

## Список літератури

1. Руденко, Е. В. Питательная среда для культивирования возбудителя американского гнильца пчел [Текст] / Е. В. Руденко // Ветеринария. – 1987. – № 2. – С.72-73. 2. Руденко, Е. В. Об особенностях эпизоотологии американского гнильца пчел и его диагностике [Текст] / Е. В. Руденко // Ветеринария: Респ. межвед. тематич. науч. сб. – К., 1987. – Вып.62. – С.74-76. 3. Basualdo, M. Effect of shaking honey bee colonies affected by American foulbrood on *Paenibacillus larvae* spore loads [Text] / M. Basualdo; M.L.Del Hoyo; A. Lorenzo // J.apic.Res., 2001; Vol. 40, N 2, – P. 65 – 69. 4. Леонтьева, И. А. Среда для культивирования гнильцов [Текст] / И. А. Леонтьева // Пчеловодство. – 2005 – № 2 С. 30-31 5. Гробов, О. Ф. Болезни и вредители медоносных Псел [Текст] / О.Ф.Гробов, А.М. Смирнов, Е.Т. Попов. – М. :Агропромиздат, 1987 – с. 62-65. 6. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees) . [Text] / World organization for animal health; OIE. – 2008. – Vol. II, Sect. 2.9. – P. 963–986.

### COMPARATIVE ESTIMATION OF NUTRIENT MEDIA FOR THE IDENTIFICATION OF AMERICAN FOULBROOD AGENT – CULTURE *PAENIBACILLUS LARVAE SUB. LARVAE*

Stupak L.P.

National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv

*Results of comparative estimation of nutrient media MYPGP, Tomashets, Willis-Gobbs for diagnostics and cultivation of bacterium Paenibacillus larvae sub. larvae are presented in the article.*

УДК 619:579:616-078

### СЕНСИБИЛИЗИРУЮЩИЕ И ПАТОГЕННЫЕ СВОЙСТВА L-ФОРМ МИКОБАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗ БИОМАТЕРИАЛА ОТ КРС И КУР

Тарасова Е.В.

ННЦ «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г. Харьков

*В статье представлены результаты изучения сенсibiliзирующих и патогенных свойств L-форм микобактерий, выделенных из патологического материала, от реагировавшего на туберкулин крупного рогатого скота и кур, в опытах на морских свинках и кроликах.*

В системе профилактики и борьбы с туберкулезом крупного рогатого скота важное значение имеет своевременная и эффективная диагностика. Основными методами диагностики туберкулеза животных в настоящее время являются аллергический, патологоанатомический и бактериологический метод, по результатам которых определяют эпизоотический статус исследуемого поголовья. Диагноз считается установленным, при обнаружении в органах и лимфатических узлах у животных патологоанатомических изменений характерных для туберкулеза, или при получении положительных результатов бактериологического исследования [3, 7, 6].

Вместе с тем, выделение микобактерий из патологического материала связано с определенными трудностями в силу генетических и фенотипи-

ческих особенностей возбудителя. Основные из них является медленный рост культур на искусственных питательных средах, а также способность их к L-трансформации и длительной персистенции возбудителя в измененной форме. L-трансформация микобактерий может происходить под воздействием самых различных факторов внешней среды, применяемых химиопрепаратов, защитных реакций организма, при этом микробная клетка частично или полностью утрачивает свою клеточную стенку [5, 4].

Проблема изменчивости возбудителя туберкулеза имеет не только теоретическое, но и важное практическое значение. L-варианты микобактерий, особенно находящиеся в нестабильной форме, затрудняют прижизненную аллергическую диагностику туберкулеза, а также могут обуславливать латентное течение туберкулезной инфекции, а в отдельных случаях вызывать рецидивы заболевания как у людей так и животных [4, 3].

В последние годы было установлено, что L-формы микобактерий способны сохранять исходную патогенность. В медицинской практики изучением вирулентных свойств L-форм микобактерий выделенных от больных туберкулезом людей, подвергавшихся медикаментозному лечению занимались М.М. Дыхно с соавт. (1982), Ю.А. Макаров (1997) и др. В результате проведенных экспериментальных работ было установлено, что отдельные культуры возбудителя туберкулеза в L-форме вызывали активный туберкулезный процесс, у лабораторных животных, который первично локализуется в легочной ткани, а затем в других органах. Что касается циркуляции L-форм микобактерий в организме с/х животных, птицы и других видов восприимчивых животных, а также их роль в этиологии заболевания, то этот вопрос на сегодня изучен недостаточно и требуют проведения дополнительных исследований.

В связи с этим, перед нами были поставлены следующие задачи: изучить сенсibiliзирующие и патогенные свойства у выделенных L – форм микобактерий от больных туберкулезом КРС и птицы.

**Материалы и методы.** Для выполнения данной задачи были отобраны клинически здоровые морские свинки и кролики, которые до начала опыта не реагировали на внутрикожное введение туберкулина ППД – млекопитающих, для птиц и на аллерген из атипичных микобактерий (ААМ).

Культуры L-форм микобактерий были выделены из патологического материала от реагировавшего на туберкулин крупного рогатого скота принадлежавшие хозяйству из не выясненной эпизоотической ситуацией по туберкулезу. А также L-формы микобактерий которые выделенные из биоматериала от кур экспериментально зараженных культурой микобактерий *M. avium* IEKBM УААН.

Заражение животных проводили культурой L-форм микобактерий второго – третьего пассажа. Культуру отбирали пастеровской пипеткой из среды Школьниковой и отмывали стерильным физиологическим раствором путем центрифугирования в режиме 1500 об/минуту, а взвесь фильтровали через стерильные мембранные фильтры с диаметром пор 0,45 мкм. Полученный таким образом фильтрат вводили морским свинкам внутримышечно, а кроликам – внутривенно в дозе 1 см<sup>3</sup>.

Опытных животных исследовали аллергическим методом на туберкулез трехкратно с интервалом 30 суток. Через 90 и 180 суток после начала эксперимента всех животных подвергали эвтаназии и патологоанатомическому исследованию. Отобранный от морских свинок и кроликов биологический материал исследовали культуральным методом на наличие R, S и L-форм микобактерий.

Из выросших колоний микобактерий, готовили мазки, которые окрашивали по методу Циля-Нильсена и подвергали световой микроскопии в емерсионной системе. Выросшие в толще среды на среде Школьниковой облакоподобные помутнения, исследовали методом фазово-контрастной микроскопии.

**Результаты исследований.** Результаты проведенных аллергических, патологоанатомических, бактериологических исследований представлены в таблице 1.

**Таблица 1** – Результаты изучения биологических свойств L-форм микобактерий выделенных от КРС (1 пассаж).

<i>L-формы микобактерий</i>	<i>Количество морских свинок (гол)</i>	<i>Реакция на туберкулин, через суток</i>			<i>Поражения характерные для туберкулеза</i>	<i>Выделено культур через дней</i>	
		<i>30</i>	<i>60</i>	<i>90</i>		<i>R-форме</i>	<i>L-форме</i>
№ 1	3	-	+	+	+	19	20
№ 2	3	-	+	+	+	26	12
№ 3	3	-	+	+	+	19	12
№ 4	3	-	-	-	-	-	12
№ 5	3	-	-	-	-	-	20
№ 6	3	-	-	-	-	-	20
№ 7	3	+	+	+	+	20	-
№ 8	3	-	-	-	-	34	20
№ 9	3	-	-	-	-	-	20
№ 10	3	-	-	-	-	-	13

Из материалов таблицы видно, что из 30 морских свинок, зараженных культурами микобактерий в L-форме, при исследовании аллергическим методом через 30 суток положительную реакцию вызывала культура № 7 у 2 (6,6 %) животных. Тогда как на 60, 90 сутки от начала эксперимента реакция на (ППД) для млекопитающих была выявлена у 11 (36,6 %) морских свинок зараженных культурой № 1, 2, 3, 7.

При исследовании патологоанатомическим методом через 90 суток после начала эксперимента только в лимфатических узлах (паховых) были выявлены изменения характерные для туберкулеза у 12 (40 %) морских свинок которые были заражены культурой № 1, 2, 3, 7. Из отобранного биоматериала от этих животных на яичной среде для культивирования микобактерий были выделены 6 культур в бактериальной форме и 9 культур в L-форме на среде Школьниковой.

Первичный рост культур из патологического материала на яичной среде для культивирования микобактерий отмечали на 19-34 сутки у культур, которые вырастали в R-форме. При этом интенсивность роста их была не одинаковой. При микроскопии мазков, окрашенных по методу Циль-Нильсена, в поле зрения обнаруживали короткие кислотоустойчивые палочки. При изучении биохимических и биологических свойств изолированные культуры были отнесены к возбудителю туберкулеза *M. bovis*.

Кроме этого, при учете роста посевов из патологического материала на среде Школьниковой в 9 случаях отмечали рост микобактерий в L-форме на 12-20 сутки в виде облакоподобных помутнений в толще среды. При фазово-контрастной микроскопии мазков из выросших культур в поле зрения были видны шаровидные образования, что характерно для L-форм микобактерий.

Из выделенных культур в L-форме микобактерий 6 культур сохраняли ростовые свойства на протяжении 4 последовательных пассажах, тогда как другие 3 культуры утрачивали способность культивироваться на среде Школьниковой после 2 пассажа.

Анализируя материалы таблицы установлено, что возбудитель туберкулеза в бактериальной форме (R-форме) выделено в 50 % проб, тогда как в L-форме микобактерий были выделены в 90 % проб.

Выделенные от морских свинок 6 культуры в L-форм микобактерий, которые сохраняли ростовые свойства на среде Школьниковой, были отобраны для повторного заражения морских свинок, результаты аллергических, патологоанатомических и бактериологических исследований представлены в таблице № 2.

**Таблица 2** – Результаты изучения биологических свойств L- форм микобактерий выделенных от КРС (2 пассаж).

<i>L-формы микобактерий</i>	<i>Количество морских свинок (гол)</i>	<i>Реакция на туберкулин, через суток</i>						<i>Поражения характерны для туберкулеза</i>	<i>Выделено культур через суток</i>	
		<i>30</i>	<i>60</i>	<i>90</i>	<i>120</i>	<i>150</i>	<i>180</i>		<i>R-форме</i>	<i>L-форме</i>
№ 10	3	-	-	+	+	+	+	+	25	12
№ 7	3	-	-	+	+	+	+	-	28	12
№ 8	3	-	-	-	-	-	-	-	28	12
№ 1	3	-	+	+	+	+	+	+	28	20
№ 2	3	-	-	+	+	+	+	+	20	9
№ 3	3	-	+	+	+	+	+	-	20	-

Анализируя материалы представленные в таблице № 2, при исследовании морских свинок которые были заражены культурой в L-форме пассажированной было установлено, что сенсibilизация организма жи-

вотных к туберкулину (ППД) для млекопитающих на 60-е сутки вызывала культура № 4, 6 у 6 морских свинок, а на 90-е сутки после заражения отмечали реакции на туберкулин у других 15 животных зараженных культурой № 1, 2, 4, 5, 6, которая сохранялась до конца эксперимента (180 суток). Характер реакций был различным, от незначительного до характерно выраженного воспалительного отека, размерами от 5 x 8 до 11 x 16 мм. У морских свинок зараженных (L-формой) культурой № 3 реакция на внутрикожное введение туберкулина на протяжении опыта 180 суток наблюдения была отрицательной.

При патологоанатомическом исследовании через 180 дней от начала опыта, характерные для туберкулеза изменения мелкие, единичные очажки некроза были выявлены в печени, а также отмечали увеличение паховых лимфатических узлов в 3-5 раз у морских свинок зараженных культурой № 1, 4, 5.

Из отобранного патологического материала на плотной питательной среде для культивирования микобактерий было выделено 6 культур в бактериальной R-форме. Первичный рост, которых отмечали на 20-28 день, а при микроскопии мазков окрашенных по методу Циль-Нильсена в поле зрения обнаруживали короткие, кислотоустойчивые палочки, красного цвета.

Также из того же биоматериала взятого от морских свинок, которым вводили культуру № 1, 2, 3, 4, 5, было выделено культуры и в L-форме, первичный рост которых на полужидкой среде Школьниковой наблюдали на 9-20 сутки. В мазках при фазово-контрастной микроскопии в поле зрения были выявлены шаровидные образования в отдельных случаях гигантские зернистые тела. При последовательных 2 – 3 пассажах выделенные культуры в L-форм микобактерий утрачивали свои ростовые свойства на среде Школьниковой.

Биологические свойства выделенных L-форм микобактерий от кур изучали в опытах на кроликах, результаты аллергических, патологоанатомических и бактериологических исследований представлены в таблице 3

**Таблица 3** – Результаты изучения биологических свойств L-форм микобактерий выделенных от кур в исследования на кроликах

<i>L-формы микобактерий</i>	<i>Количество кроликов (гол)</i>	<i>Реакция на туберкулин, через суток</i>			<i>Поражения характерные для туберкулеза</i>	<i>Выделено культур через дней</i>	
		<i>30</i>	<i>60</i>	<i>90</i>		<i>S-форма</i>	<i>L-форма</i>
№ 1	3	-	-	+	+	18	6
№ 2	3	-	+	+	+	18	6
№ 3	3	-	-	+	+	24	6

Из представленных в таблице данных видно, что на 60 суток после заражения реакции на туберкулин очищенный (ППД) – для птиц были

положительными у двух животных, которых были заражены культуру микобактерий в L-форме № 2, а у остальных животных реакция на туберкулин была отрицательной. Тогда как через 90 суток после начала опыта реакции на внутрикожное введение туберкулина были выявлены у всех 9 кроликов.

При патологоанатомическом исследовании через 90 суток после начала опыта у подвергнутых евтоназии животных отмечали увеличение печени и селезенки в 1,5-2 раза без видимых туберкулезных изменений.

При культуральном исследовании, отобранного от кроликов патологического материала, были выделены культуры в бактериальной форме (S) на 18-24 день после посева, а в мазках окрашенных по методу Циль-Нильсена, в поле зрения обнаруживали тонкие, прямые с закругленными краями, ярко – красного цвета кислотоустойчивые палочки.

Из этого биоматериала также были выделены культуры микобактерий в L-форме на среде Школьниковой, первичный рост которых, отмечали на 6 день после посева. При фазово-контрастной микроскопии мазков из выросших культур были обнаружены шаровидные образования различной величины.

**Выводы: 1.** Изолированы от КРС культуры микобактерий в L-форме обладали сенсибилизирующими и патогенными свойствами для лабораторных животных.

**2.** Выделенные L-формы *M. avium* хорошо культивировались и реверсировали в бактериальную форму.

#### Список литературы

1. Бакулов, И.А., Зеленцова, Т.Я. – Проблема L-форм бактерий в ветеринарии // Ветеринария №10, 1980. 2. Галатова, Л.В. Свойства L-форм микобактерий / Л.В. Галатова, М.И. Гертман, А.А. Нетров // Ветеринария. – 1990. – № 2. – С. 32-33. 3. Рубцова, И.Н. Измененные формы микобактерий в организме животных и их значение в бактериологической диагностике туберкулеза. / Рубцова И.Н. // Бюллетень ВИЭВ. – 1983. – Вып. 51. – М. – С. 32. 4. Тимаков, В.Д., Каган Г.Я. Биология L-форм бактерий. М.: Медицина. 1961. – С. 232. 5. Федосеев, В.С. L-трансформация микобактерий / В.С. Федосеев, И.Н. Рубцова, Н.Г. Кириленко и др. // Ветеринария. – 1985. – № 12. – С. 30-324. 6. Шеткин, А.А. Реверсия L-форм микобактерий туберкулеза бычьего вида // А.А. Шеткин // Научн.-техн. бюл. Всесос. Академии сельского хозяйства им. Ленина, Сиб. Отд.-ние. – 1985. – Вып. 30. – С. 37-39. 7. Юдин, Г.А. Роль непатогенных кислотоустойчивых микобактерий в диагностике туберкулеза крупного рогатого скота и некоторые методы их идентификации: Автореф. дис. ...канд.вет.наук – М., 1966. – 18 с.

### SENSITIZING AND PATHOGENIC PROPERTIES OF MYCOBACTERIA L - FORMS ISOLATED FROM CATTLE AND CHICKENS BIOMATERIAL

Tarasova E.V.

NSC «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkov

*Results of the study of sensitizing and pathogenic properties of mycobacteria L - forms isolated from biomaterial from cattle and chickens reacting on tuberculin, in experiments on cavies and rabbits are presented in the article.*