



УДК 619:616.98:579.873.21:614.48

**О.А. ТКАЧЕНКО**, докт. вет. наук, професор  
**І.М. ШЕНДРИК**, асистент  
**В.В. МІСКІВ**, аспірант  
**А.В. КОВАЛЬОВ**, здобувач  
 Дніпропетровський державний аграрний університет

## БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ДИСОЦІАТИВНИХ L- ТА ІНШИХ ФОРМ *M. BOVIS*

(Закінчення. Початок – у № 4, 2013)

Необхідно було дослідити можливі морфологічні зміни в часі у разі тривалого збереження культури. Тому мікроскопію мазків, приготовлених з незміненої за виглядом і формою 27-ї субкультури, витриманої за  $t\ 3^{\circ}\text{C}$ , здійснили через 15 місяців. Було виявлено (рис. 11) некислотостійкі короткі й довші зернисті палички та кислотостійкі елементарні тільця (зернисті форми).

На 4-ту добу дослідили помаранчево-червонуватий суцільний по лінії посіву ріст культури (рис. 12) четвертої генерації, морфологію й тинкторіальні властивості L-форм на середовищі Левенштейна – Йенсена без саліциловокислого натрію за  $t\ 3^{\circ}\text{C}$ . Було виявлено некислотостійкі паличкоподібні утворення (рис. 13) зі злегка червонуватою оболонкою й темними зернами, що знаходяться всередині овальної видовженої форми, з яких вивільняються трохи червонуваті зерна та палички.

На 6-ту добу на середовищі з вмістом  $1\ \text{мг}/\text{см}^3$  саліциловокислого натрію сформувалась слизова сіро-жовтуватого кольору по лінії посіву культура (рис. 14). Мікроскопія мазка з культури засвідчила наявність мікроорганізмів (рис. 15), так само як у контролі та за вмісту  $0,5\ \text{мг}/\text{см}^3$  саліциловокислого натрію, проте з чіткіше вираженим забарвленням у червоний колір усєї клітини (крім темних зерен посередині).

За температури культивування  $37^{\circ}\text{C}$  на середовищі без саліциловокислого натрію ріст культури було відзначено на 15-ту добу, а з його вмістом росту виявлено не було.

У той же час у вихідних змінених форм, а також їх

культур-ревернантів (виділених з органів морських свинок, яким інокульовано досліджувані варіанти вихідних мікроорганізмів – кислотостійкі палички) зареєстровано підвищення окисно-відновних реакцій (дегідрогеназна й каталазна активність) з паралельною втратою вірулентності мікобактерій, у т. ч. й у культур-ревернантів.

Отже, результати роботи засвідчили, що L- та інші форми набули властивостей атипичних мікобактерій.

Під час аналізу результатів досліджень вмісту вільних жирних кислот у *M. bovis* типових вірулентних і змінених авірулентних форм відзначено появу в останніх нової коротколанцюгової ундеканової кислоти. При цьому її синтез в умовах культивування за  $t\ 3^{\circ}\text{C}$  виявився в 15,6 разу інтенсивнішим, ніж за  $t\ 37^{\circ}\text{C}$ . У той же час при культивуванні за  $t\ 3^{\circ}\text{C}$  лауринова й арахінова кислоти, які виявляли у вірулентних мікобактеріях, не синтезувались до рівня, щоб їх можна було ідентифікувати зазначеним методом. При культивуванні авірулентних мікобактерій за  $t\ 37^{\circ}\text{C}$  не виявляли тільки лауринової кислоти. Це свідчить про глибокі зміни в метаболізмі мікробної клітини, обумовлені необхідністю її виживання в умовах низьких плюсових температур, які супроводжувалися розмноженням і утворенням колоній.

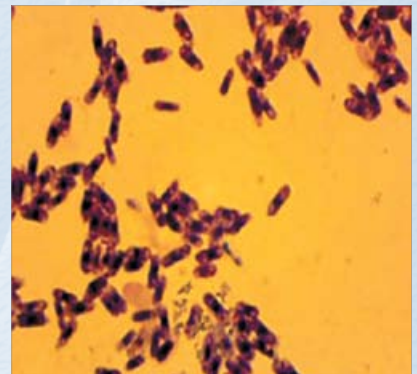
Кількісний вміст вільних жирних кислот змінених мікобактерій істотно змінився порівняно з мікобактеріями вірулентної материнської культури. У той же час скелетні вільні жирні кислоти (пальмітинова, олеїнова, стеаринова) у мікобактеріях дисоціативних форм залишалися на високому рівні, що свідчить про їх стабільність незалежно від зміни властивостей мікобактерій, їх біологічної активності, тобто зміна



**Рис. 11.** Елементарні тільця та некислотостійкі форми паличок *M. bovis* (культивування в умовах  $t\ 3^{\circ}\text{C}$  впродовж 15 місяців).  $\times 1300$



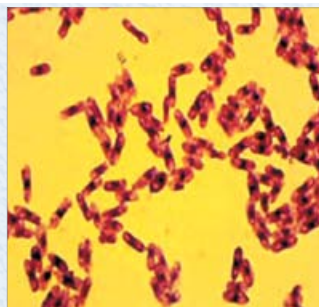
**Рис. 12.** Культура L-форм *M. bovis* (контроль)



**Рис. 13.** L- та інші форми *M. bovis*.  $\times 1500$



**Рис. 14.** Культура L-форм *M. bovis* (1,0 мг/см<sup>3</sup>)



**Рис. 15.** L- та інші форми *M. bovis* дисоціативних форм 118 варіанта. × 1500

культуральних, тинкторіальних, вірулентних, біохімічних тощо властивостей і морфологічних ознак не веде до істотної зміни їх вмісту.

У той же час співвідношення коротко- і довголанцюгових вільних жирних кислот у вірулентних субкультур (100+124/2) і авірулентних мікобактерій (L- та інших форм) становило 9,94:1; 5,51:1 (t 3°C) та 5,31:1 (t 37°C) відповідно. Це суперечить усталеним поглядам, тому що у вірулентних мікобактерій незмінених морфологічних форм відзначається значно нижчий вміст коротколанцюгових вільних жирних кислот порівняно з довголанцюговими. Оскільки такі дослідження дисоціативних форм, одержаних в умовах низьких плюсових температур, проведено вперше, можливо, така закономірність співвідношення коротко- і довголанцюгових кислот притаманна саме багаторазово пасажованим і генетично модифікованим мікобактеріям, що визначається особливістю їх метаболізму. Порівнюючи аналогічні дані досліджень пасажованих за t 37°C вірулентних мікобактерій вихідної материнської культури (2-га субкультура), відзначили, що співвідношення аналізованих кислот принципово відрізняється від попередніх – 1,84:1. Проте в мікобактерій 59-ї субкультури співвідношення цих кислот становило 4,89:1. Це свідчить про поступову зміну співвідношення синтезу кислот у процесі пасажів через штучне живильне середовище.

Тим часом вміст ненасичених вільних жирних кислот – пальмітолеїнової, олеїнової та лінолевої+ліноленової, які характеризують адаптивні процеси метаболізму мікробної клітини, виявився в першій й другій загалом нижчим у дисоціативних форм мікобактерій, у третьої – значно вищим, ніж у вірулентних мікроорганізмів материнської культури.

Можливо, саме ці особливості вмісту ненасичених жирних кислот у дисоціативних форм мікобактерій (L- та інші форми) визначають ступінь вірулентності, який могли б характеризувати довголанцюгові кислоти, оскільки зниження вмісту ненасичених кислот, що, за даними Л.М. Моделя [6], відповідають за гальмування лейкопротеаз, підвищує активність захисних факторів макроорганізму. Це, відповідно, забезпечує нейтралізацію довголанцюгових вільних жирних кислот і визначає загалом авірулентність (можливо) досліджуваних форм мікобактерій, у яких вміст ненасичених жирних кислот практично такий самий за високого вмісту довголанцюгових вільних жирних кислот у патогенних мі-

кобактерій: співвідношення ненасичених кислот до довголанцюгових становить 4,63:1, у авірулентних 3,34:1 (t 3°C) і 2,69:1 (t 37°C).

Водночас слід зазначити, що в другій генерації материнської культури досліджуваного штаму аналізовані показники становили 1:1,26, тобто вміст довголанцюгових вільних жирних кислот істотно перевищував вміст ненасичених кислот. Проте вже в 59-й субкультурі аналізоване співвідношення становило 2,38:1, що свідчить про послідовні, тенденційні зміни синтетазних систем мікробної клітини, обумовлені її пристосуванням до зміни умов довкілля. При цьому порушуються не лише хімічні, а й фізичні зв'язки компонентів клітини (ліпіди, протеїни, вуглеводи), що веде до появи комплексів з новими якостями й властивостями та, ймовірно, зміни генотипу.

Але чи постійні такі явища в досліджуваних дисоціативних формах *M. bovis*?

Встановлено, що персистенція досліджуваних мікроорганізмів (27-ма субкультура, некислотостійкі палички та L-форми) в організмі морських свинок триває дев'ять (період досліду) і більше місяців. Проте із суспензії, приготовленої з макроскопічно не змінених органів дослідних тварин, було виділено кислотостійкі елементарні тільця (зерна) й типових морфологічних форм палички, які на щільному живильному середовищі на третю добу після висіву суспензії утворювали помаранчеву культуру.

Інокуляція виділених кислотостійких мікобактерій (культура-ревернант) морським свинкам (1 мг/см<sup>3</sup>) не супроводжувалася розвитком алергічного стану (алергічна реакція на туберкулін та ААМ через 30, 60 і 90 діб негативна), проте з органів еванізованих через 3 місяці дослідних тварин було виділено кислотостійкі мікобактерії, які на 3-тю добу утворювали культуру помаранчевого кольору.

Очевидно, багаторазові пасажі через штучне живильне (щільне) середовище, тривале (20 місяців) знаходження в умовах низької плюсової температури змінили генетичний баланс, що забезпечило їм виживання внаслідок втрати одних властивостей, характерних для патогенного мікроорганізму, й набуття нових, частково притаманних іншим мікобактеріям, зокрема атиповим. У той же час персистенція в організмі морських свинок типових морфологічних кислотостійких форм (палички), які реверсували з L-форм, не супроводжується розвитком захворювання. Вони залишаються пігментоутворювальними й зберігають здатність формувати колонії (культура-ревернант) на щільному живильному середовищі, починаючи з 1-ї генерації (з біологічного матеріалу морських свинок) на 2-гу добу культивування.

Втрата сенсibiliзувальної здатності у мікобактерій, багаторазово пасажованих і персистуючих в організмі морських свинок, може свідчити (звичайно, лише певною мірою) про втрату імуногенної здатності, оскільки відомо, що розвиток алергічної (туберкулінової) реакції та її інтенсивність свідчать про імунологічну перебудову макроорганізму (розвиток інфекційного процесу) з паралельним набуттям специфічної стійкості.



Проте результати експерименту підтвердили, що один з багатьох показників клінічного прояву інфекційного процесу – зміна маси тіла морських свинок, в організм яких інокулювали 1 мг/см<sup>3</sup> досліджуваних мікобактерій, – має певну закономірність динаміки: на 10-ту і 20-ту добу досліду маса тіла підвищилась на 25 і 45 г відповідно, на 35-ту добу знизилась порівняно з 20-ю добою на 35 г з наступним підвищенням на 50 г на 46-ту добу. Проте через 50 діб, на час другого введення 1 мг/см<sup>3</sup> таких форм мікобактерій, подібне зниження маси тіла відзначено через 15–20 діб з наступним вирівнюванням попередньої позитивної динаміки аналізованого показника. Це може свідчити про залишкову вірулентність досліджуваних змінених форм *M. bovis* з можливим формуванням специфічного протитуберкульозного імунітету без розвитку необхідного рівня (який став би діагностикомом) алергічного стану й утворення виразки в ділянці введення зависі мікобактерій.

Бактеріоскопія мазків-відбитків з органів евтаназованих (через 80 діб) тварин виявила неокислотостійкі палички, зерна-тільця.

У контролі маса тіла тварин тенденційно зростала, а бактеріоскопічні дослідження (мазки-відбитки) виявилися негативними.

Очевидно, мікобактерії з новими, генетично закріпленіми властивостями мають іншу здатність стимулювати доброякісний інфекційний процес, без розвитку алергії необхідного рівня, щоб її виявляли ППД – для ссавців та ААМ.

Водночас слід зазначити, що, можливо, згасання активності генів, відповідальних за патогенні властивості, які визначаються окисно-відновними процесами (дегідрогеназна, каталазна активність тощо), та генами, що активізувалися (знаходились у дремаючому стані), активізують метаболічні процеси синтезу пігменту з пригніченням дії факторів (токсинів) патогенності.

У той же час ми не встановили залежності між швидкістю розмноження (строки утворення колоній) і патогенністю, оскільки вихідна материнська культура (3-тя генерація) досліджуваних змінених форм *M. bovis* мала високу вірулентність і формувала колонії на 2–3-тю добу, не утворюючи пігменту й не виявляючи вираженої дегідрогеназної і каталазної активності [9].

Отже, селекційовано расу змінених форм мікобактерій з особливими властивостями, які можуть виявитися перспективними для конструювання протитуберкульозної вакцини.

### ВИСНОВОК

Селекційовано расу змінених форм *M. bovis* із такими властивостями:

- L-форми при пасажах через щільне середовище за t 3°C, змінюючись морфологічно, переходять у неокислотостійкі паличкові, кокові форми, за t 37°C – у неокислотостійкі (інколи кислотостійкі) елементарні тільця (зерна);

- за t 3°C ріст на щільному елективному живильному середовищі помаранчевої культури відбувається на 2–3-тю добу культивування (інколи на 24-ту годину), за t 37°C – ріст

жовтуватої культури – в такі ж строки, але після 20 пересівів спостерігається слабкий ріст культури за цієї температури і з часом зникає;

- на МПА та МПБ культури ростуть (t 3 і 37°C, останні субкультури, з 26-ї генерації, тільки за t 3°C) на 1–2-гу добу культивування;

- на середовищі з вмістом саліциловокислого натрію за низької плюсової температури – ростуть на 6-ту добу, а за t 37°C – на 15-ту;

- виявляють виражену дегідрогеназну й каталазну активність;

- авірулентні – впродовж дев'яти місяців частково реверсують у кислотостійкі морфологічні форми, не викликаючи туберкульозу в морських свинок, мають низьку сенсibiliзувальну здатність або не мають її взагалі (щодо ППД – для ссавців, у т. ч. ААМ), не утворюють виразок у ділянці введення мікобактерій;

- у першій генерації культура-ревернант (виділена з органів морської свинки) на 2-гу добу утворює помаранчеву культуру;

- синтезують нові коротколанцюгові вільні жирні кислоти, які не виявляють у вірулентних мікобактерій материнської культури.

### СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. **Біологічні** властивості дисоціативних форм *M. bovis*: культуральні особливості за температур 3 і 37°C / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, В.В. Місків [та ін.] // Ветеринарна медицина України. – 2010. – № 3. – С. 33–35.
2. **Біологічні** властивості дисоціативних форм *M. bovis*: морфологічні ознаки та тинкторіальні властивості за температур 3 та 37°C / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, В.В. Захарський [та ін.] // Ветеринарна медицина України. – 2010. – № 12. – С. 27–30.
3. **Давиденко П.О.** Сенсibiliзувальні, 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 // Ветеринарна медицина України. – 2010. – № 2. – С. 20–22.
4. **Інструкція** з бактеріологічної діагностики туберкульозної інфекції / Ю.І. Фещенко, О.А. Журило, М.Т. Клименко [та ін.]. – Режим доступу: www.ifr.kiev.ua.
5. **Лабораторна** діагностика туберкульозу тварин: [Практичний посібник] / О.А. Ткаченко, М.В. Білан, В.В. Захарський, Л.О. Ковальова. – Дніпропетровськ: Вид-во «Свідлер А.Л.», 2010. – 208 с.
6. **L-форми** мікобактерій туберкулеза / Под ред. З.Н. Кочемасовой. – М.: Медицина, 1980. – 165 с.
7. **Модель Л.М.** Биология и биохимия туберкулёзных микобактерий. – М.: Изд-во АМН СССР, 1952. – 247 с.
8. **Морфологічні** аспекти реверсії неокислотостійких ниткоподібних *M. bovis* в бактеріальну кислотостійку форму / О.А. Ткаченко, О.Є. Галатюк, М.В. Білан [та ін.] // Сучасні проблеми туберкульозу в Україні: причини та шляхи їх подолання: наук.-практ. конф., 27–28 листопада 2008 р.: Збірник наук. праць. – К., 2008. – С. 149–153.
9. **Настанова** по діагностиці туберкульозу / В.М. Манченко, З.Р. Троценко, М.С. Павленко та ін. – К., 1994. – 39 с.

10. **Ткаченко О.А.** Швидкоростучі *M. bovis* у проблемі туберкульозу / О.А. Ткаченко // Ветеринарна медицина України. – 2004. – № 7. – С. 14–17.
11. **Туберкулез** животных и меры борьбы с ним / Под ред. Ю.А. Кассича. – К.: Урожай, 1990. – 304 с.
12. **Туберкулез** сельскохозяйственных животных / [В.И. Ротов, П.И. Кокуричев, П.Е. Савченко, Ю.А. Трач]. – К.: Урожай, 1978. – 237 с.
13. **Voskuil M.I.** Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program / M.I. Voskuil, D. Schnappinger, K.C. Visconti, M.I. Harrell, G.M. Dolganov, D.R. Sherman, G.K. Schoolnik // *J. Exp. Med.*, 2003. – Vol. 198. – P. 705–713.
14. **Mutants** of *Mycobacterium tuberculosis* lacking three of the five *rpf*-like genes are defective for growth in vivo and for resuscitation in vitro / K.J. Downing, V.V. Mischenko, M.O. Shleeva, D.I. Young, M. Young, A.S. Kaprelyants, A.S. Apt, V. Mizrahi // *Infect. Immun.*, 2005. – Vol. 73. – P. 3038–3043.
15. **Regulation** of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding alphacrystallin / D.R. Sherman, M. Voskuil, D. Schnappinger, R. Liao, M.I. Harrell, G.K. Schoolnik // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2001. – Vol. 98. – P. 7534–7539.
16. **Tufariello J.M.** Individual *Mycobacterium tuberculosis* resuscitation-promoting factor homologues are dispensable for growth in vitro and in vivo / J.M. Tufariello, W.R. Jacobs, J. Chan // *Infect. Immun.* – 2004. – Vol. 72. – P. 515–526.
17. **Yuan Y.** Stationary-phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial alpha-crystallin homolog. / Y. Yuan, D.D. Crane, C.E. Barry 3<sup>rd</sup> // *J. Bacteriol.* – 1996. – Vol. 178. – P. 4484–4492.

Одержано 11.02.2013

**Биологические свойства диссоциативных L- и других форм *M. bovis*.** А.А. Ткаченко, И.Н. Шендрик, В.В. Мискив, А.В. Ковалёв  
В статье рассматриваются *M. bovis*, которые отличаются по своим биологическим свойствам от патогенных штаммов.

**Biological properties of the dissociative L- and other forms of *M. bovis*.**  
A.A. Tkachenko, I.N. Shendrik, V.V. Miskiv, A.V. Kovalev  
This article focuses on *M. bovis*, which differ in biological properties of pathogenic strains. ◉

УДК 578:579:636.2:619.9

**О.Й. ГРИНЕВИЧ**, докт. мед. наук  
**І.Г. МАРКОВИЧ**, канд. мед. наук  
**І.В. ПОЛІЩУК**, мол. наук. співробітник  
**І.Д. ЛУКАШ**, мол. наук. співробітник  
**З.О. ЯЦУК**, мол. наук. співробітник  
Державна наукова установа «Державний центр інноваційних біотехнологій», Київ

**Л.В. МАРУЩАК**, мол. наук. співробітник  
Державний науково-дослідний інститут з лабораторної діагностики та ветеринарно-санітарної експертизи, Київ

## КІЛЬКІСНЕ ВИЗНАЧЕННЯ ДНК ПРОВІРУСУ ЛЕЙКОЗУ ВЕЛИКОЇ РОГАТОЇ ХУДОБИ ЯК МЕТОД ОЦІНКИ ІНФІКОВАНОСТІ ТВАРИН

*Лейкоз – це висококонтагіозне вірусне захворювання кровотворної системи тварин. Діагностика вірусу лейкозу зазвичай ґрунтується на виявленні специфічних антитіл, однак лише присутність провірусної ДНК, укоріненої в геном клітини, може виступати незаперечним критерієм інфікованості. Досліджено кров великої рогатої худоби на наявність вірусу лейкозу. Проведено кількісну оцінку вірусного навантаження у пробах крові.*

**В**ивчення патогенезу лейкозу великої рогатої худоби відбувалося впродовж тривалого часу паралельно з вивченням мето-



дів діагностики, епізоотології й розроблення оздоровчих протилейкозних заходів [8]. В інфікованих тварин вірус лейкозу великої рогатої худоби (ВЛ ВРХ) проникає в хромосомну ДНК лімфоцитів у формі провірусу в невеликій кількості (1–3) копій на диплоїдний геном [9]. Оскільки транскрипція вірусних білків усередині клітини заблокована, ВЛ ВРХ прихований і віремія в інфікованих тварин може не спостерігатися [10]. Антитіла утворюються, проте вони не здатні вплинути на вірус, і тварини залишаються носіями до кінця свого життя [7].

Діагностика вірусу лейкозу зазвичай заснована на виявленні специфічних антитіл, однак лише присутність провірусної ДНК, укоріненої в геном клітини, може виступати незаперечним критерієм інфікованості [9, 10]. Відкриття полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) стало видатною подією в діагностиці інфекційних захворювань, особливо вірусної етіології [1]. Метод ПЛР у режимі реального часу добре себе зарекомендував завдяки високій чутливості, специфічності й швидкості виконання [2, 4, 6].

**Мета роботи** – виявлення ДНК провірусу лейкозу ВРХ методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу та кількісне визначення вірусного навантаження у крові корів, інфікованих ВЛ ВРХ.

Об'єкт і предмет дослідження – кров великої рогатої худоби, хворої на лейкоз, вірус лейкозу.

© О.Й. Гриневич, І.Г. Маркович, І.В. Поліщук, І.Д. Лукаш, З.О. Яцук, Л.В. Марущак, 2013