

SPECIES OF ATYPICAL MYCOBACTERIA ISOLATED FROM CATTLE AND POULTRY

Zavgorodniy A. I., Stegnyy B. T., Kalashnyk M. V., Bilushko V. V.,
Kalashnyk N. V., Goncharova N. V., Pozmogova S. A.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

The aim was to determine causes of allergic reactions to tuberculin (PPD) for mammals in cattle on 6 farms free from tuberculosis and to investigate samples of biological material from cattle and zoo birds. To study affiliation of species of mycobacteria cultures isolated from biomaterial

Material and methods. Epizootological, allergical, anatomopathological, bacteriological research methods were used while conducting research. Preliminary treatment of biological material was performed with the use of 1.0 % nitric acid solution and the method of A. P. Alikaeva.

Results. It was allocated 183 of reacting to tuberculin (PPD) and AAM animals during the simultaneous-allergic study of 5135 cattle on 6 farms. Changes characteristic for tuberculosis have not been identified. Acid-fast bacilli are not identified during microscopic examination of smears.

Forty-four samples of biological material from cattle and 5 samples from zoo hens were studied by culture method. In total 23 mycobacteria culture were isolated. Isolated cultures were classified as atypical mycobacteria of 9 species on basing on the study of the tinctorial, cultural-morphological, biochemical properties. There were *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. phlei*, *M. vaccae*, *M. flavescens*, *M. diernhoferi*, *M. avium*.

Isolated cultures caused increased sensitivity to tuberculin (PPD) and AAM in guinea pigs, but changes characteristic of tuberculosis were not detected while anatomopathological examination.

Conclusions. 1. Eight atypical mycobacteria species initiated the reactions on tuberculin for mammals in cattle in the studied farms. There are *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. phlei*, *M. vaccae*, *M. flavescens*, *M. diernhoferi*.

2. Atypical mycobacteria of the studied species did not cause characteristic for tuberculosis pathological changes in guinea pigs at unitary and double subcutaneous injection but conditioned a sensibilization for mammal's tuberculin and AAM.

3. The method of preliminary treatment with the use of 1.0 % nitric acid solution allows the allocating mycobacterial isolates from the biological material on 2–7 days earlier in comparison with the method of A. P. Alikaeva.

Keywords: Simultaneous test, sensibilization, cattle, biomaterial, cultural study, atypical mycobacteria

УДК 619:616-07:[57.083.32+577.2.08]:579.873.21:636.2

ВИВЧЕННЯ КУЛЬТУРАЛЬНИХ ТА ІМУНОБІОЛОГІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ,
ІЗОЛЬОВАНИХ *IN VIVO* L-ФОРМ *M. AVIUM* SUBSP. *PARATUBERCULOSIS*

Завгородній А. І., Позмогова С. А., Гончарова Н. В., Калашник М. В., Білушко В. В.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини»,
м. Харків, Україна, e-mail: svetlanapozmogova@gmail.com

У статті представлені результати вивчення культуральних, тінкторіальних, імунобіологічних властивостей ізольованих L-форм *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) від реагуючої на туберкулін худоби. Встановлено, що *in vivo* ізольовані CWD-форми MAP у першому пасажі мають вигляд не кислотостійких плеоморфних структур. Реверсія у бактеріальну форму відбувається при багаторазових послідовних «сліпих» пасажах на спеціальних елективних середовищах. Деякі популяції CWD-форм є стабільними і втрачають здатність до реверсії та реплікації *in vitro*. Стабільні CWD-форми MAP представлені скупченнями кислотостійких гранульованих і кокоподібних форм, великими сферичними тілами, аморфною масою з різним ступенем кислотостійкості. Стабільні CWD-форми MAP не проявляють імунобіологічну активність *in vivo*.

Ключові слова: паратуберкульоз, реверсія, стабільні CWD-форми, імунобіологічні властивості CWD-форм

Діагностика паратуберкульозу досить складна, оскільки в більшості випадків це захворювання протікає приховано, у субклінічній формі. Численні дослідження свідчать, що причиною прихованої, хронічної та рецидивуючої/ремісуючої інфекції тварин (паратуберкульоз, туберкульоз) і людини (туберкульоз, саркоїдоз і хвороба Крона) є CWD-форми (від англ. «Cell wall deficient / defective» – бактерії з відсутньою/дефектною клітинною стінкою) або L-форми [1-14]. Можливості виявлення CWD-форм *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) з біологічного матеріалу за допомогою мікроскопії, культивування,

методами гібридизації ДНК та інших методів вельми обмежені. Змінена морфологія мікобактерій і зниження метаболізму припускають і особливі вимоги до умов культивування CWD-форм, оскільки вони або взагалі не ростуть на звичайних живильних середовищах, або ростуть лише окремі культури. Пошкодження, пов'язані з дефектом клітинної стінки, зазвичай призводять до значних морфологічних і функціональних змін, що проявляються в появі протопластів, сферопластів, форм гетероморфного росту та стабільних або нестабільних L-форм бактерій. У складі L-колоній є різноманітні за формою, консистенції та розмірами мікроструктури: сферичні тіла, елементарні тільця або гранули, покручені та ниткоподібні структури. За даними багатьох досліджень варіабельність морфологічної структури, характер росту на живильних середовищах, здатність сприймати забарвлення, особливості розмноження, біохімізм обміну речовин, антигенна структура та патогенність, схильність до стабілізації та реверсії, складають основу існування всіх бактерій [16–21].

Питання про L-форми та їх значення в інфекційній патології та імунології останнім часом привертає велику увагу. CWD-форми повільно реплікують протягом тривалого періоду, підтримуючи інфекцію на субклінічному або хронічному рівні, тому, на думку ряду авторів, є клінічно значущими. Однак, на сьогодні немає однозначної відповіді чи є CWD-форми патологічною формою самі по собі, або для того, щоб викликати хворобу, змінені бактерії повинні конвертувати у вегетативну фазу [1–9, 15, 17–19].

Змінені форми *M. tuberculosis* бактерій, що мають дефекти клітинної стінки, заслуговують на особливу увагу, оскільки знання про них є актуальними не тільки в теоретичному відношенні, але і для вирішення ряду практичних завдань, зокрема, прогнозування розвитку та активації хвороби і удосконалення бактеріологічної діагностики латентної стадії паратуберкульозу.

Метою досліджень були ізоляція та ідентифікація L-форм від реагуючої на туберкулін худоби та вивчення їх бактеріологічних та імунобіологічних властивостей на біологічній моделі.

Матеріали та методи. Було досліджено 24 проби біологічного матеріалу від реагуючої на туберкулін для ссавців ВРХ з 6 областей України. Передпосівну обробку зразків біологічного матеріалу проводили за методом Алікаєвої та висівали на елективне середовище з додаванням фактору росту (екстракту *M. scrofulaceum*) та на «Сухе живильне середовище для культивування мікобактерій» без фактору росту. Здатність до реверсії L-форм у бактеріальні форми вивчали шляхом 6 послідовних пасажів з 1-2-місячним інтервалом з мікроскопією змивів перед кожним пасажем.

Тинкторіальні властивості та морфологію клітин змінених форм вивчали у мазках, пофарбованих за методом Циль-Нільсена.

Ідентифікацію ізольованих CWD-форм мікроорганізмів проводили за допомогою молекулярно-генетичних досліджень (ПЛР). Ізоляцію сумарної ДНК здійснювали за допомогою комерційного набору для екстракції нуклеїнових кислот «ДНК-сорб-В» виробництва «Центрального науково-дослідного інституту епідеміології» (Російська Федерація) згідно листівки-вкладки.

З метою визначення імунобіологічної активності «некультурабельних»

L-форм *M. tuberculosis* було сформовано дві групи морських свинок і кроликів, які були інфіковані зависсю ізольованих *in vivo* L-форм *M. tuberculosis* з 2-х різних господарств. До третьої групи (контроль) входили кролики, які були інфіковані суспензією бактеріальної форми референтного штаму збудника паратуберкульозу на фізіологічному розчині. Для визначення сенсibiliзуючих властивостей L-форм *M. tuberculosis* через кожні 30 діб усіх тварин досліджували алергічним методом за допомогою туберкулінів (ППД) для птиці і ссавців, а також йоніну, виготовленого з референтного штаму *M. tuberculosis* згідно методики виготовлення туберкулінів. Через 3 місяці після зараження у кроликів відбирали кров, а самих тварин досліджували на наявність патологічних уражень.

Антигенні властивості L-форм *M. tuberculosis* вивчали в серологічних реакціях (РІД, РА, РЗК) з сироватками крові від кроликів. Для цього були виготовлені «Антиген для діагностики паратуберкульозу в реакції зв'язування комплекменту» і протоплазматичний антиген (для РІД і РА) із зруйнованої ультразвуком бактеріальної маси *M. tuberculosis*.

Результати досліджень. За результатами бактеріоскопічного дослідження мазків-відбитків із 24 досліджуваних проб тільки від двох корів при мікроскопії заглотового та бронхіального лімфатичних вузлів були виявлені скупчення дрібних кислотостійких паличок (КСП) і коків (КСК). При огляді ці лімфатичні вузли були дряблї консистенції, при натисканні виділявся каламутний серозний ексудат, лімфоїдні фолікули мали чітко виражені межі, у середині фолікулів виявляли сірувато-білий гнійний вміст. В інших пробах результати мікроскопії мазків-відбитків із лімфовузлів були негативні.

При культивуванні зразків біологічного матеріалу на елективному середовищі з додаванням фактору росту (екстракту *M. scrofulaceum*) і «Сухому живильному середовищі для культивування мікобактерій» без фактору росту протягом 3-х місяців, у 4-х пробах були ізольовані атипові мікобактерії II і III групи за класифікацією Раньона, в інших 20 пробах видимого росту колоній не було виявлено. Однак після закінчення терміну культивування при мікроскопії зіскобів із поверхні середовища у мазках, пофарбованих за методом Циль-Нільсена, спостерігали безформну, безструктурну аморфну масу, від майже безбарвної до інтенсивно забарвленої в рожевий або синій колір. У результаті послідовних пасажів встановлено, що не всі штами *M. tuberculosis* здатні до культивування та реверсії *in vitro*. Так, тільки з 6 дослідних проб біоматеріалу на момент 5-6-го пасажу вдалось отримати незначний ріст колоній у вигляді нальоту кремового кольору з окремими прозорими, сферичними дуже дрібними колоніями. При мікроскопії цих проб виявляли велику кількість скупчень дрібних КСП і КСК. В інших 14 пробах після 6 пасажів формування кислотостійких паличок не відмічали, а при мікроскопії спостерігали скупчення гранульованих і кокоподібних форм, великі сферичні тіла, аморфну масу з різним ступенем кислотостійкості, тобто ці стабільні L-форми втрачали здатність до реверсії. У L-форм, які були здатні до реверсії, у процесі «сліпого» пасажування зіскобів і змивів з поверхні живильного середовища спостерігали формування класичних бактеріальних форм шляхом закономірної зміни одних елементів іншими: у першому та другому пасажах відзначали безформні аморфні структури від майже безбарвних до інтенсивно забарвлених (рис. 1). При подальших пасажах з безструктурної маси формувались однорідні великі рожеві кулясті елементи (рис. 3) і дрібні тільця (гранули) (рис. 2). Великі сферичні тіла та аморфна маса з різним ступенем кислотостійкості були представлені, головним чином, на початкових етапах формування бактеріальних форм, при наступних

пасажах вони поступово зникали або змінювались, поступаючи місцем більш кислотостійким сферичним гранульованим (зернистим) формам. Так, у третьому-четвертому пасажах з пустих або однорідних кулястих форм формувались рожеві сфероїди, всередині яких відзначали появу дрібних фуксінових гранул (зерен), гранули і зерна були присутні і поза сфероїдів (рис. 2, 4, 5). Через (5-6) пасажів сфероїди втрачали круглу форму, збільшувались в розмірі і розпадались на велику кількість КСК і дуже дрібні КСП (рис. 5, 6).

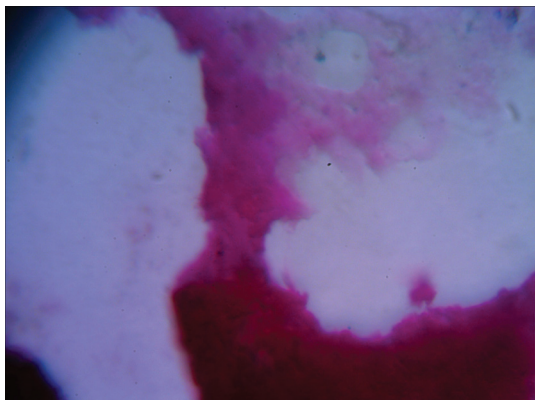


Рис. 1. Аморфна безструктурна маса *L*-форм після першого пасажу

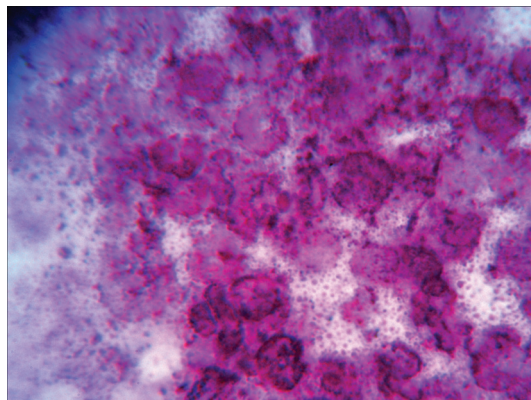


Рис. 2. Формування з аморфної маси сфероїдів і поява гранул

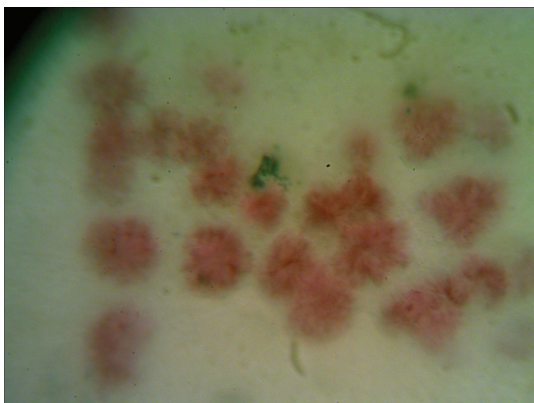


Рис. 3. Однорідні великі кулясті форми

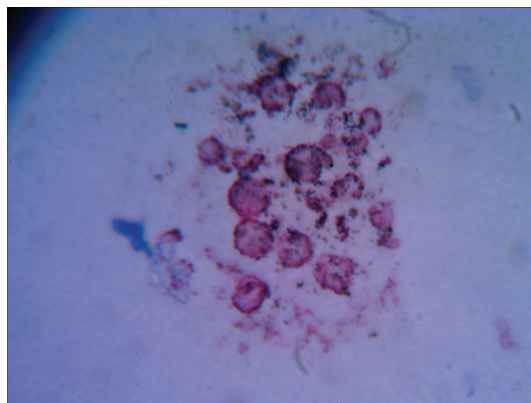


Рис. 4. Формування гранул всередині і поза сфероїдів

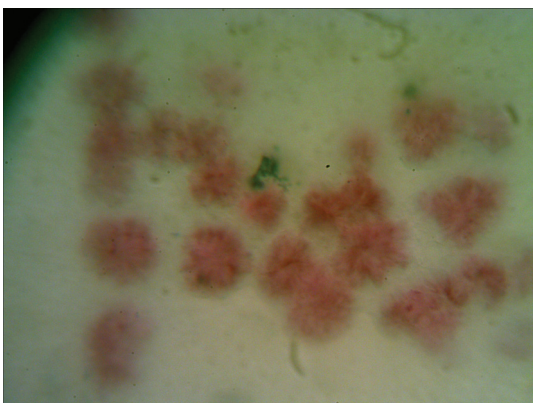


Рис. 5. Сфероїд з КСК і КСП в середині

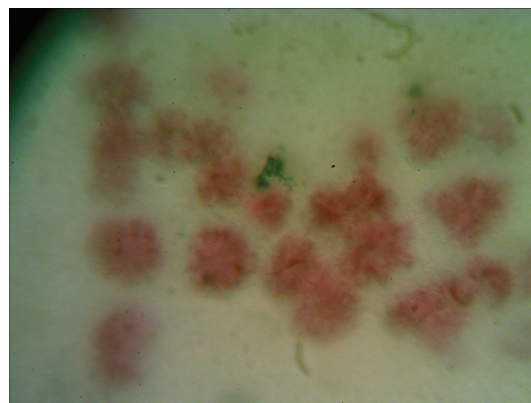


Рис. 6. Сфероїди і велика кількість КСК і КСП поза сфероїдів

Видова належність стабільних *L*-форм і ревертантів була підтверджена у ПЛР: з 20 досліджуваних проб біологічного матеріалу від реагуючої на туберкулін ВРХ у 18 пробах були ідентифіковані *MAP* (14 стабільних *L*-форм і 4 ревертанти) і у 2 пробах — *M. avium* subspecies *homenisuis* (ревертанти).

Другим етапом досліджень було вивчення імунобіологічних властивостей стабільних *L*-форм *MAP* на лабораторних тваринах. Результати цих досліджень представлені в таблиці 1.

Таблиця 1 – Результати вивчення імунобіологічних властивостей *MAP*

Групи тварин	Тварини	Алергічні дослідження, через діб									Серологічні дослідження			Патологічні зміни
		ППД для ссавців			ППД для птиці			Йонін			РЗК	РІД	РА	
		30	60	90	30	60	90	30	60	90				
I (L-форма)	кролики	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	морські свинки	-	-	-	-	-	-	-	-	-	НП	НП	НП	-
II (L-форма)	кролики	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	морські свинки	-	-	-	-	-	-	-	-	-	НП	НП	НП	-
III (бактеріальна форма)	кролики (контроль)	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+

Примітки: “-” - негативний результат; “+” - позитивний результат; НП — не проводили

За результатами проведених досліджень встановлено, що змінені стабільні форми збудника паратуберкульозу не проявляли імунобіологічну активність, тобто не обумовлювали у морських свинок і кроликів сенсibilізацію до туберкулінів (ППД) для птиці, ссавців та йоніну, не викликали синтез комплементзв'язуючих і аглютинативних антитіл у сироватках крові інфікованих кроликів.

Що стосується контрольної групи кроликів, інфікованих бактеріальною формою референтного штаму збудника паратуберкульозу встановлено, що антигени клітинної стінки *MAP* обумовлюють синтез комплементзв'язуючих, аглютинативних і преципітативних антитіл і сенсibilізують організм тварин до туберкуліну та йоніну. Так, сироватки від кроликів, інфікованих суспензією *MAP*, обумовлювали у РЗК затримку гемолізу еритроцитів з паратуберкульозним антигеном для РЗК, із протоплазмивним антигеном у РІД утворювали (1-2) лінії преципітації, у РА — забезпечували аглютинацію у вигляді дрібних, тонкодисперсних сполук. Алергічні реакції у кроликів виявляли через 30 діб на обидва туберкуліни та йонін, через 2 і 3 місяці – тільки на йонін.

На розтині у кроликів і морських свинок, інфікованих стабільними L-формами *MAP*, патологічних уражень, характерних для паратуберкульозу, у жодному випадку не було виявлено. Що стосується кроликів, інфікованих бактеріальною формою *MAP*, то на розтині виявляли патологічні ураження, що характерні для паратуберкульозу: газоутворення, набряклість і потовщення слизової оболонки кишечника, ділянки з крапковими крововиливами в тонкому відділі кишечника, повздожні та поперечні складки у клубовій кишці. При мікроскопії зіскобів зі слизової оболонки клубової кишки виявляли велику кількість скупчень КСП і КСК.

Отже, за результатами проведених серологічних та алергічних досліджень антигенна, імуногенна і сенсibilізуюча активність, а також патогенні властивості стабільних L-форм *MAP* не виявлені.

Висновки. 1. При латентній формі паратуберкульозу має місце персистенція збудника у виді CWD-форм.

2. Ізольовані *in vivo* CWD-форми *MAP* представлені не кислотостійкими плеоморфними структурами. Для реверсії у бактеріальні форми необхідні багаторазові послідовні «сліпі» пасажі на спеціальних елективних середовищах. Деякі популяції CWD-форм є стабільними і втрачають здатність до реверсії та реплікації *in vitro*.

Стабільні CWD-форми *MAP* не проявляють імунобіологічну активність *in vivo*.

Для ідентифікації виявлених при мікроскопії CWD-форм необхідно проводити молекулярно-генетичні дослідження (ПЛР).

Список літератури

- Domingue G.J., Woody H.B. Bacterial persistence and expression of disease. Clinical Microbiology Reviews. - 1997. - N 10. - P. 320–344.
- Domingue, G. Demystifying pleomorphic forms in persistence and expression of disease. Discovery Medicine — 2010. - Vol.10. - No. 52, (September 2010) - P. 234-246.
- Hulten, K.; El-Zimaity, H.; Karttunen, T.; Almashhrawi, A.; Schwartz, M.; Graham, D.; ElZaatar, F. Detection of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* in Crohn's diseased tissues by in situ hybridization. American Journal of Gastroenterology. - 2001. - Vol. 96. - N 5. - P. 1529–1535.
- El-Zaatar, F.; Naser, S.; Markesich, D.; Kalter, D.; Engstand, L. & Graham, D. Identification of *Mycobacterium avium* complex in sarcoidosis. Journal of Clinical Microbiology. - 1996. - Vol. 34. - N 9. - P. 2240–2245.
- Onwuamaegbu, M.; Belcher, R. & Soare, C. Cell wall-deficient bacteria as a cause of infections: a review of the clinical significance. // Journal of International Medical Research. - 2005. - Vol. 33, N 1. - P. 1- 20.
- Condon RJ, Schroen CJ, Black CA, Ridge SE and Hope AF. 1995. Histological confirmation of subclinical infection with Map in cattle. In: Proceedings of the Fourth International Colloquium on Paratuberculosis; July 17- 21, 1994, (Chiodini RJ, Kreeger JM, eds), International Association for Paratuberculosis Inc., Providence, RI, USA, pp:297-301.

7. Wayne L.G. Dormancy of *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. European. // Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. - 1994. - № 13. - P. 908–914.
8. Ulrichs T., Kaufmann S.H.E. Mycobacterial persistence and immunity. // Frontiers in Bioscience. - 2002. - № 7. - P. 458–469.
9. Bobchenok A.P., Steklova L.N., Vishnevskaya Y.B., Melnikova N.N., Vishnevsky B.I. The detection rate and clinical and diagnostic values of L-forms of the pathogen in patients with pulmonary or extrapulmonary tuberculosis (in Russian). // Problemy Tuberkuleza i Bolezni Legkikh. - 2002. - № 4. - P. 19–21.5. Beran, V.; Havelkova, M.; Kaustova, J.; Dvorska, L. & Pavlik I. Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review. Veterinarni Medicina. - 2006. - Vol. 51. - N 7. - P. 365–389.
10. Zhang Y, Yew WW, Barer MR. Targeting persisters for tuberculosis control. Antimicrob Agents Chemother. - 2012. - N 56. -P. 2223–2230.
11. Lewis K. Persister cells. Annu Rev Microbiol/ - 2010. - N 64. - P. 357–372.
12. Zhang Y. Persistent and dormant tubercle bacilli and latent tuberculosis. Front Biosci. - 2004. - N 9. - P. 1136–1156.
13. Fauvart M, de Groote VN, Michiels J. Role of persister cells in chronic infections: clinical relevance and perspectives on anti-persister therapies. J. Med. Microbiol. - 2011. - N 60. - P. 699–709.
14. Nadya Markova. Cell Wall Deficiency in Mycobacteria: Latency and Persistence, Understanding Tuberculosis - Deciphering the Secret Life of the Bacilli, Dr. Pere-Joan Cardona (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/30919. - 2012.
15. El-Zaatari FAK, Hulten K, HMT El-Zimaity, Collins MT and Graham DY. Pathogenesis of Johne's disease; a possible role of cell-wall deficient forms of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.
16. Allan, E., Hoishen, C. & Gumpert, J. Bacterial L-forms. // Advances in Applied Microbiology. - 2009. - Vol. 68. - P. 1- 39.
17. Michailova, L.; Kussovski, V.; Radoucheva, T.; Jordanova, M.; Berger, W.; Rinder, H. & Markova, N. Morphological variability and cell wall deficiency in *Mycobacterium tuberculosis* 'heteroresistant' strains. // International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases. - 2005. -Vol. 9, No 8. - P. 907-914.
18. Mattman, L.H. Cell wall Deficient Forms. Stealth Pathogens, 3rd ed., CRC Press Inc., Boca Raton., 2001.
19. Прозоровский, С.В., Кац Л.Н., Каран Г.Я. L-формы бактерий //М.: Медицина, 1981. - 239 с.
20. Елисеєва І.В., Бабич Е.М., Волянський Ю.Л., Скляр Н.І., Белозерський В.І. Оролі латентних, трудно культивуємих і некультивуємих персистентних бактерій в патології людини //Анали Мечниковського Інституту. - 2006. - № 1. - P. 12-46.
21. Shleeve, M.; Salina, E. & Kaprelyants, A. Dormant of Mycobacteria. // Mikrobiologiya. - 2010. - Vol. 79, No. 1. - P. 3–15.
22. Udou T.; Ogawa M. & Mizuguchi, Y. Spheroplast formation of *Mycobacterium smegmatis* and morphological aspects of their reversion to the bacillary form. // Journal of Bacteriology. - 1982. - Vol. 151, No 2. - P. 1035–1039.

**THE STUDY OF CULTURAL AND IMMUNOBIOLOGICAL PROPERTIES
OF L-FORMS OF M. AVIUM SUBSP. PARATUBERCULOSIS ISOLATED IN VIVO**

Zavgorodniy A. I., Pozmogova S. A., Goncharova N. V., Kalashnyk M. V., Bilushko V. V.

National scientific center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv, Ukraine

Nowadays more noticeable attention is given to the existence of L-forma of MAP and its role in the infectious pathology and immunology. There are two potential possibilities of L-form's existence: CWD forms themselves are pathological and initiate the infection; the infection starts after the altered bacteria converts into the vegetative phase.

The aim. Isolation and identification of L-forms of Mycobacteria from the cattle reacting on tuberculin (PPD) for mammals. Study of bacteriological and immunological properties on the biological model.

Methods. Allergic, serological, bacteriological, pathological.

Results. It was found that in vivo isolates of L-forms of MAP have pleomorphic acid-susceptive structures in the first passage. The reversion into the bacterial form occurs while the multiple sequential "blind" passages on the special elective environments. Some of the populations of CWD-forms are stable and lose its ability to reversion and replication in vitro. CWD-forms of MAP are presented as a granulated and cocci-formed clusters, as a large spherical bodies or as an amorphous mass with a different acid-resistance properties. The stable CWD-form of MAP does not manifest an immunological activity in vivo.

Keywords: paratuberculosis, reversion, stable CWD-forms, biological and tinctorial properties of CWD-forms