Палій. – Харків, 2013. – 40 с.
9. Туберкулез животных и меры борьбы с ним / Под ред. Ю.А. Кассича. – К.: Урожай, 1990. – 304 с.

Рецензент – доктор ветеринарних наук,
професор П.М. Склярів