

УДК 619:616–002.5/636 2

**БІОЛОГІЧНА АКТИВНІСТЬ L-ФОРМ
МІКОБАКТЕРІЙ ТУБЕРКУЛЬОЗУ ВЕЛИКОЇ
РОГАТОЇ ХУДОБИ, ТРАНСФОРМОВАНИХ ЗА
ВПЛИВУ АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ**

**Кравченко Н.О., Дяченко Г.М., Головач О.В.,
Дмитрук О.М.**

Інститут сільськогосподарської мікробіології НААН України,
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, 14027
e-mail: isgm@ukrpost.ua

*Показано чутливість *Mycobacterium bovis* штамів Vallee, № 8 до L-трансформуючої дії пеніциліну, лізоциму та їх комбінації, стрептоміцину, ципрофлоксацину та амікацину. Встановлено знижені патогенні та сенсibiliзогенні властивості індукованих L-форм *Mycobacterium bovis* штаму Vallee порівняно з бактеріальною формою: прояв гіперчутливості сповільненого типу у пізніші строки і з меншою інтенсивністю та повільний перебіг інфекційного процесу з обмеженими специфічними ураженнями у внутрішніх органах лабораторних тварин.*

*Ключові слова: L-форми, *Mycobacterium bovis*, патогенність, сенсibiliзогенні властивості, трансформація, антибактеріальні препарати.*

Туберкульоз великої рогатої худоби (ВРХ) – поширене на всіх континентах світу захворювання, яке становить постійну загрозу для здоров'я людей та розвитку тваринництва.

Сьогодні в Україні ветеринарною наукою і практикою досягнуто значних успіхів у боротьбі з туберкульозом сільськогосподарських тварин: на 1.11.09 р. лише у трьох областях має місце зараження великої рогатої худоби збудником туберкульозу [1-3]. Проте, моніторинг епізоотичної ситуації щодо туберкульозу ВРХ у благополучних господарствах за допомогою внутрішньошкіряної туберкулінової проби часто виявляє параалергічні реакції, які, зазвичай, обумовлені сенсibiliзацією організму атиповими мікобактеріями [4, 5]. Разом з тим, у більшості господарств (86,4 %) причина сенсibiliзації організму тварин до туберкуліну залишається не встановленою [6, 7]. Однією з причин параалер-

гічних реакцій на туберкулін у тварин може бути латентний мікробізм (прихована інфекція), викликаний L-формами мікобактерій туберкульозу. Так, численними дослідженнями доведено, що при зміні форми існування з бактеріальної на L-трансформовану мікобактерії набувають здатності до довготривалого персистування в макроорганізмі і за певних сприятливих умов реверсують у бактеріальну форму з відновленням вірулентності, що є загрозою реінфекції туберкульозу в господарствах [9-13].

Утворення L-форм – частково або повністю дефектних щодо клітинних стінок мікобактерій туберкульозу – спостерігали за дії туберкулостатичних препаратів, антибіотиків, лізоциму, ультрафіолетових та рентгенівських променів тощо. Однак, питання щодо біологічної активності змінених форм мікобактерій туберкульозу до сьогодні є нез'ясованим, наукові дослідження щодо L-форм мікобактерій туберкульозу, повноти відновлення ними типових ознак збудника малочисельні, що унеможлиблює з'ясування реальної епізоотичної ситуації щодо туберкульозу ВРХ та, зазвичай, призводить до суттєвого зниження ефективності боротьби з цією хворобою [14, 15].

З огляду на вище зазначене, метою нашої роботи було дослідити в умовах експерименту епізоотично важливі показники біологічної активності (патогенний потенціал та сенсibiliзогенність) L-форм збудника туберкульозу бичачого виду.

Матеріали і методи. Вивчення L-трансформуючої дії низки антибактеріальних препаратів (пеніциліну, лізоциму, амікацину, стрептоміцину, ципрофлоксацину) на референтні штами *Vallee* і № 8 мікобактерій туберкульозу ВРХ проводили в умовах експерименту *in vitro* шляхом пасажування патогенів у середовищі Шкільнікової та модифікованому живильному середовищі з вмістом потенційних L-індукторів. Суспензією мікобактерій туберкульозу в ізотонічному розчині хлористого натрію 5×10^8 КУО в 1 см^3 засівали середовища по $0,2 \text{ см}^3$. Посіви інкубували при 37°C упродовж 4-5 тижнів. Після появи росту колоній мікобактерій, характерних для L-форм, готували препарати для мікроскопії (нативні – для фазово-контрастної та забарвлені за методом Романовського-Гімза – для світлової в імерсійній системі).

Сенсibiliзуючі властивості і патогенний потенціал L-форм *Mycobacterium bovis* вивчали в умовах експерименту *in vivo* на морських свинках і кролях. З цією метою було сформовано одна

дослідна і 4 контрольних групи по 6 голів у кожній.

Тваринам дослідної групи вводили L-форму штаму *Vallee M. bovis*.

Тваринам контрольних груп вводили:

№ 1 – шт. *Vallee M. bovis* (вихідна бактеріальна форма);

№ 2 – шт. 2282 *M. avium*;

№ 3 – шт. ДМ-13 *M. fortuitum*;

№ 4 – ізотонічний розчин хлориду натрію.

До і через кожні 30 днів після зараження тварин досліджували туберкуліновою пробою ППД-туберкуліном для ссавців і поліалергеном ААМ.

Алергени вводили у дозі 25 МО (міжнародних одиниць) в 1 см³ ізотонічного розчину натрію хлориду кролям підшкірно у зовнішню поверхню вуха, а морським свинкам – внутрішньошкірно у ділянку зовнішньої поверхні стегна. Реакцію тварин оцінювали через 48 годин після введення алергенів. Морську свинку вважали реагуючою, якщо на місці введення спостерігали гіперемію шкіри та папулу діаметром 5 мм і більше. За позитивну реакцію у кроля вважали наявність обмеженої гіперемованої ділянки площею понад 50 мм².

Дослід тривав упродовж 3-х місяців. Проводили патолого-анатомічні та бактеріологічні дослідження внутрішніх органів тварин, загиблих у процесі досліду та забитих після його закінчення.

Результати та їх обговорення. Проведено дослідження *in vitro* з визначення L-індукуючого впливу пеніциліну, лізоциму та їх комбінації на референтні штами *Vallee* і № 8 *M. bovis*, за результатами яких виявлено виражені відмінності L-індукуючої дії вищезазначених антибіотиків на мікобактерії.

Так, пеніцилін у дозі 1000 ОД/см³ і лізоцим у дозі 100 мкг/см³ проявили L-трансформуючий вплив на клітинну стінку бактерій обох штамів збудника туберкульозу ВРХ. Найвищий L-індукуючий ефект на мікобактерії проявила комбінація обох речовин, що визначено за швидкістю утворення колоній L-форм. Мікроскопічні дослідження нативних мазків дали можливість спостерігати послідовність морфологічних перетворень мікобактерій, які відбуваються в процесі L-трансформації штаму *Vallee M. bovis*.

Показано, що L-трансформація мікобактерій туберкульозу *in vitro* за впливу пеніциліну відбувається через стадію розбухання

мікобактеріальних клітин та руйнування клітинних стінок, утворення сферопластоподібних форм та агломератів зернистості з подальшою появою L-форм (рис. 1. а і б).

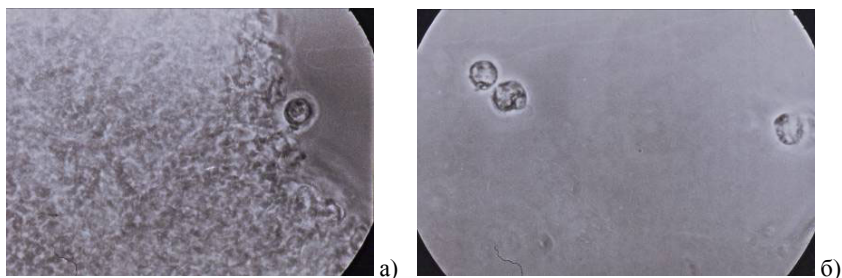


Рис. 1. L-трансформація мікобактерій:
 а) окремі сферопластоподібні утворення на фоні зернистості,
 б) вакуолеподібні L-форми збудника ($\times 1350$)

За результатами другого дослідження *in vitro* отримано дані стосовно L-трансформуючої дії антибактеріальних речовин стрептоміцину, ципрофлоксацину та амікацину на референтні штами *Vallee* і № 8.

Показано, що L-трансформація збудника туберкульозу ВРХ залежала від штаму мікобактерій, концентрації L-індуктора у живильному середовищі і тривалості його дії на патоген (табл. 1).

Таблиця 1. L-трансформація *Mycobacterium bovis*
 за впливу різних L-індукторів

Штами <i>M. bovis</i>	L-трансформація МБ за впливу, через діб					
	амікацин, мг/см ³		стрептоміцин, ОД/см ³		ципрофлоксацин, мг/см ³	
	500	1000	500	1000	500	1000
<i>Vallee</i>	> 30	> 30	не утв.	не утв.	не утв.	> 30
№ 8	> 30	> 30	> 25	> 25	не утв.	> 30

Підтвердженням найвищого L-індукуючого ефекту амікацину є поява колоній, характерних для L-форм обох штамів *M. bovis* у живильному середовищі незалежно від концентрації цього антибіотика. Як показали отримані нами дані, L-трансформуюча дія стрептоміцину на мікобактерії залежала від штаму, а ципрофлоксацину – від концентрації антибіотика у живильному середовищі.

Важливим в епізоотології туберкульозу ВРХ і, водночас,

досі суперечливим є питання стосовно збереження мікобактеріями туберкульозу в L-формі сенсibiliзуючих, а особливо патогенних властивостей, а також питання зворотної їх реверсії в бактеріальну форму.

У зв'язку з цим наступним етапом досліджень було визначення *in vitro* сенсibiliзуючих властивостей та патогенного потенціалу індукованої *in vitro* за впливу пеніциліну *M. bovis* порівняно з вихідною бактеріальною формою. Співставлення розвитку туберкульозної інфекції в організмі лабораторних тварин дозволило виявити виразні відмінності ознак інфекційного процесу, викликаних L- та бактеріальною формою *M. bovis*. Так, уже через місяць після інфікування у тварин спостерігали туберкулінові реакції (табл. 2).

Таблиця 2. *Результати алергічних досліджень лабораторних тварин (M ± m, n=6)*

Група тварин		Введена культура мікобактерій	Реакція на алерген			
			кролі		морські свинки	
			ППД-туберкулін для ссавців, мм ²	поліалерген ААМ, мм ²	ППД-туберкулін для ссавців, мм ²	поліалерген ААМ, мм ²
Дослідна		<i>M. bovis</i> штам <i>Vallee</i> , L-форма	100,0±2,0	20,0±3,0	0	0
Контрольні	I	<i>M. bovis</i> штам <i>Vallee</i> , вихідна форма	625,0±3,0	63,0±3,0	11,0±2,0	5,0±1,0
	II	<i>M. avium</i> штам 2282	150,0±2,0	420,0±4,0	5,0±1,0	21,0±1,0
	III	<i>M. fortuitum</i> штам ДМ-13	0	0	0	0
	IV	Інтактні тварини	0	0	0	0

Аналіз даних, представлених у таблиці 2, дає можливість стверджувати, що L-форма збудника туберкульозу ВРХ викликає у кролів слабші у 6,25 раза за інтенсивністю алергічні реакції на ППД-туберкулін для ссавців, ніж бактеріальна форма *M. bovis*.

Встановлено деякі відмінності у динаміці прояву гіперчутливості сповільненого типу у тварин дослідної групи. Так,

через два місяці після зараження інтенсивність реакцій на ППД-туберкулін у тварин, інфікованих мікобактеріями туберкульозу в L-формі, дещо підвищилася, залишаючись однаковою на поліалерген ААМ.

Виразні відмінності встановлено між патогенними властивостями L-форми і бактеріальної форми *M. bovis*. Так, якщо типова бактеріальна форма *M. bovis*, шт. *Vallee* (контроль № 1) викликала у тварин множинні специфічні ураження у легенях і печінці та окремі – у селезінці і нирках, то L-форма – лише окремі характерні для туберкульозу вогнища у печінці та легенях, гіперпластичні зміни у нирках, регіонарних лімфовузлах. Атипові мікобактерії (*M. avium*, шт. 2282; *M. fortuitum*, шт. ДМ-13 (контроль № 2 і № 3) не призвели до будь-яких патологічних уражень внутрішніх органів і тканин у інфікованих ними тварин.

Важливо відмітити, що після персистування у макроорганізмі упродовж 2,5 місяців L-форма *M. bovis* реверсувала у бактеріальну форму: при бактеріологічному дослідженні проб внутрішніх органів двох морських свинок дослідної групи були ізольовані колонії культур-ревертантів.

Таким чином, збудник туберкульозу великої рогатої худоби штамів *Vallee* та № 8 є чутливим до L-трансформуючої дії антибактеріальних речовин: пеніциліну, лізоциму та їх комбінації, стрептоміцину, ципрофлоксацину та амікацину.

Індукована *in vitro* L-форма референтного штаму *Vallee Mycobacterium bovis* порівняно з бактеріальною характеризується нижчими патогенними та сенсibiliзогенними властивостями, зумовлюючи у кролів прояв у 6,25 раза слабших за інтенсивністю алергічних реакцій на ППД-туберкулін для ссавців та повільніший перебіг інфекційного процесу з обмеженими специфічними ураженнями у внутрішніх органах сприйнятливих тварин.

Отже, широке, а іноді недостатньо контрольоване, використання антибактеріальних препаратів у тваринництві може спричинити індукцію та довготривале персистування в організмі тварин L-форм збудника туберкульозу великої рогатої худоби, які за умов неврахування у чинних нормативних документах заходів, спрямованих на виявлення тварин з атиповим латентним перебігом туберкульозу, залишаються не виявленим джерелом інфекції у стаді, зберігаючи епізоотичну напруженість щодо туберкульозу.

1. Деякі аспекти профілактики туберкульозу сільськогосподарських тварин / [А.І. Завгородній, Б.Т. Стегній, А.П. Палій та ін.] // Ветеринарна медицина України. – 2010. – № 2. – С. 7-11.

2. Буряк Є.І. Антигенна спорідненість ППД-туберкуліну для ссавців і комплексного алергену з атипичних мікобактерій в алергічних тестах / Є.І. Буряк, І.Г. Лісовий, В.Ю. Столяр // Аграрний вісник Причорномор'я. Ветеринарні науки. – Одеса: СМІЛ, 2007. – Вип. 39. – С. 62-67.

3. Персистенция БЦЖ в организме крупного рогатого скота / [В.А. Долгунова, Г.А. Беспалов, Н.И. Овсянов и др.] // Туберкулез сельскохозяйственных животных. Сб. науч. тр. – Омск, 1989. – С. 35-40.

4. Івченко В. Варіабельність патологоанатомічних змін та причини рецидивів захворювання великої рогатої худоби на туберкульоз в оздоровлених господарствах / В. Івченко, І. Панченко, О. Горбатюк // Ветеринарна медицина України. – 2005. – № 7. – С. 11-13.

5. Кочемасова В.Н. Выделение L-форм микобактерий из патологического материала больных туберкулезом / В.Н. Кочемасова, А.Е. Кудрявцев, М.М. Дыхно // Проблемы туберкулеза. – 1970. – № 12. – С. 63-65.

6. Характеристика выделения бактерий у пациентов с различными формами туберкулеза легких / [В.С. Голанов, Л.В. Андреев, В.Е. Богданова и др.] // Проблемы туберкулеза. – 1994. – № 5. – С. 43-45.

7. Олексюк І.І. Латентний мікробізм та його роль в епізоотології туберкульозу великої рогатої худоби / І.І. Олексюк, Д.М. Левківський // Науковий вісник ЛНАВМ ім. С.З. Гжицького. – 2009. – Т. 11, № 2(41). – С. 225-229.

8. Антипова С.И. Спонтанная индукция L-форм микобактерий в эксперименте / С.И. Антипова, И.В. Коваленко, А.А. Солонекко, И.И. Румачик // Проблемы туберкулеза. – 1984. – № 10. – С. 68-70.

9. Галатова Л.В. Свойства L-форм микобактерий / Л.В. Галатова, М.И. Гертман, А.А. Петров // Ветеринария. – 1990. – № 2. – С. 32-33.

10. Колычев Н.М. Ветеринарная микробиология и иммунология / Н.М. Колычев, Р.Г. Госманов. – М.: Колос, 2006. – 432 с.

11. Кисленко В.Н. Ветеринарная микробиология и иммунология / В.Н. Кисленко, Н.М. Колычев, О.С. Суворина. – М.: Колос, 2006. – 183 с.

12. Бакулов И.А. Проблема L-форм микобактерий в ветеринарии / И.А. Бакулов, Т.Я. Зеленцова // Ветеринария. – 1980. – № 10. – С. 23-27.

13. Дорожкова И.Р. L-трансформация микобактерий в свете текущей эпидемиологической ситуации по туберкулезу в мире / И.Р. Дорожкова, З.С. Земскова, В.Н. Круду // Вестник Рос. Акад. мед. наук. – 1995. – № 7. – С. 30-33.

14. Бондарев И.М. Морфология начальных этапов L-трансформации микобактерий туберкулеза при сканирующей электронной микро-

скопии /И.М. Бондарев, С.А. Гулевская, М.Н. Немсадзе //Проблемы туберкулеза. – 1976. – № 12. – С. 55-61.

15. Лепнухова О. Вплив антибіотиків пеніцилінового ряду на безпеку продукції тваринництва /О. Лепнухова, О. Арнаутка //ІІІ Міжнар. наук. конф. студентів і аспірантів «Молодь та поступ біології» (Львів, 23-27 квітня 2007): тез. доп. – Львів, 2007. – С. 219.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ L-ФОРМ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ В РЕЗУЛЬТАТЕ ДЕЙСТВИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

**Кравченко Н.А., Дяченко А.М., Головач А.В.,
Дмитрук Е.Н.**

Институт сельскохозяйственной микробиологии НААН Украины,
г. Чернигов

*Показана чувствительность *Mycobacterium bovis* штаммов Vallee и № 8 к L-трансформирующему действию пенициллина, лизоцима и их комбинации, стрептомицина, ципрофлоксацина и амикацина. Установлены сниженные патогенные и сенсibiliзогенные свойства L-форм *Mycobacterium bovis* штамма Vallee по сравнению с бактериальной формой: проявление гиперчувствительности замедленного типа в более поздние сроки и с меньшей интенсивностью, а также, замедленное течение инфекционного процесса с ограниченными специфическими поражениями внутренних органов лабораторных животных.*

*Ключевые слова: L-формы микобактерий, *Mycobacterium bovis*, патогенность, сенсibiliзогенные свойства, трансформация, антибактериальные препараты.*

**BIOLOGICAL ACTIVITY OF L-FORM
OF MYCOBACTERIA TUBERCULOSIS
OF CATTLE TRANSFORMED UNDER
THE INFLUENCE OF ANTIBACTERIAL
PREPARATIONS**

**Kravchenko N.O., Dyachenko A.M., Holovach A.V.,
Dmitruk H.M.**

Institute of Agricultural Microbiology, NAAS of Ukraine, Chernihiv

The sensitivity of Mycobacterium bovis, strain Vallee, №8 to the action of L-transformation of penicillin, liozimum and their combinations was shown resulting in reduced pathogenic and sensibilizogenic properties of L-form of Mycobacterium bovis, strain Vallee in comparison with the bacterial form. Thus, the appearance of the hypersensitivity of delayed type with lower intensity as well as slow course of infectious process with limited specific injury of laboratory animals viscera were observed.

Key words: L-form, mycobacteria, Mycobacterium bovis, pathogenic, sensibilizogenic properties transformation, antibacterial preparations.