



УДК 616.98:579.873.21+614.48

Біологічні властивості дисоціативних L- та інших форм *Mycobacterium bovis*

О.А. Ткаченко¹, П.О. Давиденко¹, В.В. Зажарський¹, В.В. Бригадиренко²

¹Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет, Дніпропетровськ, Україна

²Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, Дніпропетровськ, Україна

Селекційовано расу змінених форм мікобактерій з особливими властивостями, що можуть виявитися перспективними для конструювання протитуберкульозної вакцини. Встановлено, що персистенція досліджуваних мікроорганізмів (27-ма субкультура неацидотостійких паличок і L-форм) в організмі морських свинок триває дев'ять (період досліду) і більше місяців. Проте із суспензії, приготовленої із макроскопічно незмінених органів дослідних тварин, виділено кислотостійкі елементарні тільця (зерна) та типові морфологічні форми палички, які на щільному живильному середовищі утворили на третю добу помаранчеву культуру. Інокуляція виділених кислотостійких мікобактерій (культура-ревертант) морським свинкам (1 мг/см²) не супроводжувалася розвитком алергічного стану (алергічна реакція на ППД-туберкулін (протеїн пурифайд дериват – сухий очищений білок) для свавців та ААМ (алерген з атипичних мікобактерій) через 30, 60 і 90 діб негативна), проте з органів еванізованих через три місяці дослідних тварин виділено кислотостійкі мікобактерії, які на третю добу утворювали культуру помаранчевого кольору. Багаторазові пасажі через штучне живильне середовище (щільне), тривале перебування (20 місяців) за низької плюсової температури змінили генетичний баланс, що забезпечило виживання бактерій внаслідок втрати одних (характерних для патогенного мікроорганізму) та набуття інших (зокрема атипичних) властивостей, частково притаманних іншим мікобактеріям. У той же час персистенція в організмі морських свинок типових морфологічних кислотостійких форм (палички), які реверсували з L-форм, не супроводжується розвитком захворювання. Вони зберігають здатність утворювати пігменти та утворюють колонії (культура-ревертант) на щільному живильному середовищі починаючи з першої генерації (з біологічного матеріалу морських свинок) на другу добу культивування. Втрата сенсibiliзувальної здатності у мікобактерій, багаторазово пасажованих і персистуючих в організмі морських свинок, може свідчити (звичайно, тільки певною мірою) про втрату імуногенної здатності, оскільки відомо, що розвиток алергічної (туберкульозної) реакції та її інтенсивність свідчать про імунологічну перебудову макроорганізму (розвиток інфекційного процесу) з набуттям специфічної стійкості. Виявлено залишкову вірулентність досліджуваних змінених форм *Mycobacterium bovis* із можливим формуванням специфічного протитуберкульозного імунітету без розвитку необхідного рівня, який виявлявся діагностикомом алергічного стану, та утворення виразки на ділянці уведення зависі мікобактерій. Бактеріоскопія мазків-відбитків з органів еванізованих (через 80 діб) тварин виявила неацидотостійкі палички, зерна-тільця. У контролі маса тіла тварин тенденційно збільшується, а бактеріоскопічні дослідження (мазки-відбитки) виявляються негативними. Мікобактерії з новими, генетично закріпленими властивостями володіють здатністю стимулювати доброякісний інфекційний процес без розвитку алергії. Можливо, згасання активності генів, відповідальних за патогенні властивості, які визначаються окисно-відновними процесами (дегідрогеназна, каталазна активність тощо) та генами, які перебували в неактивному стані, інтенсифікують метаболічні процеси синтезу пігменту з пригніченням дії факторів (токсинів) патогенності. Не встановлено залежності між швидкістю розмноження (строки утворення колоній) та патогенністю, оскільки вихідна материнська культура (третя генерація) досліджуваних змінених форм *M. bovis* володіла високою вірулентністю та формувала колонії на другу-третю добу, не утворюючи пігменту та не володіючи вираженою дегідрогеназною та каталазною активністю. У статті розглянуто штами *M. bovis*, відмінні за біологічними властивостями від патогенних штамів.

Ключові слова: дисоціативні форми *Mycobacterium bovis*; ліпіди; середовище; температура

Дніпропетровський державний аграрно-економічний університет, вул. Ворошилова, 25, Дніпропетровськ, 49027, Україна
Dnipropetrovsk State Agrarian-Economic University, Voroshilov Str., 25, Dnipropetrovsk, 49027, Ukraine
Tel.: +38-050-58-76-372. E-mail: zazharsky@yandex.ru

Дніпропетровський національний університет імені Олеся Гончара, пр. Гагарина, 72, Дніпропетровськ, 49010, Україна
Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Gagarin Ave., 72, Dnipropetrovsk, 49010, Ukraine
Tel.: +38-050-93-90-788. E-mail: brigad@ua.fm

Biological properties of dissociative L- and other forms of *Mycobacterium bovis*

A.A. Tkachenko¹, P.O. Davydenko¹, V.V. Zazharskiy¹, V.V. Brygadyrenko²

¹Dnipropetrovsk State Agrarian-Economic University, Dnipropetrovsk, Ukraine

²Oles Honchar Dnipropetrovsk National University, Dnipropetrovsk, Ukraine

A race of modified forms of mycobacteria with special properties that can be promising for the construction of TB vaccines was selected. It was found that the persistence of the researched microorganisms (27th subculture of acid-fast bacillus and the L-form) persisted for nine months (the period of research) and longer in the bodies of guinea pigs. However, from the suspension prepared from macroscopically unchanged organs of the experimental animals we found acid-proof elementary bodies (grains) and bacilli of typical morphological forms, which formed an orange culture on the nutrient medium on the third day after suspension seeding. The inoculation of guinea pigs with isolated acid-proof mycobacteria (culture-revertant) (1 mg/cm³) was not accompanied by the development of allergic condition (allergic reaction to the tuberculin and AAM was negative at 30, 60 and 90 days); however, acid-proof bacilli, which formed an orange culture, were isolated on the third day from experimental animals which had been subjected to euthanasia. Multiple passages through the artificial culture medium (dense), prolonged exposure (20 months) at low plus temperature changed the genetic balance, ensuring their survival as a result of the loss of some (specific to the pathogen) and the acquisition of new properties (especially atypical) which are partly inherent in other mycobacteria. At the same time, the persistence in the body of guinea pigs of typical morphological acid-proof forms (bacilli) that reverse from L-forms was not accompanied by the development of the disease. They are chromogenic and retain the ability to form colonies (culture-revertant) on dense nutrient medium from the first generation (from biological material of the guinea pigs) on the second day of cultivation. The loss of sensitization ability of *Mycobacterium bovis* which were passaged many times and persistent in the body of guinea pigs can probably testify to the loss of immunogenic capacity, since the development of allergic (tuberculin) reaction, as well as its intensity, indicates an immunological restructuring of the microorganism (the development of an infection) with the parallel acquisition of the specific resistance. We observed a residual virulence of the researched modified forms of *M. bovis* with the possible formation of specific anti-TB immunity without development of the necessary level, which was the indicator of allergic condition and ulceration of the site where the suspension of mycobacteria was introduced. Microscopy of smears of organs of the euthanized animals (after 80 days) revealed acid-nonproof bacilli, seeding cells. In the control, the weight of the animals tended to increase while the bacterioscopic research (smears) proved negative. Mycobacteria with new, genetically fixed properties have the ability to stimulate benign infectious process, without the development of allergies to the level required for the detection by PPD- for mammals AAM. However, it should be noted that perhaps the extinction of the activity of genes responsible for the pathogenic properties, which are determined by redox processes (dehydrogenase, catalase activity, etc.) and genes which were in a dormant state, activate metabolic processes of pigment synthesis with inhibition of the action of pathogenic factors (toxins). We did not find a relationship between the rate of reproduction (duration of colony formation) and pathogenicity because the original parent culture (third generation) of the investigated modified forms of *M. bovis* had a high virulence and formed colonies on the second or third day without forming pigment and did not express dehydrogenase and catalase activity. In this article we discuss strains of *M. bovis* which differ in biological properties from pathogenic strains.

Keywords: dissociative forms of *Mycobacterium bovis*; lipids; medium; temperature

Вступ

Мікобактерії взагалі й *Mycobacterium bovis* зокрема володіють генетично закладеною здатністю суттєво змінюватися як фенотипічно, так і генотипно: втрачаючи деякі антигени з одночасною появою інших, які для мікобактерій взагалі не нові (O'Reilly et al., 1995; Glickman et al., 2001; Anaelom et al., 2010; Perez-Lago et al., 2014). При цьому зміни можуть відбуватися за дії факторів довкілля та незалежно від них, що підтверджує лабільність закладеного в бактеріальній клітині геному з «дрімаючими» й активними та активувальними генами (grf) (Yuan et al., 1996; Voskuil et al., 2003; Tufariello et al., 2004; Downing et al., 2005; Sherman et al., 2005).

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 тимчасовими (фенотипічними) ледь помітними властивостями: змінюється морфологія мікобактерій, культуральні, біохімічні та інші властивості, ліпідний склад (Krauss et al., 2003; Pavlik et al., 2004; Davies, 2006; De la Rúa-Domenech, 2006). Зважаючи на такі механізми, мікобактерії (зокрема *M. bovis*) залишають багато нез'ясованих питань, пов'язаних у першу чергу з морфологією мікробної клітини, її біологічною

активністю, здатністю набувати атипичних властивостей. Важливі у цьому напрямі дослідження L- та інших форм *M. bovis* дисоціантів зі втраченою (зниженою або втраченою) сенсibiliзувальною здатністю, які розмножуються за температури 3 °C у динаміці пасажів через щільне середовище, оскільки праць такого спрямування у доступній нам літературі не знайдено. Тому мета цієї статті – з'ясувати біологічні властивості L- та інших форм дисоціантів *M. bovis*, культивованих за температур 3 і 37 °C.

Матеріал і методи досліджень

Експерименти виконували в навчально-дослідній лабораторії кафедри епізоотології Дніпропетровського державного аграрно-економічного університету з використанням змінених форм одного штаму *Mycobacterium bovis*, одержаних у 118-му пасажі через середовище Левенштейна – Йенсена (рН – 7,1–7,2) за температури культивування 37 °C та витриманих із початковим ростом поодиноких колоній (118-та субкультура) за температури 3 °C упродовж 20 місяців. Досліджували ізольовані колонії в динаміці послідовних 60 пересівів. Аналізували швидкість росту культури, пігментоутворення за зміни рН середовища, морфологічні ознаки, тинкторіальні (мазки фарбували за методом Ціля – Нільсена) властивості змінених форм мікроорганізмів, культиво-

ваних за 3 і 37 °С, ріст культури різних генерацій мікобактерій на простих живильних середовищах, на середовищі з умістом 0,5 і 1,0 мг/см³ саліциловокислого натрію.

Загальновідомими методами досліджували дегідрогеназну та каталазну активності змінених мікобактерій вихідних культур і їх ревертантів, виділених з органів морських свинок, в організм яких інокульовано досліджувані *M. bovis*.

Для з'ясування кількісного та якісного вмісту вільних жирних кислот хроматографічним методом дослідили мікобактерії вихідних вірулентних культур (2, 59, 100), культивованих за 37 °С, та дисоціативних форм, культивованих за 3 і 37 °С (Haddad et al., 2004; Thoen et al., 2014). Із метою встановлення у тривалому досліді сенсibiliзуювальної здатності з використанням симультанної проби (ППД для ссавців та ААМ) та інших особливостей мікобактерій, пасажовані мікроорганізми, накопичені на щільному середовищі за температури 3 °С, інокульовали (разово в дозі 1 мг/см³) чотирьом морським свинкам, з яких дві евтаназували через три, а інших – через дев'ять місяців від початку досліду, з наступним бактеріологічним дослідженням біологічного матеріалу від них і повторною інокуляцією виділеної культури (ревертант) дослідним морським свинкам.

Можливість викликати інфекційний процес туберкульозу досліджуваними мікобактеріями вивчали шляхом дворазової інокуляції (1 мг/см³ з інтервалом через 1,5 місяця) свинкам мікобактерій, культивованих за 3 і 37 °С. Реакцію макроорганізму на введені мікобактерії оцінювали кожні 10 діб. Визначали масу тіла, строки формування виразки в ділянці уведення зависі мікобактерій, розвиток підвищеної чутливості сповільненого типу (симультанна проба з ППД для ссавців кожні 30 діб) та патолого-анатомічні зміни (через три місяці від початку другого уведення зависі мікроорганізмів). Для контролю в досліді використовували *M. bovis* патогенного материнського штаму.

У дослідженні застосовували методики, передбачені відповідними положеннями (Haddad et al., 2004; Thoen et al., 2014).

Результати 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 відмітили, що за 20-місячний термін впливу цього температурного режиму культивування характер культури та кількісний склад колоній суттєво змінився. До розміщення культури в умовах низької температури зафіксовано п'ять дрібних колоній, після – наліт, одна велика шорстка колонія та десять дрібних. Мікроскопією мазків, приготовлених з окремих колоній, які сформувалися в умовах культивування 37 та 3 °С, виявлено кислотостійкі короткі, товсті та тонкі, прямі та вигнуті із заокругленими кінцями та вираженою зернистістю палички, які розміщувалися скупченнями. Провівши посів на живильне середовище зависі мікобактерій, приготовленої з ізолюваних колоній, та культивуючи *M. bovis* за температури 3 °С на 12-ту добу, виявили слабкий ріст окремих поодиноких дрібних правильної

форми гладеньких сіро-білих колоній (визначених нами як друга генерація субкультури), які у подальшому формували суцільний ріст по лінії посіву (рис. 1).



Рис. 1. Культура *M. bovis* другої генерації за 3 °С

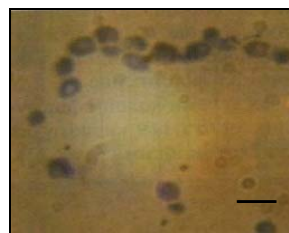


Рис. 2. L-форми *M. bovis* другої генерації: бар – 1 мкм

Мікроскопією мазків, приготовлених із культури, встановлено неацитостійкі овали (L-форми) з різною оптичною щільністю поверхні та поодинокі кислото-стійкі елементарні тільця (рис. 2). У контролі *M. bovis* 100-ї субкультури патогенного штаму за температури 3 °С росту не виявили.

Висіявши на середовище шести пробірок зависі мікобактерій, приготованої з одержаної культури другої генерації, й культивуючи її за температури 3 і 37 °С, первинний ріст вологих кремових колоній виявили на 11- і 25-ту добу спостереження, відповідно. Мікроскопією мазків, виготовлених із виявлених колоній (за 3 і 37 °С), встановлено як неацитостійкі овали з різною оптичною щільністю поверхні (L-форми), так і кислото-стійкі елементарні тільця.

Необхідно зазначити, що, за більшістю літературних даних, трансформовані в L-форми *M. bovis*, як і інші види мікобактерій, не культивуються на щільних живильних середовищах. Для цього використовуються спеціальні напіврідкі середовища за присутності осмотичних факторів. Окремі повідомлення свідчать (Tschchenko et al., 2010), що такі форми збудника розмножуються і на щільних середовищах, утворюючи колонії, що підтверджено нашими дослідженнями.

Вивчення патогенних і сенсibiliзуювальних властивостей одержаних культур за температур 3 і 37 °С на морських свинках свідчило, що мікобактерії не викликають туберкульозних патолого-анатомічних змін, не сенсibiliзують організм тварин щодо ППД для ссавців.

Провівши сім прямих пасажів досліджуваних мікроорганізмів через щільне живильне середовище та культивуючи *M. bovis* за температур 3 і 37 °С, ріст культури за 3 °С відмітили на п'яту добу, а за 37 °С – на четверту добу. За цих умов мікобактерії у першому випадку продукували помаранчевий, у другому – кремовий пігмент. Мікроскопією мазків, приготовлених із культур (рис. 3), виявила неацитостійкі довгі та короткі, товсті

та тонкі, вигнуті та прямі, із заокругленими кінцями зернисті палички та кислотостійкі елементарні тільця та L-форми за 3 °C, L-форми та інші утвори – за 37 °C культивування. Стосовно останніх необхідно зазначити, що в материнській культурі на ранніх етапах морфогенезу ниткоподібні неацетилуючі мікобактерії звільняли кислотостійкі зерна, з яких утворювались типові клітини *M. bovis*, на що ми звернули увагу ще у 2008 році (Ткаченко et al., 2008). Із часом (через 60–80 пасажів) неацетилуючі форми цього самого варіанта збудника ниткоподібні мікроорганізми (рис. 3) звільняють неацетилуючі структурні елементи – зерна, з яких формуються L-форми (на початку видовжені) із різною оптичною щільністю поверхні.

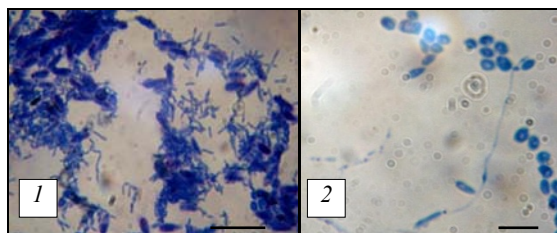


Рис. 3. L- та інші форми *M. bovis*, культивовані за температури 3 °C (1) і 37 °C (2): бар – 1 мкм

Вивчення патогенних, сенсibiliзувальних властивостей досліджуваних субкультур мікобактерій десятої генерації, одержаних за різних температур культивування, свідчило, що морські свинки залишаються живими, не реагуючи на ППД для ссавців упродовж тримісячного досліду. Здійснивши ще десять пасажів мікобактерій досліджуваних субкультур через щільне живильне середовище, встановили суттєве пришвидшення формування колоній, порівняно з десятою генерацією, тільки за температури культивування 37 °C (з 4 до 2 діб). Мікроскопія мазків, приготівлених із культур, свідчила, що за температури культивування 3 °C генеруються неацетилуючі, довгі та короткі, тонкі вигнуті та прямі із заокругленими кінцями зернисті палички, L-форми (овали) та ледь червонуваті поодинокі елементарні тільця, за 37 °C – неацетилуючі, переважно короткі, зернисті, вигнуті та прямі палички, L-форми та кислотостійкі елементарні тільця.

Наступні дослідження мікобактерій, пасажованих за різних температур (15-ї генерації), провели на простих живильних середовищах (МПА та МПБ). У контролі патогенні *M. bovis* (100-та субкультура досліджуваного варіанта), на середовищі Левенштейна – Йенсена за 37 °C росли на 23-тю добу, а за 3 °C росту культури не виявлено упродовж тримісячного спостереження. На МПА та МПБ мікобактерії патогенного штаму не росли, а змінені мікроорганізми проявляли ріст на тругугретню добу досліду. На агарі відмічено суцільний ріст по лінії посіву світло-сірої культури, яка мала тенденцію до збільшення в часі. У бульйоні на початку росту культури відмічено світло-сіру плівку на поверхні, слабке помутніння з наступним утворенням осаду. Через три тижні, за наявності плівки та помутніння, рівень осаду збільшився в 4–6 разів.

Мікроскопію мазків, приготівлених із тижневих культур (3 °C) на МПА, виявлено неацетилуючі короткі та довгі, товсті прямі та вигнуті із заокруглени-

ми кінцями зернисті палички, неацетилуючі зерна та L-форми, за 37 °C – неацетилуючі елементарні тільця та L-форми. У культурі МПБ за 3 °C – неацетилуючі короткі та довгі товсті, прямі та вигнуті зернисті із заокругленими кінцями палички та неацетилуючі зерна, за 37 °C – кислото- та неацетилуючі зерна та L-форми.

Через три тижні мікроскопією мазків, приготівлених із плівки та осаду МПБ, виявили у першому випадку (за 3 і 37 °C) практично однаковий, порівняно з тижневою культурою, за морфологією й тинкторіальними властивостями малюнок. Проте в осаді (за 3 °C) палички різної форми та довжини виявилися неацетилуючими, у плівці кислото- та неацетилуючими, а за 37 °C – тільки кислото-стійкими. Важливі дані одержані за одночасного пасажу L-форм через щільне середовище Левенштейна – Йенсена за різних температур культивування. Вивчаючи під імерсією мазки, приготівлені із дещо помаранчевого кольору субкультури першої генерації, в умовах культивування за температури 3 °C відмічено (рис. 4) наявність L-форм (видовжені овали, із деяких виштовхуються зерна) та зернистих паличок (короткі та більш довгі). В умовах термостата (культивування жовтуватої субкультури, яка легко емульгувалася) зареєстровано тільки L-форми з різною оптичною щільністю поверхні (практично круглої форми) та поодинокі зернисті палички. У третій генерації, в умовах холодильника, субкультуру формували L-форми (видовжені овали), палички й зерна; у четвертій в умовах термостата – L-форми (круглі) та поодинокі паличкоподібні утворення.

П'яту субкультуру культивували за 3 °C. Вона характеризувалася видовженими L-формами, паличкоподібними та зернистими неацетилуючими елементами. Сьома субкультура (термостат) формувалася практично винятково L-формами (круглими) та поодинокими товстими зернистими короткими та довгими паличками.

У мазку сьомої субкультури, одержаної за 3 °C, виявлені видовжені L-форми, з яких звільняються зернисті форми та короткі палички. У дев'ятій субкультурі (термостат) у полі зору мікроскопа зафіксовані тільки L-форми, круглої форми та злегка червонуваті, поодинокі, елементарні тільця.

Мазок із восьмої субкультури (3 °C) характеризувався наявністю тих самих форм мікобактерій, що й у сьомій.

У мазку, приготівленому з 12-ї субкультури, що одержана в термостаті, виявлені L-форми та елементарні тільця (зерна) з ледь червонуватим відтінком. У субкультурі 10-ї (3 °C) та 18-ї (37 °C) генерації суттєвих змін, порівняно з попередніми дослідженнями мазків, не виявлено. Хоча в мазку як першої, так і другої культур, зафіксовано зернисті палички. У 12-й субкультурі (3 °C) виявлено видовжені L-форми, з яких звільняються неацетилуючі зерна та палички, як короткі, так і довгі, та поодинокі ледь червонуваті елементарні тільця; у 19-й субкультурі (термостат) – L-форми, довгі, короткі зернисті палички та елементарні тільця з червонуватим відтінком. 20-та (3 °C) та 21-ша (37 °C) генерації характеризувалась тими самими морфологічними формами мікобактерій, що і 12- і 19-та.

Узагальнюючи динаміку морфологічних ознак, тинкторіальних властивостей і характер росту культур змінених форм *M. bovis* (у тому числі L-форм), робимо незаперечний висновок, що за умов низької температури (3 °C) у

часі генеруються, на фоні стабільності культури, некіслотостійкі зерна, зернисті палички, зі зменшенням їх кількості в часі порівняно з вихідною культурою, L-форми.

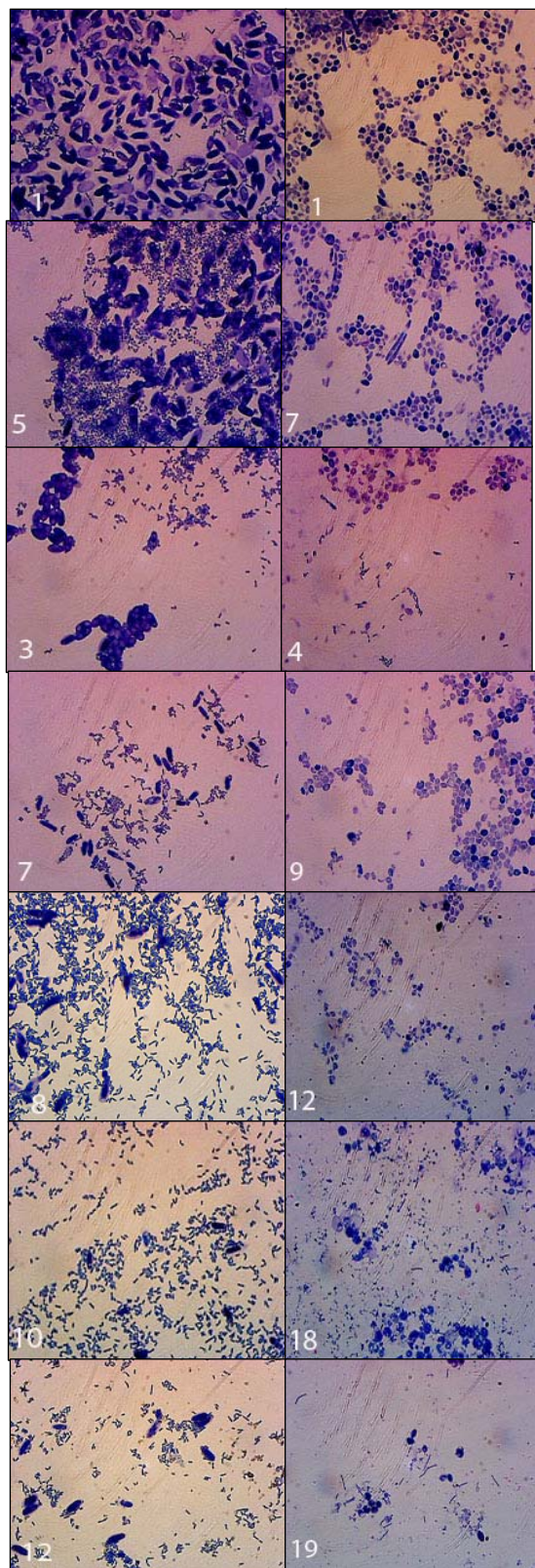


Рис. 4. L- та інші форми *M. bovis*, пасажовані через щільне живильне середовище: зліва – за температури 3 °С, справа – за 37 °С: бар – 1 мкм; цифрами на фотографіях позначено номер субкультури

В умовах термостата на фоні зменшення кількості та зміни морфології L-форм з'являються некіслотостійкі зерна, короткі та ниткоподібні палички та поодинокі червонуваті елементарні тільця, які, напевно, змінюють характер росту культури. Якщо за відсутності елементарних тілець культура у вигляді суцільного росту по лінії висіву зависі досліджуваних мікроорганізмів інтенсивно росла, то з появою елементарних тілець (через 4–5 діб культивування) вона начебто провалювалася під власним тиском у середовище: із часом культура витончувалася, а через 2–4 тижні середовище «стігло», що свідчить про незвичайні, особливі властивості цих форм *M. bovis*.

Водночас, наші (Tkachenko et al., 2008, 2010) попередні дослідження неодноразово свідчили, що швидкість розмноження досліджуваного штаму мікобактерій, зниження ступеня вірулентності, зміна якісного та кількісного складу вільних жирних кислот суттєво залежать від рН середовища. Тому в цьому напрямі необхідними виявилися дослідження впливу вмісту протонів у середовищі на пігментоутворення, морфологію та тинкторіальні властивості форм мікобактерій за температури культивування 3 °С (за 37 °С пасажовані мікобактерії на цьому етапі досліджень втратили здатність рости на середовищі).

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) генерацій, відмітили, що злегка помаранчевого кольору культура *M. bovis* (рис. 5) на середовищі з рН 6,5 із часом (через 2–3 тижні) набувала інтенсивнішого забарвлення, на середовищі із рН 7,1–7,2 – залишалася майже такою самою (ставала злегка помаранчевою) упродовж трьох місяців культивування.

Вивчаючи під імерсією мазок, приготовлений з культури 26-ї генерації мікобактерій, виявили (рис. 6) переважну більшість некіслотостійких зернистих форм, інколи (рідко) кислотостійкі палички та, досить рідко, товсті (15–20 мкм) темно-сині палички з однією щільністю поверхні. Перший пересів таких різних форм із 26-ї генерації на середовище з рН 6,5 супроводжується появою значної кількості синіх овалоподібних форм (із темними зернами в центрі) з різною оптичною щільністю поверхні, дрібних зерен, інколи з червоним відтінком, які розташовуються тільки навколо та поблизу овалів (синіх), що свідчить про «виштовхування» зерен з овалів. Подібне виявлено в мазку, приготовленому з культури 33-ї та 37-ї генерації: проте відмічено також незначну кількість синіх утворень, які набули форми товстих овалоподібних зернистих паличок. На та поблизу них (або «виштовхуються» з них) розташовані дрібні некіслотостійкі (дуже рідко кислотостійкі) зернисті форми (0,1–0,2 мкм). Типових форм паличок збудника туберкульозу в цій та попередній генераціях (навіть некіслотостійких) не виявлено.

Провівши ще 10 пересівів, установили, що у перші п'ять (41–45-й) ріст культури відмічався з четвертої доби, як правило, у вигляді кремового нальоту по лінії посіву з наступним формуванням окремих великих сухих колоній помаранчевого кольору (рис. 7). У той же час 45-та субкультура виявилася слизовою та в'язкою. У мазку, приготовленому із субкультури цього пересіву

під імерсією мікроскопа, виявлено некіслотостійкі зернисті та некіслотостійкі великі (у 12 разів більші за палички) видовжені овали з однією щільністю поверхні, з яких «виштовхуються» короткі палички (рис. 8).

У наступні п'ять пересівів (рис. 9) культура залишалася слизовою, а її ріст характеризувався через одну-шість днів зміною пігменту (із помаранчевого на жовтуватий).

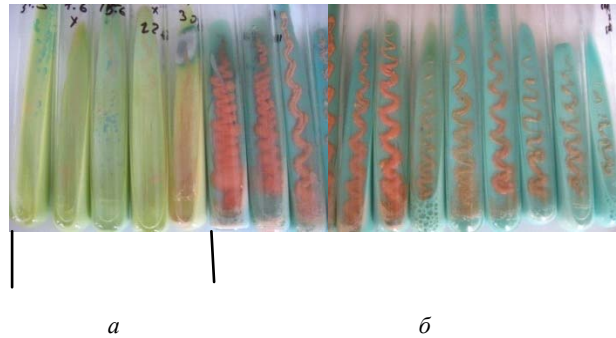


Рис. 5. Культура L- та інших форм *M. bovis*:
а – на середовищі з рН 7,1–7,2, б – на середовищі з рН 6,5

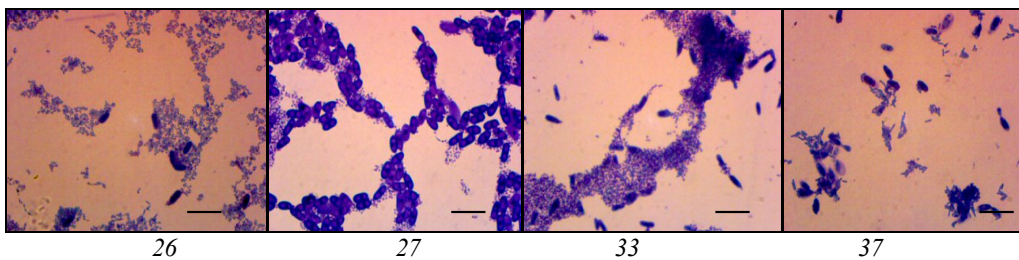


Рис. 6. L- та інші форми *M. bovis*: 26 – 26-та генерація (рН середовища 7,1–7,2), 27, 33, 37 – відповідно 27-, 33- та 37-ма генерації (рН середовища 6,5); бар – 1 мкм



Рис. 7. Культура змінених *M. bovis*: 45-й пасаж за 3 °С

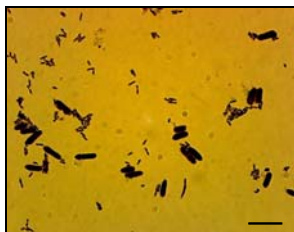


Рис. 8. L- та інші форми *M. bovis*:
45-й пасаж за 3 °С, бар – 1 мкм

У полі зору мазка, приготовленого з культури 50-го пересіву, виявлено практично такі самі форми мікроорганізмів: на фоні некіслотостійких зернистих овалів (L-форми) зареєстровано також некіслотостійкі зерна, які звільняються з них і розташовуються між ними (рис. 10). На 60-му пересіві встановлено культуру та морфологічні форми мікобактерій, ідентичні 50-й субкультури. Отже, культивування дисоціативних форм *M. bovis* за низьких температур (3 °С) на середовищі з різним рН супроводжується, на фоні стабільності утворення пігменту за рН < 7, стабільністю морфологічних форм мікобактерій.



Рис. 9. Культура *M. bovis* дисоціативних форм 118-го варіанту: 50-й пасаж за 3 °С

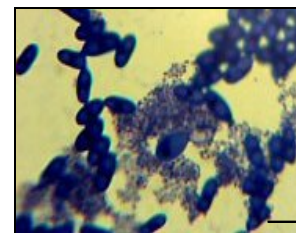


Рис. 10. *M. bovis* дисоціативних форм 118-го варіанту:
50-й пасаж за 3 °С, бар – 1 мкм

Необхідними виявились дослідження можливих морфологічних змін за тривалого збереження культури. Тому мікроскопію мазків, приготовлених із незміненої за виглядом і формою 27-ї субкультури, витриманої за температури 3 °С, провели через 15 місяців. Установлено (рис. 11) некіслотостійкі короткі та більш довгі зернисті палички та кислотостійкі елементарні тільця (зернисті форми).

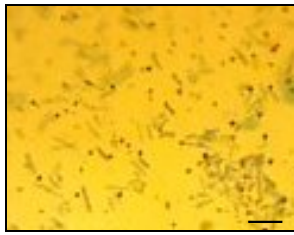


Рис. 11. Елементарні тільця та некислотостійкі форми паличок *M. bovis*: культивування за температури 3 °С упродовж 15 місяців, бар – 1 мкм

Дослідивши на четверту добу помаранчево-червонуватий суцільний по лінії посіву ріст культури (рис. 12) четвертої генерації, морфологію та тинкторіальні властивості L-форм на середовищі Левенштейна – Йенсена без саліциловокислого натрію за 3 °С виявили некислотостійкі утворення (рис. 13) з червонуватою оболонкою та темними зернами всередині овальної видовженої форми (швидше паличкоподібні). З деяких із них звільняються злегка червонуваті зерна та палички.



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

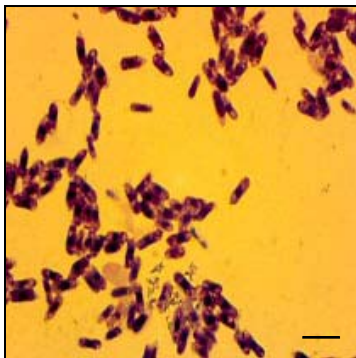


Рис. 13. L- та інші форми *M. bovis*: бар – 1 мкм

Культура, одержана на середовищі з умістом 1 мг/см³ саліциловокислого натрію, сформувалася на шосту добу: слизова сіро-жовтуватого кольору по лінії посіву (рис. 14). Мікроскопія мазка (рис. 15), приготовленого з культури, свідчила про наявність мікроорганізмів, як і в контролі та за вмісту 0,5 мг/см³ саліциловокислого натрію, проте з чіткіше вираженим забарвленням у червоний колір усієї клітини крім темних зерен усередині.



Рис. 14. Культура L-форм *M. bovis*: 1,0 мг/см³

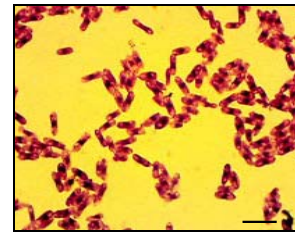


Рис. 15. Культура L-форм *M. bovis*: бар – 1 мкм

За 37 °С культивування на середовищі без саліциловокислого натрію ріст культури відмічено на 15-ту добу, а з його вмістом росту не виявлено.

У той же час у вихідних змінених форм, а також їх культур-ревертантів (виділених з органів морських свинок, яким інокульовано досліджувані варіанти вихідних мікроорганізмів – кислотостійкі палички) виявлено підвищення окисно-відновних реакцій (дегідрогеназна та каталазна активності) з одночасною втратою вірулентності мікобактерій, у тому числі у культур-ревертантів.

Отже, результати експериментів свідчили, що L- та інші форми набули властивостей атипичних мікобактерій.

Аналізуючи результати досліджень вмісту вільних жирних кислот у *M. bovis* типових вірулентних і змінених авірулентних форм, відмітили появу нової коротколанцюгової ундеканової кислоти в останніх. При цьому її синтез за 3 °С виявився в 15,6 раза інтенсивнішим, ніж за 37 °С. У той же час за 3 °С культивування не синтезувалися до рівня, щоб їх можна було ідентифікувати використанням методом, лауринова й арахінова кислоти, які виявлялися у вірулентних мікобактеріях. За 37 °С культивування авірулентних мікобактерій не виявлено тільки одну з них (лауринову кислоту). Це свідчить про глибокі зміни метаболізму мікробної клітини, які, безперечно, зумовлені необхідністю її виживання в умовах низьких плюсових температур, що супроводжувалися розмноженням і утворенням колоній.

Вміст вільних жирних кислот змінених мікобактерій суттєво змінився порівняно з *M. bovis* вірулентної материнської культури. Скелетні вільні жирні кислоти (пальмітинова, олеїнова, стеаринова) у мікобактеріях дисоціативних форм залишалися у високій концентрації, що свідчить про незалежність їх вмісту від зміни властивостей мікобактерій, їх біологічної активності. Тобто зміна культуральних, тинкторіальних, вірулентних, біохімічних та інших властивостей і морфологічних ознак не викликає суттєвої зміни вмісту скелетних вільних жирних кислот. У той же час співвідношення коротко- та довголанцюгових вільних жирних кислот у вірулентних субкультур (100+124 / 2) й авірулентних мікобактерій (L- та інших форм) становило 9,94 : 1, 5,51 : 1 (3 °С) та 5,31 : 1 (37 °С) відповідно. Це суперечить загальноприйнятим уявленням, оскільки у вірулентних мікобактерій не змінених морфологічних форм відмічається значно нижчий вміст коротколанцюгових вільних жирних кислот порівняно з довголанцюговими. Оскільки дослідження дисоціативних форм, одержаних в умовах низьких температур, проведені вперше, можливо, така закономірність співвідношення коротко- та довголанцюгових кислот притаманна саме багаторазово пасажованим і генетично модифікованим мікобактеріям, що визначається особливістю їх метаболізму. Порівнюючи

аналогічні дані досліджень для *M. bovis*, пасажованих за температури 37 °С вірулентних мікобактерій вихідної материнської культури (друга субкультура), відмітили, що співвідношення аналізованих кислот принципово відрізняється від попередніх (1,84 : 1). Проте у мікобактерій 59-ї субкультури співвідношення цих кислот дорівнювало 4,89 : 1. Це свідчить про поступову зміну співвідношення синтезу кислот у процесі пасажів через штучне живильне середовище.

Вміст ненасичених вільних жирних кислот, які характеризують адаптивні процеси метаболізму мікробної клітини, виявився у пальмітоолеїнової та олеїнової – нижчим у дисоціативних форм мікобактерій, у лінолевої та ліноленової – 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, які, за даними Л.М. Моделя (Model, 1952), відповідають за гальмування лейкопротезаз. Тобто їх низький вміст підвищує активність захисних факторів макроорганізму, що, відповідно, забезпечує нейтралізацію довголанцюгових вільних жирних кислот і, можливо, визначає загальну авірулентність досліджуваних форм мікобактерій, у яких вміст ненасичених жирних кислот практично такий самий за високого вмісту довголанцюгових вільних жирних кислот у патогенних мікобактерій: співвідношення ненасичених до довголанцюгових кислот становить 4,63 : 1, у авірулентних – 3,34 : 1 (3 °С) та 2,69 : 1 (37 °С).

Необхідно зазначити, що у другій генерації материнської культури досліджуваного штаму аналізовані показники склали 1 : 1,26, тобто вміст довголанцюгових вільних жирних кислот суттєво 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, зумовлені, беззаперечно, її пристосуванням до зміни умов довкілля. Через це порушуються не тільки хімічні, а й фізичні зв'язки компонентів клітини (ліпіди, протеїни, вуглеводи), що викликає появу комплексів із новими якостями та властивостями, й, напевно, зміну генотипу.

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

Персистенція досліджуваних мікроорганізмів (27-ма субкультура неокислотостійкі палички та L-форми) в організмі морських свинок триває дев'ять (період досліду) і більше місяців. Проте із суспензії, приготовленої з макроскопічно незмінених органів дослідних тварин, виділені кислотостійкі елементарні тільця (зерна) і типові морфологічні форми паличок, які на щільному живильному середовищі утворювали на третю добу після висіву суспензії помаранчеву культуру.

Інокуляція виділених кислотостійких мікобактерій (культура-ревертант) морським свинкам (1 мг/см³) не супроводжувалася розвитком алергічного стану (алергічна реакція на туберкулін та ААМ через 30, 60 і 90 діб негативна), проте з органів еванізованих через три місяці дослідних тварин виділені кислотостійкі міко-

бактерії, які на третю добу утворювали культуру помаранчевого кольору.

Очевидно, багаторазові пасажі через щільне штучне живильне середовище, тривале перебування (20 місяців) в умовах низької температури змінили генетичний баланс, що забезпечило їм виживання внаслідок втрати одних (характерних для патогенного мікроорганізму) та набуття нових властивостей, частково притаманних іншим мікобактеріям, зокрема, атипичних. 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 пігментотвірними та зберігають здатність утворювати колонії (культура-ревертант) на щільному живильному середовищі починаючи з першої генерації (з біологічного матеріалу морських свинок) на другу добу культивування.

Втрата сенсibiliзувальної здатності у мікобактерій, багаторазово пасажованих і персистуючих в організмі морських свинок, може свідчити, звичайно, тільки певною мірою, про втрату імунотвірної здатності, оскільки відомо, що розвиток алергічної (туберкулінової) реакції та її інтенсивність свідчать про імунотвірну перебудову макроорганізму (розвиток інфекційного процесу) з набуттям специфічної стійкості. Проте результати експерименту свідчили, що один із різноманітних показників клінічного прояву інфекційного процесу – зміна маси тіла морських свинок, в організм яких інокулювали 1 мг/см³ досліджуваних мікобактерій, має певну закономірність динаміки: на 10- та 20-ту добу досліду маса тіла підвищилася на 25 і 45 г відповідно, на 35-ту добу вона знизилася порівняно з 20-ю добою на 35 г із наступним підвищенням на 50 г на 46-ту добу. Однак через 50 діб, на друге введення 1 мг/см³ таких форм мікобактерій, подібне зниження маси тіла відмічене через 15–20 діб із наступним вирівнюванням попередньої позитивної динаміки аналізованого показника. Це може свідчити про залишкову вірулентність досліджуваних змінених форм *M. bovis* із можливим формуванням специфічного протитуберкульозного імунітету без розвитку необхідного рівня, який виявлявся діагностиком алергічного стану та утворення виразки на ділянці введення зависі мікобактерій.

Бактеріоскопія мазків-відбитків з органів еванізованих через 80 діб тварин виявила неокислотостійкі палички, зерна-тільця. У контролі маса тіла тварин тенденційно збільшувалася, а бактеріоскопічні дослідження (мазки-відбитки) виявилися негативними. Очевидно, мікобактерії з новими, генетично закріпленими властивостями володіють іншою здатністю стимулювати доброякісний інфекційний процес, без розвитку алергії необхідного рівня, щоб вона виявлялася ППД для ссавців та ААМ.

Можливо, згасання активності генів, відповідальних за патогенні властивості, які визначаються окисно-відновними процесами (дегідрогеназна, каталазна активності тощо) та генами, які активізувалися (перебували в «дрімаючому» стані), активізують процеси синтезу пігменту з пригніченням дії токсинів патогенності.

Ми не встановили залежності між швидкістю розмноження (строки утворення колоній) і патогенністю, оскільки вихідна материнська культура (третья генерація)

досліджуваних змінених форм *M. bovis* володіла високою вірулентністю та формувала колонії на другу–третю добу, не утворюючи пігменту та не володіючи вираженою дегідрогеназною та каталазною активністю (Manachenko et al., 1994).

Отже, селекційована раса змінених форм мікобактерій з особливими властивостями може виявитися перспективною для конструювання протитуберкульозної вакцини.

Висновки

Селекційна раса змінених форм *M. bovis*: L-форми за пасажів через щільне середовище за температури 3 °C, змінюючись морфологічно, переходить у некіслотостійкі паличкові, кокові форми, за 37 °C – у некіслотостійкі (інколи кислотостійкі) елементарні тільця (зерна); за температури 3 °C ріст на щільному селективному живильному середовищі помаранчевої культури відбувається на другу–третю добу культивування (інколи на 24-ту годину), за 37 °C – жовтуватої культури в такі самі строки, але після 20 пересівів відбувається слабкий ріст культури за цієї температури, який із часом припиняється; на МПА та МПБ *M. bovis* ростуть (3 і 37 °C, останні субкультури з 26-ї генерації тільки за 3 °C) на першу–другу добу культивування; на середовищі з умістом саліциловокислого натрію за низької температури *M. bovis* ростуть на шосту добу, а за 37 °C – на 15-ту; володіють вираженою дегідрогеназною та каталазною активностями; авірулентні – упродовж дев'яти місяців частково реверсують у кислотостійкі морфологічні форми, не викликаючи туберкульозу в морських свинок, володіють низькою або не володіють узагалі сенсibiliзувальною здатністю (щодо ППД для ссавців, у тому числі ААМ), не утворюють виразки на ділянці уведення мікобактерій; у першій генерації культура – ревертант (виділена з органів морської свинки) на другу добу утворює помаранчеву культуру; бактерії синтезують нові коротколанцюгові вільні жирні кислоти, які не виявляються у вірулентних мікобактерій материнської культури.

Бібліографічні посилання

Anaelom, N.J., Ikechukwu, O.J., Sunday, E.W., Nnaemeka, U.C., 2010. Zoonotic tuberculosis: A review of epidemiology, clinical presentation, prevention and control. *J. Public Health Epidemiol.* 2(6), 118–124.

Davies, P.D.O., 2006. Tuberculosis in humans and animals: Are we a threat to each other? *J. R. Soc. Med.* 99(10), 539–540.

Davydenko, P.O., Bilan, M.V., Tkachenko, O.A., 2010. Sensybilizoval'ni, virulentni vlastyvoli ta lipidnyj sklad *M. bovis*, bagatorazovo pasazhovanyh cherez shhil'ne zhyvyll'ne seredovyshhe z pH 7,1 [Sensitizing, virulence properties and lipid composition of *M. bovis* in nutrient medium with pH 7.1]. *Veterynarna Medycyna Ukrainy* 2, 20–22 (in Ukrainian).

De la Rua-Domenech, R., 2006. Human *Mycobacterium bovis* infection in the United Kingdom: Incidence, risks, control measures and review of the zoonotic aspects of bovine tuberculosis. *Tuberculosis* 86, 77–109.

Downing, K.J., Mischenko, V.V., Shleeva, M.O., Young, D.I., Young, M., Kaprelyants, A.S., Apt, A.S., Mizrahi, V., 2005.

Mutants of *Mycobacterium tuberculosis* lacking three of the five rpf-like genes are defective for growth *in vivo* and for resuscitation *in vitro*. *Infect. Immun.* 73, 3038–3043.

Glickman, M.S., Jacobs, Jr, W.R., 2001. Microbial pathogenesis review of *Mycobacterium tuberculosis*: Dawn of a discipline. *Cell* 104, 477–485.

Haddad, N., Masselot, M., Durand, B., 2004. Molecular differentiation of *Mycobacterium bovis* isolates. Review of main techniques and applications. *Res. Vet. Sci.* 76, 1–18.

Krauss, H., Weber, A., Appel, M., Enders, B., Isenberg, D.H., Schiefer, G.H., Slenczka, W., von Graevenitz, A., Zahner, H., 2003. Zoonoses: Infectious diseases transmissible from animals to humans. 3rd ed. Amer. Society for Microbiology.

Model, L.M., 1952. *Byologyja y byohymyja tuberkuleznyh mykobakteryj* [Biology and biochemistry of *Mycobacterium*]. AMN SSSR, Moscow (in Russian).

O'Reilly, L.M., Daborn, C.J., 1995. The epidemiology of *Mycobacterium bovis* infections in animals and man: A review. *Tuber. Lung. Dis.* 76, 1–46.

Pavlik, I., Jahn, P., Dvorska, L., Bartos, M., Navotny, L., Halouzka, R., 2004. Mycobacterial infections in horses: A review of the literature. *Vet. Med. Czech.* 49(11), 427–440.

Perez-Lago, L., Navarro, Y., Garcia-de-Viedma, D., 2014. Current knowledge and pending challenges in zoonosis caused by *Mycobacterium bovis*: A review. *Res. Vet. Sci.* 97, S94–S100.

Sherman, D.R., Voskuil, M., Schnappinger, D., Liao, R., Harrell, M.I., Schoolnik, G.K., 2001. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* hypoxic response gene encoding alpha-crystallin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98, 7534–7539.

Thoen, C.O., Steele, J.H., Kaneene, J.B. (eds.), 2014. Zoonotic tuberculosis *Mycobacterium bovis* and other pathogenic mycobacteria. 3rd ed. John Wiley and Sons, Chichester, UK.

Tkachenko, O.A., Bilan, M.V., Miskiv, V.V., Davydenko, P.O., Zazhars'kyj, V.V., 2010. Biologichni vlastyvoli dysociatyvnyh form *M. bovis*: Kul'tural'ni osoblyvosti za temperatur 3 i 37 °C [Biological properties of dissociative forms of *M. bovis*: Cultural features at 3 and 37 °C]. *Veterynarna Medycyna Ukrainy* 3, 33–35 (in Ukrainian).

Tkachenko, O.A., Bilan, M.V., Zazhars'kyj, V.V., Davydenko, P.O., Miskiv, V.V., Koval'ov, A.V., 2010. Biologichni vlastyvoli dysociatyvnyh form *M. bovis*: Morfologichni oznaky ta tynktorial'ni vlastyvoli za temperatur 3 ta 37 °C [Biological properties of dissociative forms of *M. bovis*: Morphological characteristics and properties at 3 and 37 °C]. *Veterynarna Medycyna Ukrainy* 12, 27–30 (in Ukrainian).

Tkachenko, O.A., Galatjuk, O.J., Bilan, M.V., 2008. Morfologichni aspekty reversiji nekysslotostijkyh nytkopodibnyh *M. bovis* v bakterial'nu kyslotostijku formu [Morphological aspects of *M. bovis* reversion in bacterial acid form]. *Suchasni problemy tuberkulozu v Ukraini: Prychyny ta shljahy jih podolannja* [Modern problems of tuberculosis in Ukraine: Causes and ways to overcome them]. Kyiv. P. 149–153 (in Ukrainian).

Tufariello, J.M., Jacobs, W.R., Chan, J., 2004. Individual *Mycobacterium tuberculosis* resuscitation-promoting factor homologues are dispensable for growth *in vitro* and *in vivo*. *Infect. Immun.* 72, 515–526.

Voskuil, M.I., Schnappinger, D., Visconti, K.C., Harrell, M.I., Dolganov, G.M., Sherman, D.R., Schoolnik, G.K., 2003. Inhibition of respiration by nitric oxide induces a *Mycobacterium tuberculosis* dormancy program. *J. Exp. Med.* 198, 705–713.

Yuan, Y., Crane, D.D., Barry, C.E. 3rd, 1996. Stationary-phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: Function of the mycobacterial alpha-crystallin homolog. *J. Bacteriol.* 178, 4484–4492.

Надійшла до редколегії 27.08.2016