

УДК 619:616.98:579.873.21:616-07

Лысенко А.П., доктор ветеринарных наук, профессор*
Власенко В.В., доктор биологических наук, профессор**
Хунлян Ван, аспирант***
Лемиш А.П., кандидат ветеринарных наук****
Кравченко П.И., ветеринарный врач*

*Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслеского, г. Минск

**Винницкий государственный аграрный университет, г. Винница

***Витебская государственная академия ветеринарной медицины, г. Витебск

**** ЗАО «Консул», г. Брест

ИЗМЕНЕННЫЕ ФОРМЫ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

Резюме

Путем инкубации типичных кислотоустойчивых микобактерий туберкулеза в специальных стимуляторах роста и посева на питательные среды ВКГ и Микофаст получены измененные (с дефектной клеточной стенкой –CWD) некислотоустойчивые формы *Mycobacterium bovis* штаммов №8 и BCG и изучена их морфология и свойства. Установлено, что уже в процессе инкубации в стимуляторах роста микобактерии теряли кислотоустойчивость и приобретали способность к быстрому росту (2–5 суток). При посеве суспензий микобактерий в стимуляторах роста на питательные среды ВКГ и Микофаст рост начинался с образования симпласта, на котором формировались некислотоустойчивые палочковидные и кокковидные формы, сохраняющие часть общих антигенов с родительской кислотоустойчивой формой микобактерий. Показано, что полученные CWD формы *M. bovis* 8 и BCG имели такую же морфологию, как и изоляты из крови туберкулин-положительных коров. Относительно редко в незначительных количествах они трансформировались в типичные кислотоустойчивые палочки.

Summary

By an incubation typical acid fast cells in special growth stimulants and seed on nutrition mediums VKG or Myccel DW are received cell wall deficient not acid fast forms of *Mycobacterium bovis* strains №8 and BCG. It is established that in course an incubation mycobacteria lost acid fastness and gained ability to rapid growth (2–5 days). At seed suspensions of mycobacteria in growth stimulants on nutrition mediums VKG or Myccel DW growth was began with formation of a symplast on wich were formed not acid fast rod and coccoid cells keeping of parts common antigens with parent strains. It was shown that the received forms had same morphology as well isolates from blood tuberculin positive cows. Rather seldom in insignificant quantities they were transformed in typical acid fast cells.

Поступила в редакцию 02.07 2015 г.

ВВЕДЕНИЕ

Борьба с туберкулезом ведется с позиции мономорфизма микобактерий туберкулеза (МБТ), поэтому затрагивает лишь «видимую часть айсберга» – заболевание с клиническими и морфологическими признаками [4, 5, 24]. Однако успешность МБТ, как патогена, связана не только с известными свойствами «бациллы Коха». 2/3 генов МБТ способны обеспечивать альтернативные пути обмена и синтеза клеточной стенки, что позволяет менять форму и

свойства для выживания в неблагоприятных условиях [17, 20, 21]. Измененные МБТ объединяют термином «cell wall deficient» (CWD) – формы с дефектной клеточной стенкой [18, 24], хотя ее изменения повышают жизнеспособность [4, 8].

CWD МБТ способны длительно персистировать в организме [3, 5, 22, 24]. Считается, что риск перехода латентной инфекции в активное заболевание не велик, поэтому основное внимание уделяется не ранней диагностике, а выявлению развив-

шегося заболевания – туберкулезных очагов и кислотоустойчивых (КУ) палочек.

Обнаружить CWD МБТ традиционными методами бактериологической диагностики сложно [15, 24]. Они не кислотоустойчивы (НКУ) и отличаются по морфологии и свойствам от «бациллы Коха», так что их трудно отнести к роду *Mycobacterium*. Нередко, CWD МБТ считают «контаминацией».

CWD МБТ далеко не безобидны. Помимо рецидивов туберкулеза [3, 7] их связывают с развитием саркоидоза, болезни Крона, заболеваний сердечно-сосудистой и нервной системы, сахарного диабета. CWD МБТ находят в крови больных лейкозом и при разных формах рака [12, 13, 14, 16, 22, 23, 28].

Источником CWD МБТ могут быть животные. Противотуберкулезные мероприятия свели до минимума случаи туберкулеза животных, но латентная инфекция еще широко распространена [4,7]. Продукты от инфицированных животных, с учетом того, что термическая обработка полностью не убивает МБТ [4, 8, 9, 11], являются факторами передачи инфекции и способствуют распространению, пусть даже и измененного возбудителя в популяции людей, который, в частности, при иммунодефицитах может вызывать активное заболевание. Это заметно по высокому уровню инфекции *M. avium* у больных СПИДом [24], хотя промышленное птицеводство считается свободным от туберкулеза.

Ранее, преимущественно, изучались осмотически низкорезистентные L-формы МБТ, получаемые под действием веществ, влияющих на клеточную стенку [3, 7]. Было замечено, что необычные питательные среды [6], предпосевная обработка [27], неблагоприятные условия *in vivo* [25], голодание [26, 29] могут вызывать появление CWD МБТ с ригидной клеточной стенкой. Разработан метод культивирования, включающий инкубацию посевного материала в специальном стимуляторе роста (ВКГ), и посев смеси на среду ВКГ, на которой колонии CWD МБТ появлялись че-

рез 2–5 суток [4]. Такой эффект получен и при использовании стимулятора роста и питательной среды другого состава [8, 9, 11].

Изучение CWD МБТ неразрывно связано с их визуальной идентификацией, что ограничивается скудной видеоинформацией «доцифровой эры».

Цель работы – получение на питательных средах ВКГ и Микофаст измененных форм известных штаммов МБТ и изучение морфологии для расширения возможностей их визуальной идентификации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Штаммы: *Mycobacterium bovis* 8 (ВГНКИ), длительно пересевавшийся на среде Левенштейна-Иенсена (Л-И) без признаков контаминации; *M.bovis* BCG-1 (ампулы с вакциной НИИЭМ им. Гамалеи РАМН); изолят из стандарта ППД туберкулина (1st International standard PPD *M.bovis* AN5, CVL, Lion, IS PPD) [9, 11].

Стимуляторы роста и питательные среды. Стимулятор роста ВКГ, стимулятор роста Микофаст с 0,1% хлоргексидина – стерильные, прозрачные жидкости.

Питательные среды ВКГ «Ганза» (патент Украины №43467) и Микофаст (Республика Беларусь) суспендировали в деионизованной воде, расплавляли, фасовали в пробирки, автоклавировали 15 мин при температуре 121°C и использовали после контроля на стерильность.

Получение CWD МБТ. *M. bovis* 8 со среды Л-И и вакцину *M. bovis* BCG смешивали со стимуляторами роста ВКГ и Микофаст (0,5 мг/мл), инкубировали 24 ч при температуре 37°C и по 0,3 мл высевали на среды ВКГ и Микофаст. Контролями служили посеvy стимуляторов роста без культур. Посевы инкубировали при температуре 37°C 10 суток. Мазки из колоний окрашивали по Кinyoun и иммунопероксидазным методом. Микроскопию проводили на микроскопе Olympus 56BX.

Иммунопероксидазное (ИП) окрашивание. Антитела выделяли из кроличьей антисыворотки к соникату *M. bovis* 8 аф-

финной хроматографией на Affi-gel (Bio-Rad) с антигенами *M. bovis* и конъюгировали с пероксидазой по Nakane (1977).

В мазках эндогенную пероксидазу инактивировали 3% перекисью водорода (1 ч) и охлажденным метанолом (5 мин). На мазки на 1 ч (18–22⁰С) наносили конъюгат пероксидазы и антител *M. bovis* (1:80), а далее – диаминобензидин (ДАБ) с перекисью водорода (20 мин). После этого мазки докрашивали по Kinyoun. На каждом этапе мазки промывали водой с твином 20. При такой окраске КУ клетки окрашивались в рубиново-красный цвет, НКУ формы МБТ – от светло-корич-

невого до красно-коричневого, немикобактериальная микрофлора и ткани приобретали синий цвет.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При инкубации в стимуляторах роста МБТ частично теряли кислотоустойчивость, в мазках появлялись светло-красные и синие клетки. При посеве таких суспензий на питательных средах росли, преимущественно измененные НКУ формы МБТ (рисунок 1). Могла появляться своеобразная сеть-симпласт [2], из которой формировались палочки (рисунок 2) и коккоиды (рисунок 3).

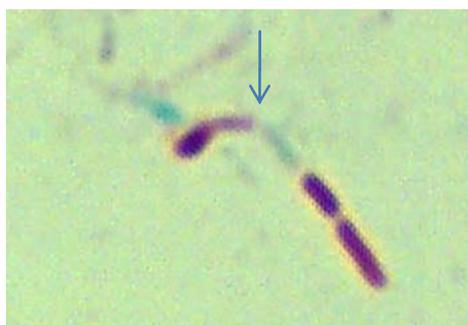


Рисунок 1 – Рост *M. bovis* 8 на среде Микофаст (4 сутки), образование НКУ клетки (стрелка) в цепи КУ палочек (Kinyoun, 10×100)

При культивировании *M. bovis* 8 на среде Микофаст преобладали НКУ палочки разной длины с включениями зерен (рисунки 2, 4). На среде ВКГ чаще росли кокковидные НКУ формы (рисунок 3), которые после нескольких пассажей могли трансформироваться в длинные зернистые палочки.

Морфология полученных СВД штаммов *M. bovis* была такой же, как и у изолятов из туберкулинов [8, 11] и крови животных и человека. В частности, в изоляте из IS PPD *M. bovis* AN5 встреча-

лись длинные НКУ палочки с 1–2 зернами, такие же, как и в посевах *M. bovis* 8 (рисунки 4, 5). Периодически небольшая часть клеток могла превращаться в типичные рубиново-красные палочки (рисунок 5).

В посевах крови и патологического материала также можно было обнаружить трансформацию НКУ форм в КУ палочки. На рисунке 6 представлен рост посева крови туберкулинпозитивной коровы. Видны НКУ коккоиды, длинная зернистая палочка и коккоид, из которого образуются рубиново-красные палочки.

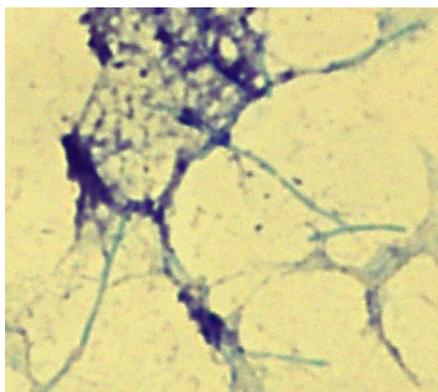


Рисунок 2 – Рост *M. bovis* 8 на среде Микофаст (4 сутки). Образование НКУ сети (симпласт) и длинных палочек (Kinyoun, 10×100)

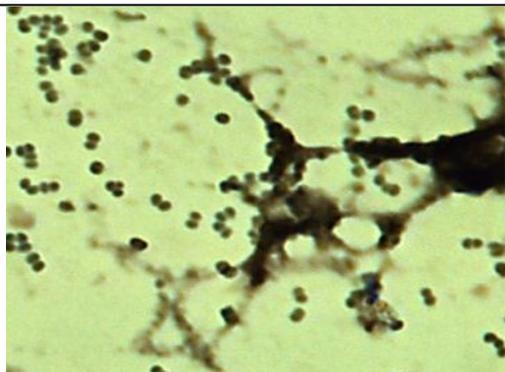


Рисунок 3 – Рост *M. bovis BCG* на среде ВКГ. III окрашивание с докраской по Kinyoun. Видна темно-коричневая сеть, образующая кокковидные формы

Рисунок 4 – Рост *M. bovis 8* на среде Микофаст (6 сутки). Полное исчезновение КУ форм. Kinyoun, 10×100

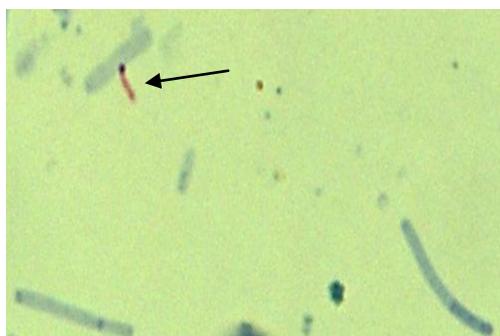


Рисунок 5 – II пассаж изолята из PPD *M.bovis AN5* на среде Микофаст. Длинные синие зернистые, а также типичная рубиново-красная палочка (стрелка). Kinyoun, 10×100

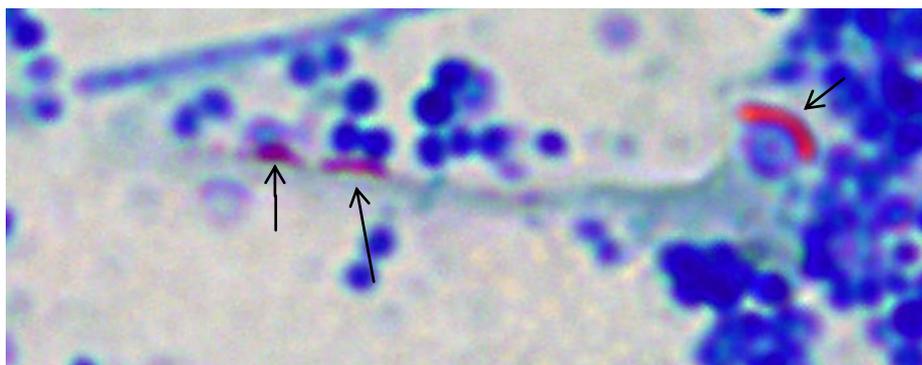


Рисунок 6 – Посев крови туберкулинопозитивной коровы на среде Микофаст (5сутки). НКУ коккоид образует рубиново-красные палочки (помечены стрелками), 10×100

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Механизм действия стимуляторов роста, состав которых был подобран эмпирически, точно не установлен [4]. Видимо, они, также как и голодание [29], включают у МБТ программы выживания с трансформацией клеточной стенки, что расширяет

возможности использования питательных веществ, ускоряет деление клеток в широком температурном диапазоне [25, 29].

Трансформация МБТ начиналась в стимуляторах роста и завершалась на питательной среде. Палочки теряли КУ, в них образовывались зерна. Колонии появ-

лялись уже через 48 ч, в сроки, отмеченные при выделении CWD МБТ из крови [24]. В начальных стадиях трансформации [2] образовывалась сеть (симпласт), из которой могли образовываться палочки, кокковидные и другие формы. Относительно редко они трансформировались в типичные КУ палочки.

Полученные измененные НКУ формы имели общие антигены с родительскими МБТ и специфически окрашивались иммунопероксидазным методом с докраской по Kinyoun.

По данным научной литературы МБТ могут существовать в разных формах, которые можно объединить в ряд групп:

- фильтрующиеся, ультрамелкие, спороподобные формы, зерна Муха, «осколки» Шпенглера, светопреломляющие зерна [3, 13, 19, 21];

- НКУ палочковидные и колбообразные формы (Грам + и Гр-, незернистые и с зернами) [2, 4, 5, 7, 10, 13, 24, 27, 29];

- НКУ кокковидные формы (дипло-, тетра-, стрепто-, мико-) [4, 5, 7, 10, 13, 15, 22, 24, 27, 29];

- шаровидные, овоидные, осмотически низкорезистентные L-формы [4, 5, 10, 15, 22, 24, 26];

- округлые «ежеподобные» (с игольчатыми выростами) структуры [1];

- фунгоидные и нитеподобные фор-

мы [4, 7, 13, 24];

- протопласты (скопления зернистой массы), симпласты, сотоподобные образования [5, 13, 22].

В настоящих исследованиях мы наблюдали образование типичными МБТ некислотоустойчивых палочковидных, кокковидных (дипло-, тетра-) форм и симпласта.

ВЫВОДЫ

1 При инкубации в стимуляторах роста ВКГ или Микофаст микобактерии туберкулеза теряют кислотоустойчивость и приобретают способность к быстрому росту (2–5 суток) на соответствующих средах.

2 При посеве суспензий микобактерий в стимуляторах роста на питательные среды ВКГ и Микофаст рост начинается с образования симпласта, на котором формируются некислотоустойчивые палочковидные и кокковидные формы, сохраняющие часть общих антигенов с родительской кислотоустойчивой формой.

3 Полученные измененные CWD формы *M. bovis* 8 и BCG имели такую же морфологию, как и изоляты из крови туберкулинпозитивных коров и ППД туберкулина *M. bovis* AN5. Относительно редко они в незначительных количествах могли трансформироваться в типичные кислотоустойчивые (рубиново-красные) палочки.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Асташова, Е.А., Кадочкин, А.М. Особенности морфогенеза L-форм микобактерий туберкулеза бычьего вида / Е.А. Асташова, А.М. Кадочкин // Ветеринария. – 1989. – №7. – С.31–34.
- 2 Бондарев, И.М. Морфология начальных этапов L-трансформации микобактерий туберкулеза при сканирующей электронной микроскопии / И.М. Бондарев, С.А. Гулевская, М.Н. Немсадзе, А.Б. Михайлов // Пробл. туберкулеза. – 1976. – №12. – С. 55–61.
- 3 Гольшевская, В.И. Роль ультрамелких форм микобактерий в патоморфозе туберкулеза / В.И. Гольшевская // Пробл. туберкулеза. – 2003. – № 3. – С.26–30.
- 4 Власенко, В.В. Туберкулез в фокусе проблем современности. – Винница: Наука, 1998. – 350с.
- 5 Земскова, З.С., Дорожкова, Н.И. Скрыто протекающая туберкулезная инфекция: М.– Медицина.– 1984.– 221 с.
- 6 Кумбари, С.А. О новой форме роста туберкулезных бацилл в связи с иммунитетом при этом заболевании / С.А. Кумбари // Гигиена и санитария. – 1910. – Т.1. – С.29.

- 7 Лемши, А.П. Ранняя диагностика туберкулеза крупного рогатого скота на основе выявления бактериологического маркера инфекции: дис. к. вет. н. – Минск. – 2008 – 153 с.
- 8 Лысенко, А.П. Изучение термической устойчивости микобактерий туберкулеза / А.П. Лысенко, А.П. Лемши, Е.Л. Красникова [и др.]. // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2007. – №2. – С.42–46.
- 9 Лысенко, А.П. Исследование термической устойчивости микобактерий туберкулеза с использованием новых методов культивирования микроорганизмов / А.П. Лысенко, Т.П. Новик, А.П. Лемши [и др.]. // Экология и животный мир 2009. – №1. – С.60–66.
- 10 Николаева, Г.М. Морфология измененных форм микобактерий туберкулеза / Г.М. Николаева, И.П. Дорожкова // Пробл. туберкулеза. – 1988. – №4. – С.57–59.
- 11 Новик, Т.П. Биологические свойства термически обработанных микобактерий: дис. канд. биол. наук. – Минск, 2010 – 183 с.
- 12 Anestad, G, Hoel, T, Scheel, O. Atherosclerosis and tuberculosis: are they both chronic infectious diseases? *Scand J Infect Dis* 2001;33(10):797.
- 13 Beran, V., Havelkova, M., Kaustova, L. [et.al.]. Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review. *Veterinarni Medicina*, 2006, 51, (7): 365–389.
- 14 Broxmeyer, L. Is mad cow disease caused by a bacteria? *Med Hypotheses*. 2004; 63 (4):731–9.
- 15 Chandrasekhar, S., Ratnam, S. Studies on cell-wall deficient non-acid fast variants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuber Lung Dis* 1992; 73(5):273–9.
- 16 Centkowski, P, Sawczuk-Chabin, J, Prochorec, M. Hodgkin's lymphoma and tuberculosis coexistence in cervical lymph nodes. *Leuk Lymphoma*. 2005.– 46(3):471–5.
- 17 Cole, S., Brosh, R. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence // *Nature*. – 1998. – Vol.393. – №6685. – P.537–544.
- 18 Dienes, L. Nomenclature of bacterial L-form and cell wall-defective Bacteria // *J. Infect. Dis.* – 1973. – Vol.127. – P.476–477.
- 19 Fontes, A. Bemerkungen ueber die tuberculoese infection und ihr virus. *Mem. Inst.Oswaldo Cruz* 1910; (2): 141–46.
- 20 Garnier, T., Eiglmeier, K., Camus, J. The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*// *J. of Clin. Microbiology*, 1996. – Vol 34. – No.10. – P.2469 –2474.
- 21 Ghosh, J., Larsson, P., Singh, B. [et.al.]. Sporulation in mycobacteria // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 2009. – 106, 26, P.10781–10786.
- 22 Guliang, H, Tefu, L. *Mycobacterium tuberculosis* L-forms // *Microbial Ecology in Health and Disease* 1999; 10: 129–133
- 23 Livingston, V. *Cancer: a new breakthrough*, Los Angeles: Nash Publishing; 1972. 269pp.
- 24 Mattman, L. H. *Cell wall-deficient forms: Stealth pathogens*. – 2 ed. – CRC, Boca Raton, Fla., 1993.
- 25 Marcowa, N. (2012). *Cell Wall Deficiency in Mycobacteria: Latency and Persistence*: <http://www.intechopen.com>.
- 26 Marcowa, N., Michailova, L., Kussovski, V., [et al.]. Formation cell wall deficient forms of *M.bovis* BCG during interaction with peritoneal macrophages in guinea pigs. *Electr. // J. of Biol.*, 2008. – V.4. – №.1. – pp. 1–10.
- 27 Miller, F. R. The induced development of non-acid forms of bacillus tuberculosis and other mycobacteria.//*J. Exp. Med.*, 1932, V.56, 3, P. 411–424.
- 28 Nalbandian, A, Yan, B.S., Pichugin, A. [et al.]. Lung carcinogenesis induced by chronic tuberculosis infection: the experimental model and genetic control // *Oncogen*, 2009 28(17): 1928–38.
- 29 Nyka, W. Studies on the Effect of Starvation on Mycobacteria // *Infectiom and Immunity*, May 1974. – P.843–850.