

Колос, 1966. – С. 231–234. 4. Бей-Биенко Г.Я. *Определитель насекомых европейской части СССР* / Г.Я. Бей-Биенко. – Л., 1970. – С. 5. 5. *Болезни овец и коз* / Под ред. П.М. Диренко. – К.: Урожай, 1983. – 104 с. 6. Бырка В.И. Мелкофагоз / *Справочник по болезням жвачных*. Под ред. проф. В.К. Чернухи. – К.: Урожай, 1987. – С. 155–156. 7. Вербицкая Л.А. *Паразитоценозы овец и меры борьбы с ними* / Л.А. Вербицкая // III науч.-практ. конф. Междунар. ассоциации паразитологов, 14-17 окт. 2008 г.: материалы. – Витебск: ВГАВМ, 2008. – С. 35–37. 8. *Довідник лікаря ветеринарної медицини* / [Вербицький П.І., Достоевський П.П., Бусол В.О. та ін.] за ред. П.І. Вербицького, П.П. Достоевського. – К.: Урожай, 2004. – С. 393–395. 9. *Домацкая М.Д. Экстенсивность и интенсивность поражения овец кровососками в Тюменской области*. – В кн.: *Вопросы ветеринарной арахно-энтомологии*, 1974. – Вып. 6. – С. 42–44. 10. *Клінічна діагностика внутрішніх хвороб тварин* / [Левченко В.І., Кондрахін І.П., Влізло В.В. та ін.] за ред. В.І. Левченка. – Біла Церква, 2004. – 608 с. 11. *Макролідні препарати – надійний захист худоби від гіподерматозу* / В.Ф. Галат, А.В. Березовський, К.В. Дідаш [та ін.] // *Науковий вісник НАУ*. – К., 2001. – № 38. – С. 113–116. 12. *Мединский Б.Л. Влияние мелкофагозной инвазии на шерстную продуктивность овец* / Б.Л. Мединский // *Уч. записки Каз. вет. ин-та*. – Казань, 1977. – Т. 127. – С. 32–33. 13. *Мишунов И.М. Распространение и ущерб, наносимый мелкофагозом овцеводству Читинской области*. – В кн.: *Вет. энтомология и акарология*. – М., 1983. – С. 182–185. 14. *Паразитология та інвазійні хвороби тварин: [практикум]* / В.Ф. Галат, А.В. Березовський, М.П. Прус, Н.М. Сорока; за ред. В.Ф. Галата. – К.: Вища освіта, 2004. – С. 134–135.

Статья передана в печать 28.04.2015 г.

УДК: 619:579.873.21

ІЗМЕНЧИВОСТЬ МИКОБАКТЕРИЙ В ПОВЫШЕНИИ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЁЗА

Ван Хунлян

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь

Инкубирование штаммов микобактерий в стимуляторах роста ВКГ и Микофаст, вызывает частичную потерю кислотоустойчивости клеток и придаёт способность к быстрому росту на этих питательных средах. У микобактерий происходят существенные изменения в клеточной стенке, в виде трансформации до CWDF МБТ, которые окрашиваются иммунопероксидазным методом

Incubation of strains of micobacteria in VKG and Mikofast growth stimulators, causing partial loss of acid resistance of the cells and gives ability to fast growth on this nutrient substances. Micobacteria changes their cellular wall like transformation before CWDF MBT stage, which painted by immunoperoxidase method.

Ключевые слова: туберкулёз, микобактерии, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, дифференциальная окраска, иммунопероксидазная окраска.

Keywords: tuberculosis, mycobacteria, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, differential staining, immunoperoxidase stain

Введение. Существующая бактериологическая диагностика туберкулёза направлена на обнаружение типичных кислотоустойчивых патогенных микобактерий и практически не учитывает плеоморфизм и изменчивость микобактерий туберкулёза, что существенно ограничивает возможности выявления туберкулёзной инфекции [2, 4].

Плеоморфизм микобактерий туберкулёза обнаружили в 1883 году F. Mallassez и W. Vignal [5], которые нашли в поражении кожи неокислостойчивые коккоиды, превращавшиеся в кислотоустойчивые палочки при пассаже на животных. Nocard и Roux (1887) описали ветвящиеся формы микобактерий туберкулёза (МБТ) [6].

В 1907 г. округлые зерноподобные формы *Mycobacterium tuberculosis*, не окрашивавшиеся по Цилю-Нильсену (Ц-Н), были описаны Much [7]. Spengler обнаружил в мокроте больных кислотоустойчивые (КУ) формы, которые он назвал «осколками» [8]. В 1912 г. Krylov показал, что неокислостойчивые туберкулёзные палочки могут быть Грам-отрицательными (Гр -). Они могут давать гранулоподобные Гр+ формы, развивающиеся в частично КУ палочки [9]. В 1931 г. Maher суммировал результаты по культивированию неокислостойчивых форм микобактерий туберкулёза (МБТ) из старых культур [10]. Ravetllat and Pla у Agtengol показали три фазы жизненного цикла МБТ от НКУ кокков, диплококков, тетрад и цепей кокков, «зооглейной массы» до промежуточных форм, включающих НКУ палочки и зёрна Муха и бацилл Коха (постоянная форма) [11].

Благодаря работам Klienberger-Nobel, сложились представления об L-формах бактерий с дефектной клеточной стенкой, способных существовать в виде сферо- и протопластов [12]. Термин «cell wall deficient (CWD) – клетки с дефектной клеточной стенкой» предложил Dienes, который включает все изменённые формы МБТ [4]. Scilar, изучая проблему изменчивости, установил существование МБТ в двух формах – бациллярной и в виде микрококков [13].

В зависимости от условий выделения и культивирования исследователи обнаруживали у CWDF МБТ разную морфологию и степень кислотоустойчивости, причем, по внешним признакам их было трудно отнести к микобактериям [2, 4, 5].

Изучение полиморфизма МБТ и разработка методов их обнаружения показало их роль в возникновении латентной (скрытой) туберкулёзной инфекции [1, 14]. Установлено, что в большинстве случаев попавшие в организм патогенные КУ микобактерии конвертируются в НКУ CWDF, которые могут оставаться в дормантном состоянии и реверсировать в родительские КУ формы при развитии иммунодефицитного состояния хозяина [15]. В этой связи, бактериологическая диагностика, направленная на поиск классических кислотоустойчивых

рубиново-красных палочек, логична только при выявлении развитых форм болезни с морфологическими изменениями тканей, хотя это также ограничивает ее результативность [4].

В ветеринарной медицине давно существует проблема положительных реакций на туберкулин у коров при отсутствии у них видимых патологических изменений и отрицательных результатах бактериологического посева патологического материала на общепринятые питательные среды [1, 16]. Выделение атипичных микобактерий не всегда может объяснить причину возникновения таких реакций. Использование методов выявления L (CWD) форм микобактерий туберкулеза показало, что причиной туберкулиновых реакций у коров может быть латентная туберкулезная инфекция [17].

Для выделения CWDF МБТ использовали глицериновый агар, бульоны с сывороткой крови и декстрозой, PPLO, среду Kirchner с сахарозой и ионами Mg, среду Murohashi-Yoshida [18]. Считалось, что CWDF МБТ лучше растут на жидких средах с глицерином и твином 80 с добавлением сыворотки (лошади, свиньи, овцы или человека) и осмотических стабилизаторов (сахароза) [19, 20]. Китайские исследователи для выделения of CWD forms of mycobacteria использовали питательные среды TSA-L и TB-L с сывороткой овцы, 92 T B L [21], 92 3TB, 92 3TBL [22]. Особый интерес представляет использование таких сред для выделения CWDF МБТ из крови [23]. Стимулятор роста MucCel DW - стерильная, прозрачная жидкость с 0,1% хлоргексидина [3].

Вместе с тем, фактически нет универсальных рекомендаций по выделению CWDF МБТ, использование жидких и полужидких сред затрудняет обнаружение роста и работу с культурами, при этом, как правило, процесс выделения CWDF достаточно продолжителен.

Адаптация МБТ к защитным факторам организма, помимо образования L(CWD) форм, может проявляться их переходом в покоящиеся (дормантные) формы с резким снижением метаболической активности и отсутствием деления [24]. Для выделения таких форм, вероятно, требуется стимуляция способности к делению и определенный состав питательных сред. В этой связи, разработка новых питательных сред и методов выделения CWD и дормантных форм МБТ представляет значительный интерес.

Цель исследований – доказать, что предварительная инкубация в стимуляторах роста определенного состава МБТ, находящегося в крови, посев на соответствующие питательные среды обеспечивает получение через 2-5 суток роста *M. tuberculosis* и *M. bovis*, как правило, в CWDF и позволяет существенно повысить скорость и чувствительность бактериологической диагностики

Материал и методы исследований. Штаммы: *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇R_v, *Mycobacterium bovis* 8, *Mycobacterium bovis* BCG-1, *Mycobacterium bovis*.

Питательные среды и стимуляторы роста. Стимулятор роста и питательная среда ВКГ, «Ганза» (патент Украины №43467), стимулятор роста и питательная среда «Микофаст» («Doctor Vremia», Республика Беларусь). Взвеси культур, кровь, гомогенаты лимфатических узлов, смешанные со стимуляторами роста (1:1-1:2), инкубировали 24-48 ч при 37°C и по 0,5-0,7 мл высевали на питательные среды ВКГ и Микофаст (на 2-3 чашки Петри или на 4-5 пробирок). Контролями служили посевы стимуляторов роста без культур на соответствующие питательные среды.

Антитела для иммунопероксидазного окрашивания выделяли из антисывороток кроликов к соникатам *M. bovis* Vallee и *M. tuberculosis* H₃₇R_v. Для очистки антител (Ig) к антигенам, специфичным для *M. bovis* и *M. tuberculosis*, использовали сорбент из Affi-gel (Bio-Rad) с фиксированными на нём антигенами *M. bovis* и *M. tuberculosis*. Очищенные антитела конъюгировали с пероксидазой (Sigma) по Nakane (1974).

Препараты-мазки культур инактивировали нагреванием при 65°C, 2 ч. Эндогенную пероксидазу инактивировали нанесением на препарат-мазок 3% перекиси водорода на 30 мин и 95% метанола на 5 мин с последующим промыванием деионизованной водой. Далее на препараты-мазки наносили конъюгат пероксидазы с Ig к антигенам *M. bovis* или *M. tuberculosis*, инкубировали 1 ч при 18-22°C. Препараты-мазки промывали деионизованной водой с твином 20. Далее на них наносили субстратную смесь диаминобензидина (ДАБ) или смесь ДАБ и тетраметилбензидина с перекисью водорода. Через 1 ч мазки промывали деионизованной водой, высушивали и микроскопировали на световом микроскопе Olimpus BX51.

Для демонстрации возможности выделения CWDF микобактерий из крови с применением питательных сред ВКГ и Микофаст 2 кроликов заразили внутривенно *M. tuberculosis* H₃₇R_v и 2 кроликов per os *M. bovis* Vallee (по 1 мг бактериальной массы в 1 мл 0,85% раствора NaCl). Через 1 месяц у кроликов с соблюдением стерильности брали кровь, которую смешивали 1:1 со стимуляторами роста ВКГ и Микофаст и после 24 ч инкубации при 37°C высевали и высевали на среды ВКГ и Микофаст.

На питательные среды ВКГ и Микофаст была посеяна кровь коров, у которых после убоя при бактериологическом исследовании был выделен возбудитель туберкулеза. Контролем служила кровь здоровых туберкулиноцитательных телят.

Результаты исследований. В препаратах-мазках из вакцины БЦЖ, как и культур *M. tuberculosis* и *M. bovis*, выращенных на среде Левенштейна-Йенсена, окрашенных по Ц-Н, закономерно обнаруживали типичные по морфологии кислотоустойчивые палочки. Редко встречались неокислотоустойчивые палочки и кокки (рисунок 1).

В мазках из колоний, выросших на питательных средах ВКГ и Микофаст, независимо от вида микобактерий, обнаруживали преимущественно неокислотоустойчивые (НКУ) CWD формы. Причём, если после инкубации в стимуляторах роста не менее 50% клеток еще оставалось кислотоустойчивыми, то после посева этой же суспензии на среды ВКГ и Микофаст, через 48-96 ч отмечался рост только НКУ форм (рисунок 2). Штаммы МБТ могли давать рост различных форм: крупных кокков (рисунок 2).



Рисунок 1 – *M. bovis* BCG до инкубации в стимуляторе роста. Ц-Н, (10x100)

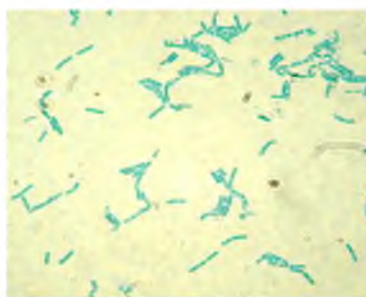


Рисунок 2 – *M. bovis* BCG-1 на среде ВКГ через 48 ч после посева. Ц-Н, (10x100)

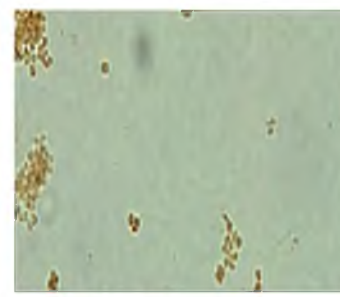
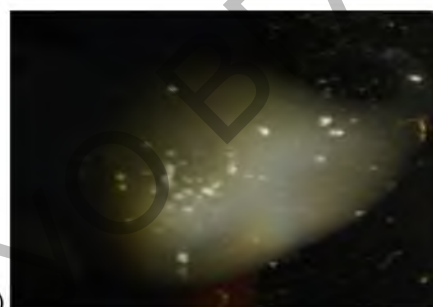


Рисунок 3 – *M. bovis* BCG на среде Микофаст. Иммунопероксидазная окраска (10x100)

CWD культуры *M. tuberculosis* и *M. bovis*, выращенные на питательных средах ВКГ и Микофаст, сохраняли родительские антигены. Они специфически окрашивались иммунопероксидазным методом с применением конъюгатов антител к *M. tuberculosis* и *M. bovis* с пероксидазой (рисунок 3), агглютинировались антисыворотками *M. tuberculosis* H₃₇R_v и *M. bovis* Vallee и не давали агглютинации в негативной сыворотке (рисунок 4).



а)



б)

Рисунок 4 – Суспензия *M. tuberculosis* H₃₇R_v, полученного на среде Микофаст: а) в антисыворотке *M. tuberculosis* H₃₇R_v; б) в негативной сыворотке (антисыворотка *M. tuberculosis* H₃₇R_v, адсорбированная антигенами *M. tuberculosis* и *M. bovis*)

Исследования, проведённые на известных штаммах МБТ, показали, что применение стимуляторов роста и питательных сред ВКГ и Микофаст позволяет получить быстрый рост (48-96 ч) их CWD форм, которые можно рассматривать, как маркер туберкулёзной инфекции.

Исследование крови коров больных туберкулёзом, через 3-5 суток после посева на питательные среды ВКГ и Микофаст во всех случаях получен рост колоний неокислостойчивых палочек, в том числе (пустых) (слабоокрашенных биполярных) кокков, а также КУ рубиново-красных палочек, которые также окрашивались иммунопероксидазным методом (рисунки 5, 6).

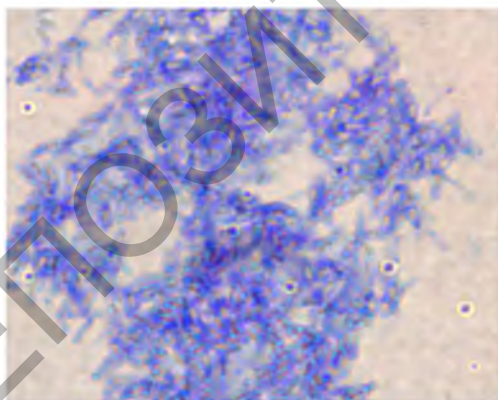


Рисунок 5 – Посев крови коровы на среду Микофаст (5 сутки), неокислостойчивые палочки (пустые), биполярные Ц-Н (10x100)

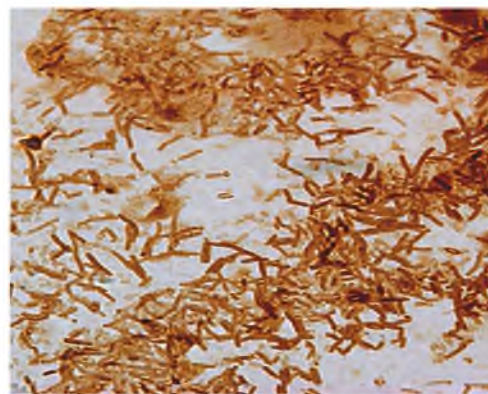


Рисунок 6 - Морфология микобактерий из посева крови коровы, больной туберкулёзом, на среду Микофаст 5 сутки, иммунопероксидазная окраска (10x100)

Нетуберкулезная микрофлора и ткани здоровых животных при использованных параметрах окраски приобретали синий или зеленовато-голубой цвет и чётко отличались от CWD МБТ.

Заключение. Исследования, проведённые на эталонных штаммах микобактерий, показали, что их инкубация (24 ч при 37°C) в стимуляторах роста ВКГ и Микофаст, вызывает частичную потерю кислотоустойчивости клеток и придает способность к быстрому росту на питательных средах ВКГ и Микофаст. Судя по полной потере кислотоустойчивости и изменению морфологии выросших культур, у микобактерий происходят существенные изменения в клеточной стенке, поэтому такие культуры мы считали CWD FM. Если бы быстрый рост (за 2-5 суток) шёл за счет каких-то контаминантов, а микобактерии не претерпевали

трансформации, то в препаратах-мазках из колоний, безусловно, присутствовали бы в значительных количествах неизменённые КУ родительские клетки.

Литература. 1. Агеева Т. Н. Результаты испытания среды ВКГ и набора ИФА – «Бовитуб» в условиях производства // Агеева Т. Н., Лысенко А.П., Красникова Е.Л. // Ученые записки УО «ВГАВМ»: Сборник научных трудов по материалам международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины и зоотехнии», посвященной 80-летию основания УО «ВГАВМ», г. Витебск, 4-5 ноября 2004 года. – Т. 40, ч. 1. – С. 110-113. 2. Архипов И.Н. Серологические, бактериологические и молекулярно-генетические маркеры туберкулезной инфекции крупного рогатого скота: Автореф. дисс. ... канд. вет. н.- Минск 2011.- 21с. 3. Лысенко А.П. Диагностическая ценность питательной среды ВКГ для прижизненного выявления туберкулезной инфекции у крупного рогатого скота / А.П. Лысенко, А.П. Лемеш, И.Н. Архипов, [и др.] // Ветеринарна медицина. - Мижвид. темат. наук. зб. 85.- 2005.- С.695-699. 4. Mattman L.H. Cell Wall Deficient Forms. Stealth Pathogens / L.H Mattman / CRC Press. 2nd ed., 1993. 5. Malassez L., Vignal W. Tuberculose zoogloeiue. Archives de Physiologie Normale et Pathologique, // L Malassez., W Vignal./1883, series 3, 2, 369-412. 6. Nocard, Roux. Ann. Inst.Pasteur // Roux. Ann Nocard, //1887, 1, 19. 7. Much H. About granular, according to Ziel nonstainable form of tuberculous virus. Beitrage Klinik der Tuberculose, // H Much 1907, 8, 85-89. 8. Spengler C. Z. Hyg.u.Infectionskrankh // C. Z. Spengler. 1905, 49, 541. 9. Krylov D.O. Z. Hyg. u. Infectionskrankh, / D.O Krylov. / 1912, 70, 135. 10. Maher S. J. Am.Rev.Tuberc./ S. J Maher // 1925, 12, 365. 11. Ravetllat J., Pla y Armengol R. La bacteria de la tuberculosis, Barcelona, Tipografia Catalana, // J Ravetllat //1924. 12. Klienberger-Nobel E., Origin, development and significance of L-forms in bacterial cultures. J.Gen. Microbiol., //E Klienberger-Nobel// 1949, 3, 434-442. 13. Csillag A. Spore formation and «dimorphism» in the mycobacteria. J. Gen. Microbiol.// A Csillag 1961, 26, 97-109. 14. Zemskova Z.S., Latent tuberculosis infection (In Russian) // Z.S Zemskova., I.R Dorozhkova // Moscow, - Medicina. - 1984. - 221 p. 15. Chandrasekhar S. Studies on cell-wall deficient non-acid fast variants of Mycobacterium tuberculosis. Tubercle and Lung Disease.// S. Chandrasekhar , S Ratnam // 1992, p. 273-279. 16. Anon. The tuberculin test. Vet.Rec.,// Anon 1942, 54, p.191-192. 17. Baiteriakova T.I., Persistence of mycobacteria in cattle (In Russian). Problemy Tubeculeza i Bolezni Legkikh / T.I. Baiteriakova, I.N. Rubtsova, I.A Makarov// 1982, 11, p.59-60. 18. Chiodini R.J.,.Sheroplasic phase of mycobacteria isolated from patients with Crohns disease. Journal of Clinical Microbiology./ R.J Chiodini., H.J Van Kruijningen., W.R Thayer., J.A Couto // 1986, 24, 357-363. 19. Markesich D.C., Progress in culture and subculture of shero-plasts and fastidious acid-fast bacilli isolated from intestinal tissues. Journal of Clinical Microbiology/ D.C Markesich. D.Y.Graham., H.H Yoshimura, //1988, 26, 1600-1603. 20. Wu Fengxia., Clinical significance of the examination to MTB-L. Bulletin of Chinese Antituberculosis Association // Fengxia Wu, Huiling Li, Xinjun Wang // 2004-02. 21. Zhu Mingli, et al. Detecting mycobacteria and their L forms in peripheral blood from pulmonary tuberculosis patients by cultivation with hemolyzed-centrifugated blood in liquid medium. Chinese Journ. Of Tuberculosis and Resp. Diseases, 2000-09. 22. Zhu Mingli, et al. Detecting mycobacteria and their L forms in peripheral blood from pulmonary tuberculosis patients by cultivation with hemolyzed-centrifugated blood in liquid medium. Chinese Journ. Of Tuberculosis and Resp. Diseases, / Mingli Zhu , Peiyong Xia , Yuanhe Zhang // 2000-09. 23. Zhu Mingli, Comparison of five methods for detection of Mycobacterium tuberculosis and their L-forms in peripheral blood of pulmonary tuberculosis and lung cancer patients. Journal of Bengbu Medicinac College /. Mingli Zhu, Yuanhe Zhang, Mingjun Li, Linian Huang, Enju Wang, Tefu Lin, Min Yao//, 2001-01. 24. Wayne L.G., Sohaskey Ch.D. Nonreplicating persistence of Mycobacterium tuberculosis. Annual Review of Microbiology. // L.G. Wayne 2001 // Vol. 55, p.139-163.

Статья передана в печать 12.03.2015 г.

УДК 619.616.98:579.841.94:579.22

ПОДБОР РЕЖИМОВ РЕАКТОРНОГО КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПАСТЕРЕЛЛ И БОРДЕТЕЛЛ

*Вербицкий А.А., *Морозов Д.Д., **Финогенов А.Ю., **Толяронок Г.Е.

*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь,

** РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

В статье рассматриваются вопросы реакторного выращивания пастерелл и бордетелл в жидких питательных средах. Определены оптимальные режимы глубинного культивирования указанных бактерий в условиях реактора.

The article considers some features of the reactor growing of pasteurellae and bordetellae bacteria in liquid media. The optimal conditions of cultivation in the reactor are determined.

Ключевые слова: пастереллы, бордетеллы, реактор, культивирование, режим, аэрация.

Keywords: pasteurellae, bordetellae, reactor, cultivating, conditions, aeration.

Введение. Респираторные болезни свиней имеют широкое распространение во всех странах мира с развитым свиноводством и наносят огромный экономический ущерб отрасли. По происхождению и клинико-морфологическому проявлению они весьма разнообразны, чаще бактериальной этиологии и, как правило, регистрируются у животных в послеотъемный период. По результатам бактериологических исследований установлено, что возбудитель бордетеллеза выделяется из патматериала в 5-30% случаев. Наряду с бордетеллами, в 15-40% случаев обнаруживается возбудитель пастереллеза [2]. Возрастная восприимчивость свиней к указанным возбудителям совпадает. Ввиду этого появляется необходимость сочетанной профилактики бордетеллеза и пастереллеза. Наиболее действенной мерой профилактики инфекционных болезней является иммунизация животных специфическими препаратами - вакцинами [1]. Для получения ассоциированной вакцины против пастереллеза и бордетеллеза необходимо нарастить достаточное количество бакмассы, пригодной для конструирования препарата. Поэтому целью данной работы явилось отработка оптимальных режимов культивирования пастерелл и бордетелл, позволяющих в короткие сроки наращивать максимальное количество бакмассы, пригодной для получения ассоциированной вакцины.