



УДК 619:616.98:579.873.2:637.12:504.06

А.І. ЗАВГОРОДНІЙ, докт. вет. наук, чл.-кор. НААН

А.П. ПАЛІЙ, докт. вет. наук

Б.Т. СТЕГНІЙ, докт. вет. наук, академік НААН та РАН

М.В. КАЛАШНИК, аспірант

ННЦ «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків

БІОЛОГІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ L-ФОРМ МІКОБАКТЕРІЙ, ВИДІЛЕНИХ ІЗ БІОМАТЕРІАЛУ

*У результаті досліджень встановлено, що в організмі хворих на туберкульоз тварин збудник *Mycobacterium bovis* може циркулювати у R-, S- і L-формах, які обумовлюють сенсibilізацію морських свинок до туберкуліну й спричиняють у них розвиток туберкульозного процесу. Також з'ясовано, що ріст L-форм мікобактерій на спеціальних живильних середовищах спостерігається на 22,1±1,3 добу після висіву.*

Збільшення виробництва й підвищення якості продуктів тваринництва значною мірою залежать від благополуччя стада щодо інфекційних захворювань, у т. ч. туберкульозу великої рогатої худоби. Туберкульоз завдає значних економічних збитків галузі тваринництва, становлячи постійну загрозу для здоров'я людей. Тому заходи, спрямовані на ліквідацію захворювання, повинні бути всебічними. Важливу роль у виникненні повторних спалахів у раніше оздоровлених господарствах і нових вогнищ туберкульозу відіграють об'єкти довкілля, які контамінуються патогенними мікобактеріями внаслідок виділення збудника з організму хворих тварин [1, 3].

Ефективність ветеринарних протитуберкульозних заходів залежить від своєчасної й точної діагностики захворювання, яка базується на алергічних, бактеріологічних та патолого-анатомічних методах дослідження. Як основний метод прижиттєвої діагностики туберкульозу ВРХ застосовують алергічний [2].

В останні роки в благополучних щодо туберкульозу господарствах нерідко виявляють тварин, які реагують на туберкулін. При їх патолого-анатомічному дослідженні не виявляють характерних для туберкульозу уражень в органах і тканинах, а при бактеріологічному дослідженні біоматеріалу не виділяють збудника туберкульозу [8].

Разом з тим в організмі інфікованих тварин і під дією несприятливих факторів довкілля збудники туберкульозу можуть змінювати ферментативні й біологічні властивості. Через те значно ускладнилась бактеріологічна діагностика захворювання, з'явилися деякі додаткові труднощі, пов'язані з виділенням культур із патологічного матеріалу [7].

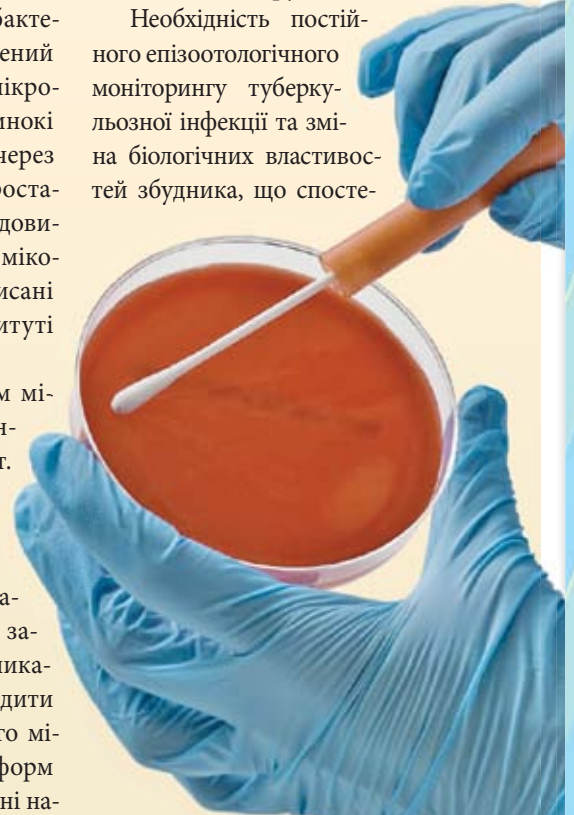
Слід зазначити, що під дією несприятливих екологічних умов, антибіотиків тощо в культурах мікобактерій спостерігається різко виражений поліморфізм. При електронній мікроскопії нерідко виявляють поодинокі округлі тільця, які проходять через бактеріальні фільтри й здатні вирости на штучних живильних середовищах. Їх розглядають як L-форми мікобактерій, які вперше були описані більше ніж півстоліття тому в Інституті ім. Дж. Лістера в Лондоні.

Характерною ознакою L-форм мікобактерій є відсутність клітинної стінки або ж значний її дефект. Тому їхні біологічні властивості дуже відрізняються від властивостей R-форм мікобактерій. Оскільки L-форми частково втрачають клітинну стінку, вони не забарвлюються аніліновими барвниками, а їх мікроскопію слід проводити за допомогою фазово-контрастного мікроскопа. Для культивування L-форм мікобактерій застосовують елективні на-

піврідкі живильні середовища Школьникової та Дорожжкової і менш ушкоджуючий спосіб передпосівної обробки патологічного матеріалу [4].

Основною біологічною властивістю L-форм є їх здатність до реверсії в типову бактеріальну (R) форму збудника. L-форми мікобактерій, які після 1–3 послідовних пасажів *in vitro* на звичайних щільних живильних середовищах реверсують у типову бактеріальну форму, відносять до розряду нестабільних L-форм. L-форми, які реверсії не дають, відносять до розряду стабільних. Нестабільним L-формам відводиться особливе значення, оскільки ревертантні культури, як і типові мікобактерії, можуть зберігати біологічні властивості, в т. ч. вірулентність [5, 6].

Необхідність постійного епізотологічного моніторингу туберкульозної інфекції та зміна біологічних властивостей збудника, що спосте-



рігається останнім часом, ускладнюють бактеріологічну діагностику цього захворювання й обумовлюють широкий комплекс досліджень – мікробіологічних, а також на наявність *L*-форм мікобактерій (особливо у неблагополучних щодо туберкульозу господарствах на заключному етапі оздоровлення від туберкульозної інфекції), визначення їх ролі в етіології захворювання тварин на туберкульоз.

Мета роботи – виділення *L*-форм мікобактерій із біологічного матеріалу від ВРХ, яка реагує на внутрішньошкірне уведення туберкуліну (ППД) для ссавців, вивчення їх біологічних властивостей і визначення епізоотологічного значення в етіології захворювання тварин на туберкульоз.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

Досліди проводили впродовж 2008–2013 рр. у неблагополучних і благополучних щодо туберкульозу ВРХ господарствах України.

Проби біологічного матеріалу (лімфатичні вузли) відбирали окремо від кожної забитої з діагностичною метою тварини й доставляли до лабораторії з вивчення туберкульозу ННЦ «ІЕКВМ» у свіжому або замороженому вигляді. Із кожного окремого лімфатичного вузла відбирали шматочки (по 0,5 г) у ділянці межі здорової та зміненої тканини, подрібнювали й поміщали в стерильну ступку, заливали 3,0 % розчином сірчаної кислоти й залишали на 10–15 хв. Після цього кислоту зливали, а матеріал тричі відмивали стерильним фізіологічним розчином. Шматочки ретельно розтирали зі стерильним піском до однорідної маси й додавали 10–15 см³ стерильного ізотонічного розчину. Отриману завісь фільтрували через стерильні мембранні фільтри.

Для дослідження на наявність *L*-форм мікобактерій отриманий матеріал (фільтрат) пастерівською піпеткою висівали по 0,25 см³ у 10 пробірок із напіврідким середовищем Школьникової. Висіви культивували в термостаті за температури 37±0,5 °С у вертикальному положенні. Для контролю на наявність бактеріальних форм мікобактерій

Таблиця 1 – Культуральне дослідження біологічного матеріалу від сільськогосподарських тварин

Біологічний матеріал	Кількість проб	Виділено культур мікобактерій		
		у <i>R</i> -формі	у <i>S</i> -формі	у <i>L</i> -формі
Від ВРХ	87	26	2	20
Від свиней	27	–	21	14
Усього	114 (100 %)	26 (22,8 %)	23 (20,2 %)	34 (29,8 %)

Примітка: «+» – реакція позитивна; «–» – реакція негативна.

матеріал паралельно засівали за методом Алікаєвої в 4 пробірки зі щільним яєчним середовищем для культивування мікобактерій, поміщали їх у термостат за температури 37±0,5 °С у горизонтальному положенні на 2 доби, потім посіви переглядали на наявність сторонньої мікрофлори. Після цього пробірки закорковували, парафінували й продовжували культивувати в термостаті протягом 3 місяців. Ріст колоній мікобактерій відзначали кожні 5–7 діб.

РЕЗУЛЬТАТИ

ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

З метою виділення *L*-форм мікобактерій було відібрано й досліджено бактеріологічним методом 114 проб біологічного матеріалу від 87 голів ВРХ і 27 свиней, які реагували на внутрішньошкірне уведення туберкуліну (ППД) для ссавців і були забиті з діагностичною метою.

Дані про виділення культур мікобактерій із біоматеріалу наведено в табл. 1.

Із табл. 1 видно, що при культуральному дослідженні біологічного матеріалу від ВРХ на щільному живильному середовищі для культиву-

вання мікобактерій було виділено 26 культур у *R*-формі, первинний ріст яких відзначали на 20–60-ту добу у вигляді дрібних колоній зі зморшкуватою поверхнею крихкої консистенції кольору слонов'ячої кістки, та 2 культури в *S*-формі, які виростили на 10–27-му добу й мали гладеньку поверхню і маслянисту консистенцію (рис. 1).

При мікроскопії мазків, пофарбованих за методом Ціля – Нільсена, в полі зору було виявлено яскраво-червоні короткі кислотостійкі палички із заокругленими кінцями (рис. 2).

Також із лімфатичних вузлів було виділено на напіврідкому середовищі Школьникової культури мікобактерій у *L*-формі, які виростили на 22,1±1,3 добу й виглядали як білуватий ореол у товщі його стовпчика (рис. 3). Ізольовані 10 культур мікобактерій у *L*-формі в 3-му й 4-му пасажах на рідкому живильному середовищі втратили ростові властивості, тоді як інші 10 культивувалися на середовищі Школьникової у 5–6-му пасажах (термін спостереження).

Із 27 проб біологічного матеріалу від свиней було виділено: на середовищі Школьникової – 14 культур мікобактерій у *L*-формі, на яєчному середови-



Рис. 1. Ріст колоній мікобактерій у *S*- та *R*-формах

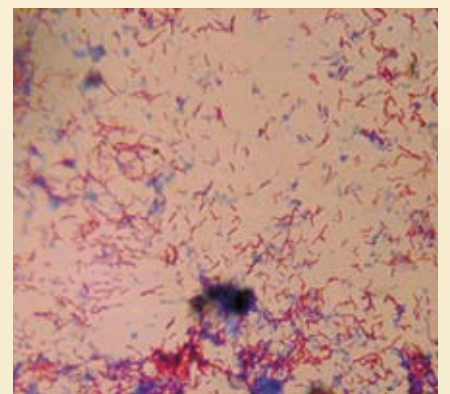


Рис. 2. Мікроскопія мікобактерій



Рис. 3. Ріст L-форм мікобактерій на середовищі Школьнікової

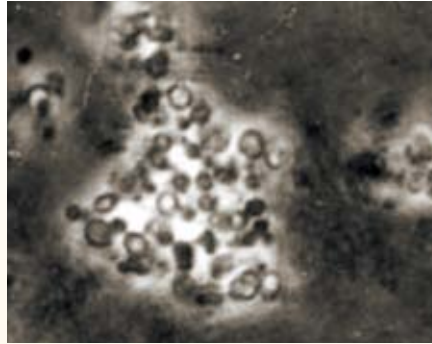


Рис. 4. Фазово-контрастна мікроскопія L-форм мікобактерій

щі для культивування мікобактерій – 21 культуру в S-формі.

При фазово-контрастній мікроскопії ізольованих культур L-форм мікобактерій виявляли зернисті або гігантські майже прозорі структури зі слабко вираженою оболонкою (рис. 4).

Наведені дані свідчать про те, що в організмі хворих і сенсibiliзованих до туберкуліну тварин патогенні й атипові види мікобактерій циркулюють в R-, S- та L-формі.

Біологічні властивості отриманих L-форм культур мікобактерій (3 нестабільні й 3 стабільні культури) вивчали на морських свинках, які до початку досліджу не реагували на внутрішньошкірне введення туберкуліну (ППД) для ссавців. Тварин заражали зависю культур L-форм мікобактерій, виділених із патологічного матеріалу й вирощених на напіврідкому живильному середовищі Школьнікової, в дозі 1,0 см³/гол. На туберкульоз морських свинок досліджували тричі з інтервалом 30 діб алергічним методом, а після завершення досліджу – патолого-анатомічним й бактеріологічним методами.

Результати біологічних досліджень L-форм мікобактерій, виділених від ВРХ, наведено в табл. 2.

Із матеріалів, наведених у табл. 2, видно, що при алергічному дослідженні 18 морських свинки позитивну реакцію на туберкулін (ППД) для ссавців відзначали тільки в 9 тварин на 60-ту й 90-ту добу після інокуляції нестабільних L-форм мікобактерій. При патологічному дослідженні поодинокі туберкульозні ураження було виявлено у 9 з дослідних тварин, а в решти, яким

уводили стабільні L-форми мікобактерій, уражень, характерних для туберкульозу, помічено не було.

При культуральному дослідженні патологічного матеріалу від морських свинки було виділено 6 культур мікобактерій у L-формі. Первинний ріст на середовищі було відзначено на 12–20-ту добу у вигляді білуватого ореолу в його товщі. Методом фазово-контрастної мікроскопії було виявлено овоїдні тільця, деякі з них неправильної округлої форми. На щільному яєчному середовищі для культивування мікобактерій ріст

колоній у R-формі виявлено на 26–32-ту добу від морських свинки, яким інокулювали нестабільні L-форми мікобактерій. При мікроскопії мазків із культур мікобактерій, пофарбованих за методом Ціля – Нільсена, в полі зору мікроскопа було виявлено короткі палички червоного кольору із закругленими краями.

Результати вивчення біологічних властивостей L-форм мікобактерій, виділених від ВРХ, у досліджах на морських свинках (2-й пасаж) наведено в табл. 3.

У заражених L-формами мікобактерій 2-го пасажу (див. табл. 3) морських свинки алергічну реакцію було зареєстровано через 60 діб у 6 тварин, а на 90-ту добу – в 9. Реакція зберігалась до 180-ї доби. При патолого-анатомічному дослідженні лабораторних тварин у 9 випадках у внутрішніх органах було виявлено характерні для туберкульозу ураження.

При культуральному дослідженні патологічного матеріалу від зазначених тварин було виділено 3 культури

Таблиця 2 – Біологічні властивості L-форм мікобактерій, виділених від великої рогатої худоби (1-й пасаж)

Культури L-форм мікобактерій	Морські свинки, гол.	Реакція на туберкулін, через діб			Туберкульозні ураження, гол.	Виділено культуру, через діб	
		30	60	90		R-форма	L-форма
№ 1463	3	–	–	–	–	–	20
№ 1973	3	–	+	+	3	32	12
№ 1975	3	–	+	+	3	26	12
№ 1978	3	–	–	–	–	–	20
№ 5419	3	–	+	+	3	28	20
№ 5498	3	–	–	–	–	–	12

Примітка: «+» – реакція позитивна; «–» – реакція негативна.

Таблиця 3 – Біологічні властивості L-форм мікобактерій, виділених від великої рогатої худоби (2-й пасаж)

Культури L-форм мікобактерій	Морські свинки, гол.	Реакція на туберкулін, через діб						Туберкульозні ураження, гол.	Виділено культуру, через діб	
		30	60	90	120	150	180		R-форма	L-форма
№ 1463	3	–	–	–	–	–	–	–	–	–
№ 1973	3	–	+	+	+	+	+	3	20	–
№ 1975	3	–	–	+	+	+	+	3	20	9
№ 1978	3	–	–	–	–	–	–	3	–	–
№ 5419	3	–	+	+	+	+	+	3	28	20
№ 5498	3	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Примітка: «+» – реакція позитивна; «–» – реакція негативна.

УВАГА! ТРИВАЄ ПЕРЕДПАЛТА НА ЖУРНАЛ НА 2015 РІКІ



в бактеріальній формі, первинний ріст яких на щільному живильному середовищі було відзначено на 20–29-ту добу, а також 2 культури в *L*-формі на середовищі Школьнікової (первинний ріст – на 9–20-ту добу після висіву).

Що стосується морських свинок, яким вводили *L*-форми мікобактерій, виділені з патологічного матеріалу від свиней, то у них не спостерігали реакцій на туберкулін (ППД) для свавців і ААМ. При патолого-анатомічному дослідженні евтанозованих тварин через 3 місяці від початку досліду в органах і тканинах характерних для туберкульозу уражень виявлено не було.

ВИСНОВКИ

1. В організмі хворих тварин збудник туберкульозу *M. bovis* може циркулювати в *R*-, *S*-, *L*-формах і обумовлювати сенсibiлізацію до туберкуліну й спричиняти розвиток туберкульозного процесу.

2. Ріст *L*-форм мікобактерій на живильних середовищах спостерігається

на $22,1 \pm 1,3$ добу. Нестабільні *L*-форми мікобактерій зумовлюють гіперчутливість сповільненого типу та розвиток інфекційного туберкульозного процесу в морських свинок, а стабільні *L*-форми мікобактерій, які циркулюють в їх організмі, туберкульозних змін у внутрішніх органах не викликають.

3. Встановлено, що нестабільні *L*-форми мікобактерій можуть реверсувати в бактеріальну форму.

СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1. **Верещенко Л.В.** Аналіз джерела збудника рецидивів туберкульозу великої рогатої худоби у Запорізькій області [Текст] / Л.В. Верещенко // Вет. медицина України. – 2008. – № 10. – С. 17–18.
2. **Власенко О.А.** Проблеми і перспективи оздоровлення неблагополучних господарств Сумської області від туберкульозу великої рогатої худоби [Текст] / О.А. Власенко // Вет. медицина України. – 2007. – № 7. – С. 13–14.
3. **Высоцкий А.Э.** Контаминация молочно-товарных ферм микобактериями и средства её снижения [Текст]: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03 / А.Э. Высоцкий; [РУП БелНИИЭВ]. – Минск, 2002. – 20 с.
4. **Галатонова А.В.** Свойства *L*-формы микобактерий [Текст] / А. В. Галатонова // Ветеринария. – 1990. – № 2. – С. 32–33.
5. **Гольшевская В.И.** Роль ультрамельких форм микобактерий в патоморфозе туберкулёза [Текст] / В.И. Гольшевская // Проблемы туберкулёза. – 2003. – № 3. – С. 26–30.
6. **Деменчук Л.Г.** Патогенные свойства *L*-формы микобактерий в эксперименте на сельскохозяйственных животных (опыты на морских свинках) [Текст] / Л.Г. Деменчук // Ветеринария. – 2000. – № 3. – С. 782.
7. **Донченко Н.А.** Усовершенствование средств и методов диагностики и профилактики туберкулёза крупного рогатого скота [Текст]: автореф. дис. ... докт. вет. наук: 16.00.03, 16.00.04 / Н.А. Донченко; [ГНУ ИЭВСидВ]. – Новосибирск, 2008. – 36 с.
8. **Палий А.П.** Епізоотологічний моніторинг туберкульозу великої рогатої худоби та науково-експериментальне обґрунтування розробки і застосування засобів дезінфекції [Текст]: автореф. дис. ... докт. вет. наук: 16.00.03 / А.П. Палий; [ІНЦ ІЕКВМ]. – Харків, 2013. – 40 с.

Одержано 5.08.2014

Биологические свойства *L*-форм микобактерий, выделенных из биоматериала. А.И. Завгородний, А.П. Палий, Б.Т. Стегний, Н.В. Калашник

В результате исследований установлено, что в организме больных туберкулёзом животных возбудитель *M. bovis* может циркулировать в *R*-, *S*- и *L*-формах, которые обуславливают сенсibiлизацию лабораторных животных к туберкулину и вызывают у морских свинок развитие туберкулёзного процесса. Также определено, что рост *L*-форм микобактерий на специальных питательных средах наблюдается на $22,1 \pm 1,3$ сутки после посева.

Biological properties of *L*-forms of mycobacterium, selected from biological material. A.I. Zavgordniy, A.P. Paliy, B.T. Stegnyy, N.V. Kalashnik

As a result of undertaken studies it is set that in the organism of patients by tuberculosis of animals causative agent *M. bovis* can circulate in *R*-, *S*- and *L*- forms that stipulate sensitization of laboratory animals to the tuberculin and cause development of tubercular process for guinea-pigs. It is also certain that the height of *L*-forms of mycobacterium's on the special nourishing environments is observed on a $22,1 \pm 1,3$ twenty-four hours after sowing. ○

