УДК 619:579:577.18

АДАПТАЦІЯ ТА МІНЛИВІСТЬ ВЛАСТИВОСТЕЙ МІКОБАКТЕРІЙ РІЗНИХ ВИДІВ ЗА ВПЛИВУ АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ ПРЕПАРАТІВ

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

Інститут сільськогосподарської мікробіології УААН,
вул. Шевченка, 97, м. Чернігів, 14027, Україна
E-mail: biopreparat@mail.ru

В експерименті in vitro вивчено адаптивні властивості мікобактерій Mycobacterium bovis штамів Valle і 8, M. tuberculosis Dt/st, M. avium 2282 і M. fortuitum ДМС за впливу антибактеріальних препаратів (АБП) з різним механізмом біологічної дії. Встановлено, що досліджувані види мікобактерій поступово адаптуються і набувають стабільної стійкості до АБП в різні строки. Найвищий ступінь пластичності адаптивних властивостей in vitro виявили M. avium і M. fortuitum, найнижчий – M. bovis. Формування резистентності у досліджуваних штамів мікобактерій супроводжується мінливістю деяких диференційних ознак порівняно з вихідними культурами.

Ключові слова: *мікобактерії, медикаментозна стійкість, антибактеріальні препарати, адаптивні властивості.*

В останні роки вченими і практиками гуманної медицини гостро підіймається питання щодо реальної небезпеки, пов'язаної з поширенням стійких до антибактеріальних препаратів (АБП) мікобактерій серед населення України [1-3]. Автори пов'язують медикаментозну стійкість до АБП збудника туберкульозу людини зі зміною його культурально-морфологічних, біохімічних, структурних і генетичних властивостей. Окремі і часто протилежні думки висловлено вченими стосовно збереження вірулентності мікобактеріями за набуття стійкості до певних АБП [3, 6].

У науковій літературі також повідомляється про виділення резистентних до АБП мікобактерій туберкульозу з організму сільськогосподарських тварин [4, 5, 7]. Дані стосовно властивостей збудників туберкульозу великої рогатої худоби *Mycobacterium bovis* і птахів *Mycobacterium avium* за впливу лікарських засобів відсутні.

Разом з тим звертає на себе увагу той факт, що з кожним роком зростає частка виділених від тварин, особливо від ВРХ, так званих атипових мікобактерій, яка на сьогодні складає понад 70 % [8-10].

Не виключено, що серед таких мікобактерій можуть бути і збудники туберкульозу різних видів зі зміненими фенотиповими властивостями, які могли мігрувати до тварин від людей, та з набутою стійкістю до хімічних речовин (антибіотиків чи дезінфікуючих засобів), які широко застосовуються у тваринництві [11].

З огляду на вищезазначене, набуття мікобактеріями резистентності до АБП ставить низку питань, які потребують з'ясування як в теоретичному, так і практичному аспекті, головним серед яких є: чи позначається і, якщо так, то, яким чином, розвиток стійкості до певних медикаментозних засобів на прояв ними диференційних ознак, в т.ч. і основної патогенності для лабораторних тварин.

Мета нашої роботи – вивчити в експериментальних умовах *in vitro* ймовірну амплітуду диференційних ознак мікобактерій різних видів за їх адаптації до АБП з різним механізмом біологічної дії.

Матеріали і методи. Об'єктами досліджень при вивченні впливу АБП на фенотипові властивості мікобактерій були чотири види: *M. bovis,* штами Valle і 8, *M. tuberculosis,* штам Dt/st, *M. avium,* штам 2282 і *M. fortuitum,* штам ДМС, які зберігаються в колекції лабораторії мікробіології тварин Інституту сільськогосподарської мікробіології УААН. Всі штами мікобактерій мікробіологічно чисті, типові за культурально-морфологічними, біохімічними і патогенними ознаками відповідно з паспортними характеристиками.

У роботі використано три АБП: стрептоміцин, канаміцин та етамбутол, різні за механізмом біологічної дії (перші два з них – інгібітори білкового синтезу, третій – інгібітор білкового і нуклеїнового синтезу та ліпідного метаболізму бактерій). В умовах експерименту *in vitro* проведено сім послідовних пасажів досліджуваних штамів бактерій на живильному середовищі Левенштейна-Йєнсена з вмістом кожного антибактеріального препарату.

У адаптованих *in vitro* до певних АБП культур мікобактерій досліджували основні властивості порівняно з вихідними (материнськими) культурами, а саме: культурально-морфологічні (швидкість росту, пігментоутворення, суспендованість, ріст при

різних температурах), біохімічні (толерантність до саліцилату натрію, активність ферментів уреази, нітратредуктази, каталази, її термостійкість, гідроліз твіну-80), патогенні (за результатами тестування на морських свинках за однакової дози 1 мг/см^3, підшкірному способові та одноразовому введенні).

Результати та їх обговорення. Отримані дані показали, що досліджувані штами мікобактерій адаптувалися до певних АБП у різні строки. Так, з поміж збудників туберкульозу ссавців штам *M. tuberculosis* Dt/st виявився найменш консервативним: він набув стабільної стійкості до стрептоміцину у третьому, етамбутолу – у четвертому, а до канаміцину – у п'ятому пасажах (табл. 1).

Досліджувані штами Valle і 8 збудника туберкульозу великої рогатої худоби показали себе більш консервативними, ніж збудник туберкульозу людини. Так, штам *M. bovis* Valle набув стабільну резистентність до канаміцину та етамбутолу у 5-ому, а до стрептоміцину – у 6-ому пасажах, а штам *M. bovis* 8 – лише до етамбутолу у 4-ому пасажі. Виявлена ним у 5-ому пасажі стійкість до стрептоміцину і канаміцину була нестабільною.

Таблиця 1. ***Динаміка адаптації досліджуваних штамів мікобактерій туберкульозу ссавців до АБП in vitro***

Рід, вид, штам мікобактерій	Первинна чутливість МБ до АБП	Чутливість мікобактерій до АБП у пасажах						
		I	II	III	IV	V	VI	VII
До стрептоміцину								
M. bovis, штам Valle	S	S	S	S	S	S	R	R
M. bovis, штам 8	S	S	S	S	S	R	S	S
M. tuberculosis, штам Dt/st	S	S	S	R	R	R	R	R
До канаміцину								
M. bovis, штам Valle	S	S	S	S	S	R	R	R
M. bovis, штам 8	S	S	S	S	S	R	RS	R
M. tuberculosis, штам Dt/st	S	S	S	S	S	R	R	R
До етамбутолу								
M. bovis, штам Valle	S	S	S	S	S	R	R	R
M. bovis, штам 8	S	S	S	S	R	R	R	R
M. tuberculosis, штам Dt/st	S	S	S	S	R	R	R	R

Примітка: тут і в інших таблицях S – культура мікобактерій чутлива до АБП, R – культура мікобактерій резистентна до АБП.

Порівняно зі збудниками туберкульозу ссавців, у значно коротші строки до АБП адаптувалися штами збудника туберкульозу птахів (*M. avium* 2282) та представника IV-ої групи атипових мікобактерій за класифікацією Раньйона (*M. fortuitum* ДМС) (табл. 2).

Таблиця 2. ***Динаміка адаптації до АБП in vitro штамів атипових мікобактерій III і IV груп за класифікацією Раньйона***

Рід, вид, штам мікобактерій	Первинна чутливість МБ до АБП	Чутливість мікобактерій до АБП у пасажах						
		I	II	III	IV	V	VI	VII
До стрептоміцину								
M. avium штам 2282	S	S	R	R	R	R	R	R
M. fortuitum штам ДМС	S	S	R	R	R	R	R	R
До канаміцину								
M. avium штам 2282	S	S	RS	R	R	R	R	R
M. fortuitum штам ДМС	S	S	R	R	R	R	R	R
До етамбутолу								
M. avium штам 2282	S	S	RS	R	R	R	R	R
M. fortuitum штам ДМС	S	S	S	R	R	R	R	R

Разом з тим, слід відмітити, що набута резистентність мікобактерій туберкульозу птахів до канаміцину у 3-ому пасажі мала стійкий характер упродовж наступних чотирьох пасажів на живильному середовищі Левенштейна-Йєнсена з концентрацією препарату вищою у 4 рази ніж та, яка слугує критерієм оцінки медикаментозної стійкості мікобактерій.

Отже, збудники туберкульозу ссавців повільніше адаптуються до антибактеріальних препаратів, що, на нашу думку, пов'язано зі сповільненим їх розмноженням і нижчою природною активністю ензимної системи, а звідси – і нижчим ступенем прояву адаптаційних можливостей порівняно зі збудником туберкульозу птахів та атиповими мікобактеріями IV-ої групи (швидкорослими) за класифікацією Раньйона.

Результати проведених досліджень показали, що адаптовані до АБП в умовах експерименту *in vitro* штами мікобактерій змінили деякі фенотипові властивості. Важливо відмітити, що штами мікобактерій Valle і Dt/st, адаптовані до стрептоміцину,

виявили ріст при 22 °С і 45 °С та на середовищі Левенштейна-Йєнсена з саліцилатом натрію в концентрації 0,5 і 1,0 мг/см^3, що не є характерним для збудників туберкульозу ссавців, і дає підстави віднести їх за цими показниками до атипових мікобактерій (табл. 3). Каталаза штаму Valle збудника туберкульозу великої рогатої худоби, адаптованого до цього препарату, виявила термостабільність при 68 °С, що також не є властивим для вихідної культури.

Таблиця 3. ***Диференційні ознаки штамів мікобактерій туберкульозу ссавців до і після адаптації до стрептоміцину***

Досліджувана культура мікобактерій	Властивості мікобактерій						
	ріст на середовищі з саліцилатом натрію		ріст при температурі			активність каталази	термостабільність каталази
	0,5 мг/см^3	1,0 мг/см^3	22 °С	37 °С	45 °С		
M. bovis штам Valle (вихідна)	–	–	–	+	–	++	–
M. bovis штам Valle (адаптована до стрептоміцину)	+	+	+	+	+	++	+
M. tuberculosis штам Dt/st (вихідна)	–	–	–	+	–	++	–
M. tuberculosis штам Dt/st (адаптована до стрептоміцину)	+	+	+	+	+	++	–

Як відомо, «золотим стандартом» у діагностиці і диференційній діагностиці туберкульозу є біологічні проба на лабораторних тваринах. Тому наступним етапом наших досліджень було вивчення патогенності адаптованих *in vitro* до АБП збудників туберкульозу у досліді на морських свинках. Отримані результати показали, що за однакових дози і способу введення тваринам мікобактерії з набутою медикаментозною стійкістю, на відміну від вихідних культур, характеризувалися вищим ступенем патогенності. Так, адаптовані до стрептоміцину штами *Mycobacterium bovis* Valle та *Mycobacterium tuberculosis* Dt/st викликали загибель заражених ними тварин на 21 та 34 добу, відповідно, а морські свинки, інфіковані вихідними культурами мікобактерій цих видів, залишалися живими упродовж 3-х місяців.

Таким чином, отримані експериментальні дані показали, що надзвичайна пластичність адаптаційних можливостей основних трьох видів збудника туберкульозу (*Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis* і *Mycobacterium avium*) та умовно-патогенних (*Mycobacterium fortuitum*) бактерій за широкого використання у тваринництві АБП з різним механізмом біологічної дії може бути причиною формування й розповсюдження резистентних до АБП популяцій мікобактерій різних видів зі зміненими диференційними ознаками, що може не лише ускладнити бактеріологічну діагностику туберкульозу сільськогосподарських тварин, але й створювати не піддатливі відповідному епізоотологічному контролю приховані вогнища інфекції.

1. Корабль В.Н. Эпидемиологическое значение микобактерий туберкулеза с первичной лекарственной устойчивостью /Корабль В.Н., Карпенко О.Л., Калиниченко С.Ю. //Проблемы туберкулеза. – 1995. – № 4. – С. 6-9.

2. Черногорский И.П. Характеристика бактериовыделения у больных туберкулезом жителей Якутии /Черногорский И.П., Алексеева Г.И., Захаров В.Г. //Проблемы туберкулеза. – 1992. – № 3-4. – С. 49-51.

3. Рудой Н.М. Лекарственная устойчивость микобактерий туберкулеза и ее значение в практике диспансерной работы /Рудой Н.М. //Проблемы туберкулеза. – 1996. – № 3. – С. 6-8.

4. Стегній Б. Екологічні наслідки широкого застосування антибіотиків у тваринництві /Стегній Б., Красніков Г., Маценко О., Вербицький П. //Ветеринарна медицина України. – 2002. – № 6. – С. 30-31.

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

6. Голышевская В.Н. Биологические свойства микобактерий туберкулеза в зависимости от чувствительности к антибактериальным препаратам /Голышевская В.Н., Гришина Т.А., Карпенко О.Л. и др. //Проблемы туберкулеза. – 1995. – № 4. –С. 37-40.

7. Бриан Л.Е. Бактериологическая резистентность и чувствительность к химиопрепаратам /Л.Е. Бриан. – М.: Мед. – 1984. – 270 с.

8. Гинзбург Т.С. Биологические свойства лекарственно чувствительных микобактерий туберкулеза /Гинзбург Т.С., Клименко М.Т., Сокало С.В. //Проблемы туберкулеза. – 1986. – № 7. – С. 22-25.

9. Домарадский И.В. Вирулентность бактерий как функция адаптпции /Домарадский И.В. //ЖМЭИ. – 1997. – № 4. – С. 16-20.

10. Стегний Б.Т. Дифференциация разных видов микобактерий /Стегний Б.Т., Sashse K, Moser I., Hotsel H. и др. //Ветеринарна медицина. – 2002. – Вип. 84. – С. 647-656.

11. Ільїних В. Резистентність мікобактерій, ізольованих із продукції /Ільїних В., Дяченко Г., Дмитрук О. //Ветеринарна медицина України. – 2006. – № 1. – С. 19-20.

АДАПТАЦИЯ И ИЗМЕНЧИВОСТЬ СВОЙСТВ МИКОБАКТЕРИЙ РАЗНЫХ ВИДОВ ПОД ВЛИЯНИЕМ АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ

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

Институт сельскохозяйственной микробиологии УААН, г Чернигов

Экспериментально изучены адаптивные свойства микобактерий Mycobacterium bovis, штаммов Valle i 8, M. tuberculosis Dt/st, M. avium 2282 i M. fortuitum ДМС под влиянием антибактериольных препаратов (АБП) с разным механизмом биологического действия. Установлено, что исследуемые виды микобактерий постепенно адаптируются и преобретают стабильную устойчивость к АБП в разные сроки. Найбольшую степень пластичности адаптивных свойств in vitro выявили M. avium и M. fortuitum, наименшую – M. bovis. Формирование резистентности у исследуемых штаммов микобактерий сопровождается изменчивостью некоторых диференциольных признаковв при сравнении их с исходными культурами.

Ключевые слова: *микобактерии, медикаментозная стойкость, антибактериальные препараты, адаптационные свойства.*

ADAPTIVITY AND PROPERTIES CHANGEBILITY OF DIFFERENT TYPES OF MYCOBACTERIA UNDER THE INFLUENCE OF ANTIBACTERIAL PREPARATIONS

Dyachenko G.M., Kravchenko N.O., Il`inyh V.V., Dmytruk O.M., Golovach O.V.

Institute of Agricultural Microbiology UAAS, Chernihiv

The adaptive properties of Mycobacterium bovis str Vallee and 8; M. tuberculosis, str. Dt/st, M. avium str. 2282 and M. fortuitum str. DMS were studied in vitro as influenced by the antibacterial preparations (ABP) with the different mechanism of biological action. It was established that studied types of mycobacteria gradually adapt and acquire stable resistance to ABP in different terms. The greatest plasticity degree of adaptive properties was revealed in vitro by M. avium and M. fortuitum, the lowest – M. bovis. Resistance formation by the studied mycobacteria cultures is accompanied by the changeability of some differential properties as compared to the initial cultures.

Key words: *mycobacteria, antibacterial preparations, stable resistance to ABP, adaptive properties.*