

УДК 619:616.98:579

ДЕТЕКЦІЯ ДИСОЦІАТИВНИХ ВАРІАНТІВ *Mycobacterium bovis* ШВИДКОРОСЛОГО ШТАМУ В РІЗНОМУ МАТЕРІАЛІ ЗА ДОПОМОГОЮ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ**ТКАЧЕНКО О. А.**, д. вет. н., професор
ГЛЕБЕНЮК В. В., к. вет. н., доцент
ГЛЕБЕНЮК О. Г., лікар вет. медициниДніпропетровський державний аграрно-економічний університет, м. Дніпропетровськ
tkachenko.o.a@dsau.dp.ua

Наведено результати визначення ефективності полімеразної ланцюгової реакції при детекції дисоціативних варіантів *M. bovis* швидкорослого штаму.

У результаті мікроскопічних досліджень встановлено, що дисоціативні варіанти мікобактерій представлені некислотостійкими поліморфними кокоподібними і паличкоподібними мікроорганізмами.

Дисоціативні варіанти мікобактерій не викликали загибелі та розвитку інфекційного процесу, типового для туберкульозу, у лабораторних тварин. Установлено відсутність характерних для туберкульозу макроскопічних змін.

Генно-молекулярними дослідженнями не виявлено ДНК-мішені у дисоціативних варіантів *M. bovis* швидкорослого штаму.

Ключові слова: мікобактерії, збудник туберкульозу, морфологія, швидкорослий штам, дисоціативні варіанти, ДНК, полімеразна ланцюгова реакція, детекція.

Постановка проблеми. Лабораторна діагностика відіграє важливу роль у комплексі заходів, які спрямовані на профілактику та боротьбу з туберкульозом тварин [1, 3].

Серед сучасних молекулярно-генетичних технологій полімеразна ланцюгова реакція займає особливе місце. Цей метод дозволяє провести виявлення патогена у біологічному матеріалі від інфікованих та хворих тварин [2, 4, 5].

Найбільш поширена форма мінливості мікобактерій туберкульозу – дисоціація, тобто виникнення в популяції мікроорганізмів особин, які відрізняються від вихідного типу (виду) зовнішнім виглядом і структурою колоній, а також спадково закріпленими змінами деяких морфологічних ознак та біохімічних і фізіологічних властивостей, зі збереженням головних таксономічних ознак конкретного виду. Дисоціація мікобактерій супроводжується генетичними змінами [9].

Останнім часом у науковій літературі з'являються повідомлення вчених, де висвітлюється проблема змінених форм мікобактерій із різними біологічними властивостями, біологічного циклу розвитку збудника туберкульозу тощо [1, 6].

Багаторічні дослідження морфології, культуральних, патогенних та сенсibiliзуювальних властивостей дисоціативних форм *M. bovis*

вказують на суттєві їх зміни. Тривале пасажування збудника туберкульозу через живильне середовище призводить до втрати вірулентності, кислотостійкості, зміни метаболізму, ферментативної активності, набуття здатності до пігментоутворення, росту за 3 °С, на м'ясопептонному агарі і бульйоні та ін. [3, 7, 8]. Тому визначення ефективності полімеразної ланцюгової реакції за детекції змінених, у тому числі дисоціативних, мікобактерій лишається актуальним.

Мета роботи: детектувати дисоціативні варіанти *M. bovis* швидкорослого штаму в різному матеріалі за допомогою полімеразної ланцюгової реакції.

Матеріали і методи досліджень. Матеріалом для досліджень були дисоціативні (240А, 240Б, 240В, 240/118) та вихідні варіанти *M. bovis* швидкорослого штаму.

Детекцію *M. bovis* швидкорослого штаму за допомогою полімеразної ланцюгової реакції проводили з культур та зразків біоматеріалу, відібраних від заражених морських свинок.

Морфологію та тинкторіальні властивості мікобактерій вивчали після виготовлення мазків із колоній і фарбуванням їх за методом Ціля-Нільсена [3].

Для проведення детекції ДНК з колоній мікобактерій попередньо накопичували біомасу

Таблиця 1. Програма ампліфікації ДНК мікобактерій

Номер циклу	Кількість повторів	Час	Температура, °С
1	1	1 хв	80
		1 хв 30 сек	94
2	5	30 сек	94
		45 сек	64
3	45	10 сек	94
		45 сек	64

культури на живильному середовищі з рН 7,0–7,2 за 3 (дисоціативні варіанти) та 37 °С (вихідний варіант та музейні штами) впродовж 30 діб із часу появи росту і готували завис мікобактерій у концентрації 1 мг/см³.

Індикацію мікобактерій зі зразків біологічного матеріалу (селезінки, легень, печінки, лімфатичних вузлів) проводили після проведення біологічної проби. Зависсю досліджуваних мікобактерій у концентрація 1 мг/см³ заражали морських свинок підшкірно в ділянці паху. За тваринами спостерігали впродовж 90 діб. Якщо за період спостереження морські свинки не гинули, то проводили евтаназію, відбирали біоматеріал і досліджували за допомогою ПЛР.

Для проведення ПЛР використовували ампліфікатор іCycler іQ5 (виробник Bio-Rad, США) і комплекти реагентів для підготовки матеріалу до виділення ДНК та ПЛР-ампліфікації ДНК (*M. tuberculosis*-*M. bovis complex*, у тому числі штаму *BCG*) з детекцією в режимі реального часу («МИКО-ГЕН», виробник НУО ДНК-технологія, Російська Федерація). Режим ампліфікації наведено у табл. 1.

Результати досліджень та їх обговорення. У результаті досліджень було встановлено, що за мікроскопії мазків, зафарбованих методом Ціля-Нільсена, виготовлених із колоній вихідного варіанту *M. bovis* швидкорослого штаму, у полі зору мікроскопу виявлялися кислото-стійкі короткі палички. Дисоціативні варіанти мікобактерій були представлені невисокотійкими поліморфними кокоподібними та паличкоподібними мікроорганізмами.

За результатами ампліфікації ДНК дисоціативних варіантів, на відміну від вихідної культури, *M. bovis* швидкорослого штаму не вдалося детектувати. (табл. 2).

Дисоціативні варіанти мікобактерій не викликали загибелі та розвитку інфекційного процесу, типового для туберкульозу, у лабораторних тварин. На розтині морських свинок характерних макроскопічних змін (туберкульозних вузликів) не спостерігалось. Як видно з табл. 2, ДНК дисоціативних варіантів, на відміну від вихідної культури, *M. bovis* швидкорослого штаму не вдалося детектувати.

Вихідна культура мікобактерії спричиняла гибель морських свинок на 60–70 добу, а на

Таблиця 2. Результати ампліфікації ДНК мікобактерій з культур

Варіант мікобактерій	Результат детекції продуктів ампліфікації
вихідний	+
дисоціативний 240А	–
дисоціативний 240Б	–
дисоціативний 240В	–
дисоціативний 240/118	–

розтині лабораторних тварин були знайдені макроскопічні зміни.

Генно-молекулярними дослідженнями виявлено ДНК-мішені тільки у зразках біоматеріалу від морських свинок, заражених вихідним варіантом *M. bovis* швидкорослого штаму.

Висновок. Дисоціативні варіанти *M. bovis* швидкорослого штаму не детектуються до

комплексу *M. tuberculosis* – *M. bovis* методом полімеразної ланцюгової реакції в режимі реального часу.

Перспективи подальших досліджень полягають у розробці засобів для молекулярно-генетичної індикації дисоціативних мікобактерій.

ЛІТЕРАТУРА

1. Заболотня В. П. Експериментальний туберкульоз у телят / В. П. Заболотня, А. Ф. Руденко, О. І. Сосницький // Аграрний вісник Причорномор'я. – 2003. – Вип. 21. – С. 140–145.
2. Кокарев А. В. Застосування молекулярно-генетичного методу для діагностики епідемічної діареї свиней / А. В. Кокарев, Д. М. Масюк, С. А. Шаталов // Матеріали дванадцятого міжнародного конгресу спеціалістів ветеринарної медицини. – Київ, 9-10 жовтня 2014 р. – С. 48-49.
3. Лабораторна діагностика туберкульозу тварин : практичний посібник / [Ткаченко О.А., Білан М.В., Зажарський В.В., Ковальова Л.О.]. – Дніпропетровськ : Вид-во “Свідлер А.Л.”, 2010. – 208 с.
4. Особенности лабораторной диагностики актинобациллярной плевропневмонии свиней / Д. Н. Масюк, С. Г. Коляда, А. В. Кокарев и др. // Корми і факти. – 2016. – №3 (67). – С. 38–41.
5. Скрыпник А. В. Применение молекулярно-генетических методов для изучения видового соотношения микобактерий, изолированных в Украине от реагирующего на туберкулин КРС / А. В. Скрыпник // Вет. патология. – 2007. – № 4. – С. 111–117.
6. Ткаченко О. Швидкорослі *M. bovis* у проблемі туберкульозу / О. Ткаченко // Ветеринарна медицина України. – 2004. – № 7. – С. 14–17.
7. Ткаченко О. А. Вплив пасажу через морських свинок на біологічну активність та ліпідний склад *M. bovis* швидкорослого штаму / О. А. Ткаченко, М. В. Білан, В. В. Глебенюк // Науковий вісник Львівського НУВМ та БТ ім. С.З. Гжицького. – 2008. – Т. 10, № 2 (37), Ч. 2. – С. 262–267.
8. Ткаченко О. А. Вплив температури культивування на вірулентність мікобактерій / О. А. Ткаченко, В. В. Глебенюк // Вісник Дніпропетр. держ. аграр. ун-ту. – 2008. – № 2. – С. 112–114.
9. Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipids and reacquisition of an invasive phenotype / S.T. Howard, E. Rhoades, J. Recht [et al.] // Microbiology. – 2006. – Vol. 152. – P. 1581–1590.

ДЕТЕКЦИЯ ДИССОЦИАТИВНЫХ ВАРИАНТОВ *MYCOBACTERIUM BOVIS* БЫСТРОРАСТУЩЕГО ШТАММА В РАЗЛИЧНОМ МАТЕРИАЛЕ С ПОМОЩЬЮ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ

Ткаченко А. А., Глебенюк В. В., Глебенюк Е. Г.

Днепропетровский государственный аграрно-экономический университет, г. Днепропетровск

Приведены результаты определения эффективности полимеразной цепной реакции при детекции диссоциативных вариантов *M. bovis* быстрорастущего штамма.

В результате микроскопических исследований установлено, что диссоциативные варианты микобактерий представлены некислоустойчивыми полиморфными коккоподобными и палочковидными микроорганизмами.

Диссоциативные варианты микобактерий не вызвали гибели и развития инфекционного про-

цесса, характерного для туберкулеза, у лабораторных животных. Установлено отсутствие характерных для туберкулеза макроскопических изменений.

Генно-молекулярными исследованиями не выявлено ДНК-мишени у диссоциативных вариантов *M. bovis* быстрорастущего штамма.

Ключевые слова: микобактерии, возбудитель туберкулеза, морфология, быстрорастущий штамм, диссоциативные варианты, ДНК, полимеразная цепная реакция, детекция.

DETECTION DISSOCIATIVE VARIANTS *MYCOBACTERIUM BOVIS* FAST GROWING STRAIN IN A MATERIAL DIFFERENTLY BY POLYMERASE CHAIN REACTION

O. Tkachenko, V. Glebenyuk, O. Glebenyuk

Dnipropetrovsk State Agrarian and Economic University, Dnipropetrovsk

Background. Laboratory diagnosis is important in a complex of measures aimed at preventing and combating tuberculosis animals.

Among modern molecular genetic technologies polymerase chain reaction occupies a special place. This method allows for the detection of pathogens in biological material from infected animals and patients.

*Recently in the literature there are reports scientists, which highlights the problem of modified forms of mycobacteria with different biological properties biological cycle of *Mycobacterium tuberculosis*.*

*Long-term study of morphological, culture and pathogenic properties dissociative variants *M. bovis* a significant change them. Long passage *Mycobacterium tuberculosis* by culture medium led to the loss of virulence, changes in metabolism, enzyme activity etc.*

*Objective. Purpose of this work was to detect *M. bovis* dissociative variants fast-growing strain in a material differently by polymerase chain reaction.*

*Methods. Material for research were dissociative variants *M. bovis* quickly growing strain. Morphology and tinctorial properties mycobacterium studied after making smears from colonies and staining them by y Ziehl-Neelsen method. Used to perform PCR thermocyclers iCycler iQ5 and reagents for PCR amplification DNA (*M. tuberculosis-M. bovis* complex) with detection in real time.*

Results. As a result of microscopic studies found that dissociative variants mycobacterium are polymorphic acid-nonproof coccus and sticks bacteria.

*For microscopic studies of bacterial preparations made from colonies nondissociative variants *M. bovis* observed red thick short rods.*

Dissociative variants mycobacterium not caused death and infection development characteristic of tuberculosis in laboratory animals. Found no specific to tuberculosis of macroscopic changes.

*The results amplification DNA of original culture *M. bovis* strain was detected causative agent tuberculosis. DNA dissociative variants mycobacterium could not be detected.*

*Conclusion. Found genetic changes in the DNA target dissociative variants *M. bovis* quickly growing strain.*

Key words: *mycobacterium, the causative agent tuberculosis, morphology, quickly growing strain, dissociative variants, DNA, polymerase chain reaction, detection.*
