

АСПЕКТИ МОРФОГЕНЕЗУ ТА КУЛЬТУРАЛЬНІ Й ТИНКТОРІАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ *M. BOVIS* ДИСОЦІАТИВНИХ ФОРМ ЗА РІЗНИХ ТЕМПЕРАТУР КУЛЬТИВУВАННЯ

Ткаченко О.А., Шендрік І.М., Місків В.В., Ковальов А.В.

Дніпропетровський державний аграрний університет, м. Дніпропетровськ

Мікобактерії взагалі, й *M. bovis* зокрема, володіють генетично закладеною здатністю суттєво змінювати як фенотип, так і генотипові властивості. Такі зміни можуть відбуватися при дії факторів довкілля й незалежно від них, що стверджує лабільність закладеного в мікробній клітині геному з дремаючими й активними та активуючими оживлення генами (grf) [1, 2, 5]. Саме вони визначають ту чи іншу здатність мікобактерій на певній стадії розвитку, зберігаючи високу ймовірність реверсії у вихідну чи конверсії у наступну нову форму, з чітко вираженими постійними, генетично закріпленими або з тимчасовими (фенотиповими) ледь помітними властивостями: змінюється морфологія мікобактерій, культуральні, біохімічні й інші властивості [3].

Метою роботи було з'ясувати морфогенез і біологічні властивості L- та інших форм дисоціантів *M. bovis*, культивованих за температури 3 і 37 °С.

Матеріал і методи досліджень. Роботу виконували в навчально-дослідній лабораторії кафедри епізоотології ДДАУ з використанням змінених форм одного штаму *M. bovis*, одержаних у 118 пасажів через середовище Левенштейна-Йенсена (рН 7,1–7,2) за температури культивування 37 °С й витриманих з початковим ростом поодиноких колоній (118 субкультура) в умовах температури 2–3 °С упродовж 20 місяців. Досліджували ізольовані колонії в динаміці наступних 60-ти пересівів. А саме: швидкість росту культури, морфологічні ознаки, тинкторіальні (мазки фарбували за методом Ціля-Нільсена) властивості змінених форм мікроорганізмів, культивованих за 3 і 37 °С. Для контролю в досліді використовували *M. bovis* патогенного материнського штаму. У дослідженнях застосовували методики, передбачені відповідними положеннями [4].

Результати досліджень та їх обговорення. Вивчаючи ріст мікобактерій на щільному яєчному середовищі однієї пробірки за температури 3 °С після 118 разового пасажування через середовище з рН 7,1–7,2 відмічено, що за 20 місячний термін впливу цього температурного режиму культивування характер культури та кількісний склад колоній суттєво змінився: до розміщення культури в умови низької плюсової температури зафіксовано 5 дрібних колоній, після – наліт, одна велика шорстка колонія та 10 дрібних. Мікроскопією мазків, приготвлених з окремих колоній, які сформувалися в умовах культивування 37 та 3 °С, виявлено кислотостійкі короткі, товсті й тонкі, прямі й вигнуті з заокругленими кінцями та вираженою зернистістю палички, які розміщувалися скупченнями. Провівши посів на живильне середовище зависі мікобактерій, приготвленої з ізольованих колоній, та культивуючи за температури 3 °С, на 12 добу виявлено слабкий ріст окремих дрібних правильної форми гладеньких сіро-білого кольору колоній (визначених нами як друга генерація субкультури), які в подальшому формували суцільний ріст по лінії посіву. Мікроскопією мазків, приготвлених з культури, встановлено неацитостійкі овали (L-форми) з різною оптичною щільністю поверхні та поодинокі ацитостійкі елементарні тільця. У контролі *M. bovis* сотої субкультури патогенного штаму за температури 3 °С росту не виявили.

Висіявши на середовище шість пробірок зависі мікобактерій, приготвлених з культури другої генерації й культивуючи за 3 і 37 °С, первинний ріст вологих кремкових колоній виявлено на 11 і 25 добу спостереження відповідно. Мікроскопією мазків, приготвлених з колоній за вказаних температур, встановлено як неацитостійкі овали з різною оптичною щільністю поверхні, тобто L-форми, так і ацитостійкі елементарні тільця.

Провівши сім прямих пасажів досліджуваних мікроорганізмів через щільне живильне середовище та культивуючи за температури 3 і 37 °С, реєстрували ріст культури на 5 та на 4 добу відповідно. За цього мікобактерії в першому випадку продукували помаранчевий, в другому – кремковий пігмент. Мікроскопією мазків, приготвлених з культур, виявила неацитостійкі довгі й короткі, товсті й тонкі, вигнуті й прямі із заокругленими кінцями зернисті палички та ацитостійкі елементарні тільця й L-форми за 3 °С та L-форми й інші утворення за 37 °С культивування.

Наступні десять пасажів мікобактерій досліджуваних субкультур через щільне живильне середовище мікобактерій показали суттєве пришвидшення формування колоній порівняно з 10-ю генерацією, тільки за температури культивування 37 °С – з 4 до 2 діб. Мікроскопією мазків, приготвлених з культур, засвідчила, що за температури культивування 3 °С генеруються неацитостійкі, довгі й короткі, тонкі вигнуті й прямі з округленими кінцями зернисті палички, L-форми (овали) та ледь червонуваті поодинокі елементарні тільця, за 37 °С – неацитостійкі, довгі, але переважно короткі зернисті вигнуті й прямі палички, L-форми та ацитостійкі елементарні тільця.

Узагальнюючи динаміку морфологічних ознак, тинкторіальних властивостей та характер росту культур змінених форм *M. bovis* (у тому числі L-форм), незаперечним є те, що в умовах низької плюсової температури (3 °С) у часі генеруються, на фоні стабільності культури, неацитостійкі зерна, зернисті палички, зі зменшенням їх кількості, порівняно з вихідною культурою, L-форми. В умовах термостата на фоні зменшення кількості та зміни морфології L-форм з'являються неацитостійкі зерна, короткі й ниткоподібні палички та поодинокі червонуваті елементарні тільця, які, напевно, змінюють характер росту культури. А саме: якщо за відсутності елементарних тілець культура у вигляді суцільного росту по лінії висіву зависі досліджуваних мікроорганізмів інтенсивно збільшувалася в часі, то з появою елементарних тілець, через 4–5 діб культивування, культура начебто провалювалася під її тиском в середовище. Із часом суцільний ріст культури витончувався й через 2–4 тижні середовище «стікало», що свідчить про незвичайні, особливі властивості у цих форм *M. bovis*.

Пересіявши досліджувані мікроорганізми та оцінивши характер росту культур до 26-ї (середовище з рН 7,1–7,2) і наступних з 27-ї по 37-му генерації відмічено ріст колоній за 3 °С помаранчевого кольору. Вивчаючи під імерсією мазок, приготвлених з культури 26-ї генерації мікобактерій встановлено появу значної кількості синіх овалоподібних форм (з темними зернами в центрі) з різною оптичною щільністю поверхні, дрібних зерен, інколи з червоним відтінком, які розташовуються тільки навколо і біля овалів (синіх). Подібне виявлено в мазку, приготвленому з культури 33 та 37-ї генерації.

Наступними пересівами встановлено, що з 41 по 45 ріст культури розпочинався з 4 доби, як правило, у вигляді кремкового нальоту по лінії посіву з наступним формуванням окремих великих сухих колоній помаранчевого кольору. Того ж часу 45-та субкультура виявилася слизовою та в'язкою. У мазку, приготвленому з субкультури цього пересіву, виявлені неацитостійкі зернисті та неацитостійкі великі видовжені овали з однією щільністю поверхні, з яких «виштовхуються» короткі палички. Далі п'ять пересівів культура залишалася слизовою, а її ріст через одну – шість діб, змінював пігмент з помаранчевого на жовтуватий.

У полі зору мазка, приготовленому з культури 50 та 60-го пересіву, виявлено практично такі ж форми мікроорганізмів.

Висновки. Селекційована раса змінених форм *M. bovis*: L-форми за пасажів через щільне середовище за температури 3 °С, змінюючись морфологічно, переходять у некіслотостійкі паличкові, кокові форми, за 37 °С – у некіслотостійкі (інколи кислотостійкі) елементарні тільця (зерна); за температури 3 °С ріст на щільному живильному середовищі помаранчевої культури відбувається на другу-третю добу культивування, за 37 °С – жовтуваті культури в такі ж строки, але після 20 пересівів відбувається слабкий ріст культури за цієї температури і з часом зникає.

Список літератури

1. Біологічні властивості дисоціативних форм *M. bovis*: культуральні особливості за температур 3 і 37 °С [Текст] / О.А. Ткаченко [та ін.] // Вет. медицина України. – 2010. – № 3. – С. 33–35. 2. Біологічні властивості дисоціативних форм *M. bovis*: морфологічні ознаки та тинкторіальні властивості за температур 3 та 37 °С [Текст] / О.А. Ткаченко [та ін.] // Вет. медицина України. – 2010. – № 12. – С. 27–30. 3. Лабораторна діагностика туберкульозу тварин: практичний посібник [Текст] / О.А. Ткаченко [та ін.]. – Дніпропетровськ: Вид-во «Свідлер А.Л.», 2010. – 208 с. 4. Настанова по діагностиці туберкульозу [Текст] / В.М. Манченко [та ін.]. – К, 1994. – 39 с. 5. Mutants of *Mycobacterium tuberculosis* lacking three of the five *rfp*-like genes are defective for growth in vivo and for resuscitation in vitro [Text] / K.J. Downing [et al.] // Infect. Immun. – 2005. – Vol. 73. – P. 3038–3043.

ASPECTS OF MORPHOGENESIS OF *M. BOVIS* DISSOCIATIVE FORMS AT DIFFERENT TEMPERATURES CULTIVATION

Tkachenko A.A., Shendrik I.N., Miskiv V.V., Kovalev A.V.

Dnepropetrovsk State Agrarian University, Dnepropetrovsk

M. bovis, which differ in biological properties of pathogenic strains were considered. Selection race of modified forms of mycobacteria with special properties that may be promising for the construction of anti-tuberculosis vaccine.

УДК 619:616.98:578:616-085.371:619.5

АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА ВИРУСА НЬЮКАСЛСКОЙ БОЛЕЗНИ В СОСТАВЕ АССОЦИИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ

*А. Харитх Абдулла**

Харьковская государственная зооветеринарная академия, г. Харьков

Птицеводство – важная отрасль народного хозяйства, которая способна в короткое время обеспечить население высококачественной продукцией. Сохранность птицепоголовья является важнейшим заданием для ветеринарных специалистов птицефабрик. С целью решения этого вопроса используют различные схемы специфической профилактики, которые предусматривают первичную (однократную или многократную) вакцинацию молодняка птицы живыми вакцинами с последующей вакцинацией инактивированными препаратами. Способы реализации такой схемы могут варьировать в зависимости от эпизоотической ситуации, которая складывается в птицеводческом предприятии, его направление продуктивности и рекомендации производителей вакцин [1, 2, 3, 4].

Вследствие огромного экономического ущерба, наносимого отрасли птицеводства вирусом ньюкаслской болезни, Международное эпизоотическое бюро отнесло данное заболевание к группе наиболее опасных [5, 6]. При отсутствии эффективного лечения данного заболевания широко применяется вакцинация – как один из важнейших технологических приёмов, позволяющих выработать иммунитет у восприимчивой птицы. Для специфической профилактики ньюкаслской болезни применяют живые вакцины, содержащие лентогенный штамм вируса, а также инактивированные вакцины. Чаще всего, в качестве вакцинных штаммов используют штаммы «Ла-Сота», «V₁» и «Бор-74». Как правило, в качестве инактивированных вакцин используют многовалентные препараты. Поэтому исследования направленные на изучение антигенных свойств компонентов многовалентных вакцин имеют большое практическое значение.

В статье приводятся данные об антигенной активности вируса НБ как компонента отечественной ассоциированной инактивированной вакцины для профилактики ньюкаслской болезни, инфекционного бронхита курей и синдрома снижения яйценоскости.

Материалы и методы. На первом этапе изучали биологические свойства компонентов, входящих в состав вакцины. Для этого проводили титрацию вирусов НБ и ИБК на куриных эмбрионах (КЭ), а вируса ССЯ – на утиных эмбрионах (УЭ). С этой целью делали десятикратные разведения вирусосодержащей жидкости на фосфатно-солевом буфере с добавлением антибиотиков.

Каждым разведением заражали по 4 эмбриона. Расчет инфекционной активности проводили по формуле Рида и Менча. Инактивацию инфекционных свойств вируса проводили формалином в конечной концентрации 0,5 % при температуре 37 °С в течение 24 часов (вирус ИБК) и этиленгликолем в конечной концентрации 0,2 % (НБ и ССЯ).

Контроль полноты инактивации проводили путем заражения КЭ и УЭ соответствующими вирусами в течение 3 пассажей. При этом обращали внимание на наличие гемагглютинирующей активности экстраэмбриональной жидкости (для вирусов НБ и ССЯ) и патологических изменений эмбрионов (вирус ИБК).

Для приготовления экспериментальных серий вакцины использовали адьювант «Montanide ISA-70» (Seppic, Франция) с соотношением антигенов и адьюванта 30:70.

С целью обеспечения стабильности эмульсии компоненты смешивали в течение 10–15 минут путем интенсивного перемешивания до образования первичной эмульсии, а после этого – путем высокоскоростного перемешивания на лабораторном эмульгаторе с частотой оборотов 1500 об/мин в течение 5 минут. Полученный вакцинный препарат хранили при температуре (4–8) °С в условиях холодильной камеры.

Изучение реактогенных свойств вакцины проводили на курах-молодках 70-суточного возраста. Для этого внутримышечно в область грудных мышц инокулировали препарат в объеме 0,5 см³.

Определение антигенных свойств компонентов вакцины проводили на курах-молодках 70-суточного возраста, часть которых иммунизировали внутримышечно в дозе 0,5 см³, а 10 кур оставались не иммунизированными в качестве контрольной группы. Отбор крови с целью получения сывороток проводили до вакцинации, а также через 14, 30, 45, 60, 90 и 120 суток после ее проведения. Контроль наличия антител к вирусу НБ определяли в реакции задержки гемагглютинации (РЗГА).

* Научный руководитель – Стегний Б.Т. доктор вет. наук, профессор, академик НААН и РАСХН