

УДК 619:616-078:637.12.05-619:616.5-002.525
<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2021-2-18-25>

Лысенко А.П., доктор ветеринарных наук, профессор¹
Кучвальский М.В., аспирант²
Высоцкий А.Э., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
Притыченко А.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
Красникова Е.Л., научный сотрудник¹
Якобсон Е.И., магистрант²

¹РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского», г. Минск
²Белорусский государственный университет, г. Минск

ТРАНСПЛАЦЕНТАРНАЯ ПЕРЕДАЧА ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ У КОРОВ, ЗАРАЖЕННЫХ *Mycobacterium bovis*

Резюме

При исследовании гомогената печени и селезенки, тканей и амниотической жидкости 8- и 6-месячного плодов коров с локальными туберкулезными изменениями в лимфатических узлах легких выделена культура *M. bovis*, что достоверно подтверждает трансплацентарную передачу инфекции. Перенос происходил за счет фильтрующихся вирусоподобных форм микобактерий туберкулеза, которые трансформировались в тканях в некислотоустойчивые, частично кислотоустойчивые и типичные формы микобактерий туберкулеза. Это может приводить к возникновению эндогенного туберкулеза после рождения или создавать незаметный резервуар инфекции, так как некислотоустойчивые формы микобактерий не индуцируют развитие гиперчувствительности к туберкулину. Кроме того, персистенция у плодов измененных и типичных микобактерий может приводить к иммунологической толерантности к их антигенам.

Полученные результаты подтверждают правильность положения об изолированном выращивании телят, родившихся в неблагополучных стадах, с последующим откормом и сдачей на убой.

Ключевые слова: трансплацентарная передача, скрытая туберкулезная инфекция, микобактерии туберкулеза с дефектной клеточной стенкой.

Summary

A culture of *M. bovis* was isolated from liver and spleen homogenate, from tissues and amniotic fluid of 8- and 6-month-old fetuses of cows with local tuberculous changes in the lymph nodes of the lungs. It serves as confirmation of the transplacental infection transmission. The transfer occurred due to filtering virus-like forms of tuberculosis mycobacteria, which were transformed into non-acid-fast, partially acid-fast and typical forms of tuberculosis mycobacteria in tissues, which can lead to the emergence of endogenous tuberculosis after birth or create an invisible reservoir of infection, because non-acid-fast forms of mycobacterium do not induce the development of hypersensitivity to tuberculin. In addition, the persistence of modified and typical mycobacteria in fetuses can lead to immunological tolerance to their antigens.

The results obtained confirm the correctness of the regulations on the isolated rearing of calves born in disadvantaged conditions, followed by fattening and delivery for slaughter.

Keywords: transplacental transmission, latent tuberculosis, cell wall deficient tuberculosis mycobacteria.

Поступила в редакцию 01.09.2021 г.

ВВЕДЕНИЕ

Прерывание звеньев эпизоотической цепи передачи микобактерий туберкулеза (МБТ) составляет основу противотуберкулезных мероприятий и оздоровления стад крупного рогатого скота. Наименее изученным и даже спорным, но важным звеном

является трансплацентарная передача туберкулезной инфекции. Если Баумгартен в 1907 г. считал, что основной путь заражения человека и животных МБТ внутриутробный [1], то в настоящее время Международное эпизоотическое бюро (МЭБ) даже не упоминает возможность транспла-

центарного инфицирования крупного рогатого скота, считая основными путями заражения воздушно-капельный и кормовой [2]. Вместе с тем, представление о том, что плацента, разделяя кровотоки матери и плода, препятствует проникновению в ткани плода бактерий, ставилось под сомнение еще в первой половине XX века, в период значительного распространения туберкулеза, когда туберкулезные изменения обнаруживались у 2,3 % плодов больных коров и 3 % родившихся телят [1].

Несмотря на то, что случаи туберкулеза плодов и новорожденных большей частью объясняли туберкулезными поражениями матки и плаценты [3], в 1928 г. М.В. Триус по результатам опытов пришла к выводу, что через неповрежденную плаценту могут проходить какие-то «элементы туберкулезного возбудителя с ослабленной вирулентностью», по мнению В.А. Любарского (1928) – фильтрующиеся формы МБТ [1].

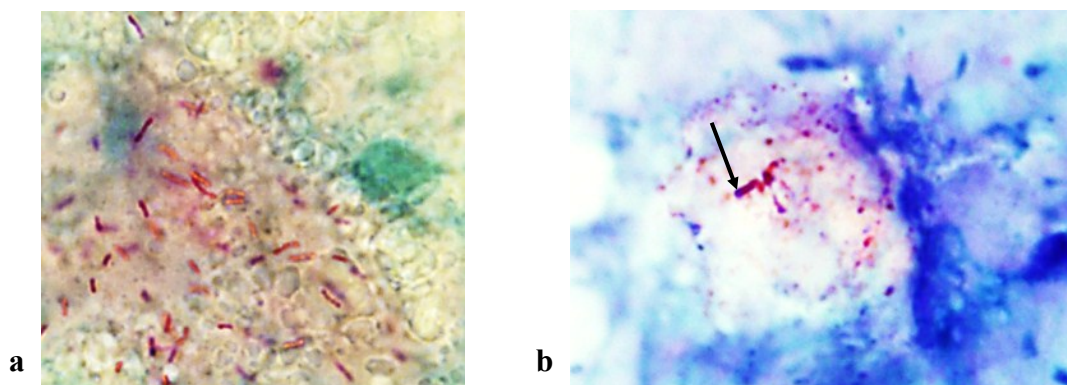
Возможность трансплацентарной передачи туберкулезной инфекции, в частности у человека, не отрицается и в настоя-

щее время [4], хотя механизм в деталях не изучен и не ясны последствия такого инфицирования. Лишь недавно было установлено, что L-формы вакцинного штамма *Mycobacterium bovis* BCG, персистирующие в организме матери при беременности, способны колонизировать плаценту и, трансформируясь в ультрамелкие формы, проходить через плацентарный барьер и проникать в ткани плода [5].

Цель исследований – изучение возможности трансплацентарной передачи туберкулезной инфекции у крупного рогатого скота с учетом способности МБТ трансформироваться в формы с дефектной клеточной стенкой (L- и cell wall deficient – CWD-формы).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали кровь, ткани сердца, легких, печени 8-месячного плода, амниотическую жидкость, селезенку, печень 6-месячного плода, взятых при диагностическом убое 2 стельных коров с единичными туберкулезными гранулемами в лимфатических узлах легких (рисунок 1).



а – корова № 11; б – корова № 32

Рисунок 1. – Отпечатки лимфатических узлов коров-матерей, 10×100

Микроскопия. Мазки тканей и выделенных культур фиксировали нагреванием и окрашивали по Кinyoun, а также дифференцирующим иммунопероксидазным методом (ДИП) [6], включавшим инактивацию эндогенной пероксидазы (ЭП) 3 % H₂O₂, окраску по Кinyoun, инкубацию с конъюгатом пероксидазы и аф-

финно-очищенных Ig (антител) антисыворотки к *M. bovis* 8 (истощенной антигенами микобактерий II–IV группы по Раньону и нетуберкулезной микрофлоры), обработку субстратным раствором 3,3'-диаминобензидина с H₂O₂. При такой ДИП-окраске кислотоустойчивые (КУ) МБТ окрашиваются в красный, неокислотоустойчивые

(НКУ, CWD) формы – в коричневый, а немикобактериальная микрофлора и ткани – в синий цвет. Результаты учитывают, если в контрольных мазках, окрашенных по Kinyoun и обработанных субстратным раствором, все объекты синего (сине-зеленого) цвета (полная инактивация ЭП). Микроскопию проводили на Olympus B51X (10×100).

Бактериологический посев. Гомогенаты тканей плодов после деконтаминации 6%-ной щавелевой кислотой по общепринятой методике высевали на среду Гельберга.

Кровь, алантоисную жидкость, гомогенаты селезенки и печени высевали на среду MucSel DW [7]. Перед посевом пробы (1:3) инкубировали 24 ч при температуре 37 °С со стимуляторами роста: MucSel DW (с 0,1% хлоргексидина для посева крови) [7], ВКГ («Hansa») [8].

Амниотическую жидкость перед смешиванием со стимулятором роста пропускали через фильтр Millex GP 0.22 µm, а гомогенат селезенки и печени деконтаминировали 6%-ной щавелевой кислотой.

Посевы инкубировали при температуре 37 °С, при отсутствии роста делали «слепые» пересевы на среде MucSel DW.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Пробы прогревали 5 мин (95 °С) в лизирующем буфере. ДНК выделяли на колонках с сорбентом (ИБОХ НАНБ). ДНК исследовали в ПЦР с праймерами 16s RNA, MPB64, MPB 70, Is 6110 (Mycobacteria). Амплификацию проводили на C1000™ ThermoCycler и CFX96™ Real-Time System (BioRad). Результаты электрофореза амплификатов учитывали на Molecular Imager GelDoc™ XR+ (BioRad).

Для электрофореза в полиакриламидном геле (12 % ПААГ-ДСН) (Laemmli, 1970) и иммуноблоттинга отмытую бактериальную массу изолятов суспендировали в буферном растворе для нанесения образцов (4х), прогревали 7 мин при температуре 98 °С, осаждали центрифугированием при 14000 об/мин. После электрофореза

перенос осуществляли на Trans-blot SD. Для иммуноблоттинга использовали кроличью антисыворотку к CWD *M. tuberculosis* H37Rv (1:80), адсорбированную смесью инактивированных стафилококков, стрептококков, кишечной палочки и пастерелл, конъюгат пероксидазы с козьими IgG к IgG кролика (ThermoFisher Scientific 1:3000) и субстратную смесь (3,3'-диаминобензидин «Fluka» с H₂O₂).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В средостенных лимфатических узлах коров-матерей обнаружены единичные гранулемы, в которых при микроскопии найдены типичные МБТ (рисунок 1). Туберкулезных изменений в других тканях, в том числе в матке и плаценте, не было.

В мазках-отпечатках легких 8-месячного плода обнаружены микобактериальные антигены: коричневые включения в клетках, коричневая «сеть» в межклеточном пространстве (рисунок 2, стрелки). В печени найдены слабые следы антигенов (темная окантовка клеток), а также палочковидные формы светло-красного цвета (частично кислотоустойчивые – ЧКУ), окружавшие некоторые клетки (рисунок 2).

Выраженное накопление микобактериальных антигенов отмечено в клетках сердца и крови 8-месячного плода (рисунки 2, 3 интенсивная коричневая окраска клеток). При этом в крови в значительных количествах (нередко до 5 клеток в поле зрения микроскопа) обнаружены коричневые палочковидные формы, явно НКУ (CWD) МБТ (рисунок 4, стрелки).

Посев крови 8-месячного плода коровы, больной туберкулезом, дал рост микроорганизмов с характерной для CWD МБТ морфологией (рисунки 5, 6). В ПЦР была подтверждена принадлежность изолята к роду *Mycobacterium* (рисунок 7). Вместе с тем при посеве тканей, деконтаминированных 6%-ной щавелевой кислотой, на среду Гельберга выделить типичные МБТ не удалось.

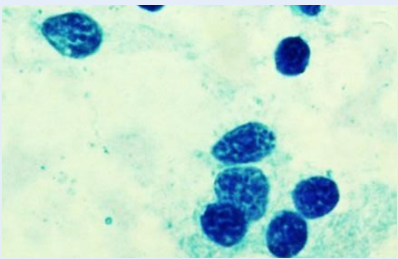
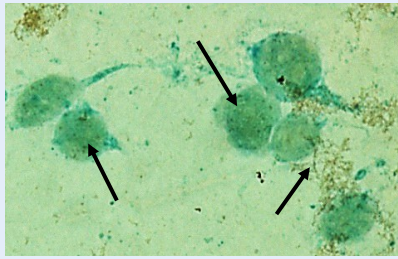
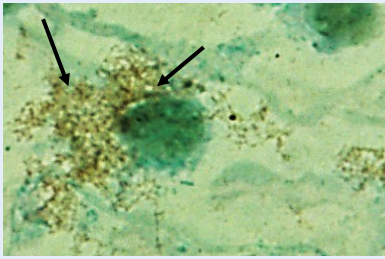
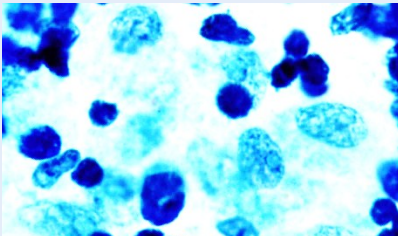
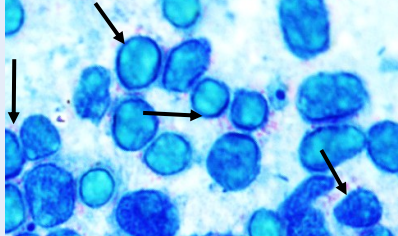
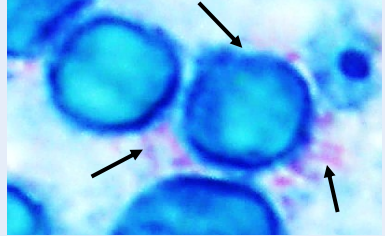
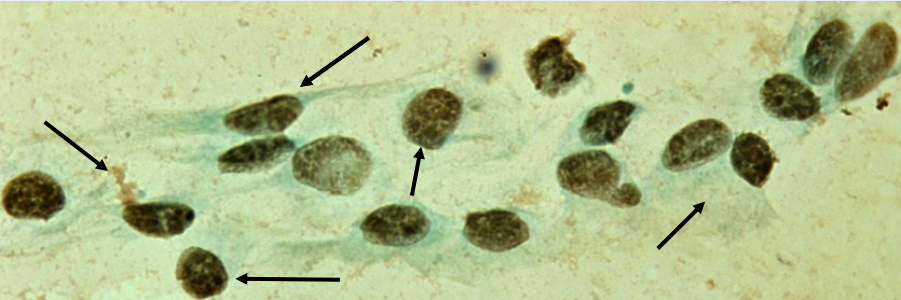
| Контроль инактивации ЭП | ДИП-окраска | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| | легкое | |
|  |  |  |
| печень | | |
|  |  |  |
| сердце | | |
|  | | |

Рисунок 2. – Отпечатки тканей легкого, печени, сердца 8-месячного плода коровы, больной туберкулезом. ДИП-окраска с использованием конъюгата пероксидазы с Ig к антигенам *M. bovis* 8, 10×100

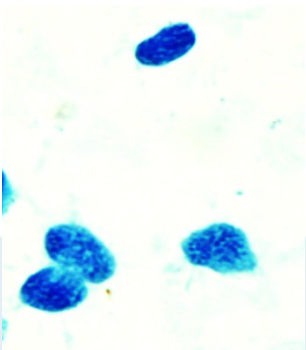
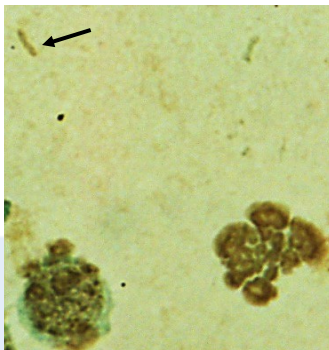

| Контроль инактивации ЭП | ДИП-окраска | |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|
|  |  |  |

Рисунок 3. – Мазки крови 8-месячного плода коровы, больной туберкулезом. ДИП-окраска с использованием конъюгата пероксидазы с Ig к антигенам *M. bovis* 8, 10×100

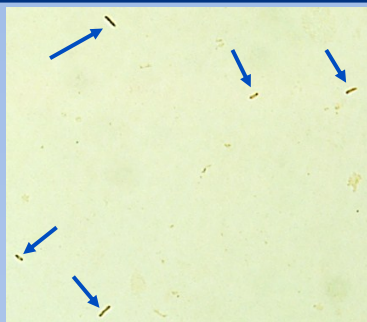
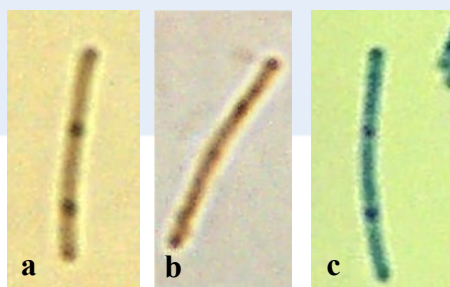


Рисунок 4. – Мазок крови 8-месячного плода коровы, больной туберкулезом. 5 коричневых палочковидных форм – CWD МБТ (стрелки). ДИП-окраска с использованием конъюгата пероксидазы с Ig к антигенам *M. bovis* 8, 10×100



Рисунок 5. – Изолят из крови 8-месячного плода коровы, больной туберкулезом. ДИП-окраска с использованием конъюгата пероксидазы с Ig к антигенам *M. bovis* 8, 10×100

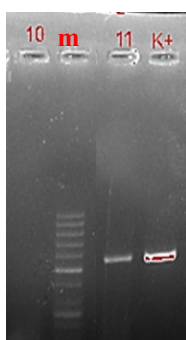


а – палочковидная форма, выделенная из крови 8-месячного плода коровы, зараженной *M. Bovis*; б – CWD МБТ из крови человека с костным туберкулезом; с – CWD *M. bovis* 8, 10×100; а, б – ДИП-окраска, с – Kinyoun, 10×100

Рисунок 6. – Морфология палочковидных форм CWD МБТ, выделенных из разных источников

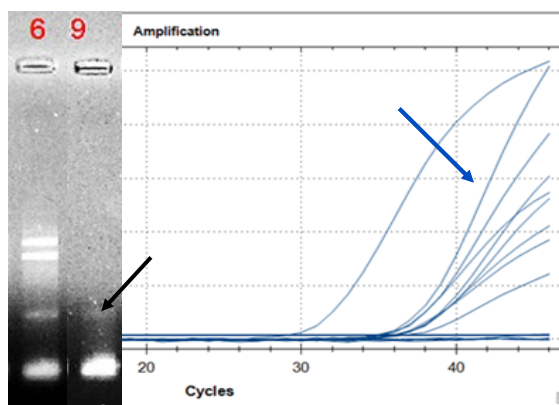
В гомогенате печени и селезенки 6-месячного плода коровы № 32, больной туберкулезом, был обнаружен геном микобактерий комплекса *tuberculosis-bovis* (ри-

сунок 8), что коррелировало с присутствием в клетках микобактериальных антигенов (рисунок 9).



10 – отрицательный контроль; m – маркер молекулярной массы (м.м.); 11 – исследуемый изолят; K+ – положительный контроль

Рисунок 7. – Результат ПЦР с праймерами 16s RNA ДНК изолята из крови 8-месячного плода коровы № 11, больной туберкулезом



6 – положительный контроль; 9 – исследуемая проба
Рисунок 8. – Результаты ПЦР с праймерами 16s RNA, MPB70, MPB 64 (сверху-вниз) ДНК из гомогената печени и селезенки эмбриона коровы № 32, больной туберкулезом (ампликон MPB 64 – черная стрелка), и ПЦР-RT с праймерами Is 6110 (Cq 35.91, синяя стрелка)

При посеве амниотической жидкости, пропущенной через фильтр 0,22 μm , гомогената печени и селезенки 6-месячного плода, деконтаминированного 6%-ной щавелевой кислотой, инкубированных в стимуляторах роста, в обоих случаях через 6 и 5 дней был получен рост НКУ полиморфных палочко-

видных форм, которые по морфологии не отличались от изолята из лимфатического узла матери (таблица). ДНК изолятов в ПЦР дала положительную реакцию с праймерами микобактерий комплекса *tuberculosis-bovis* (рисунок 10), что позволило отнести их к CWD МБТ.

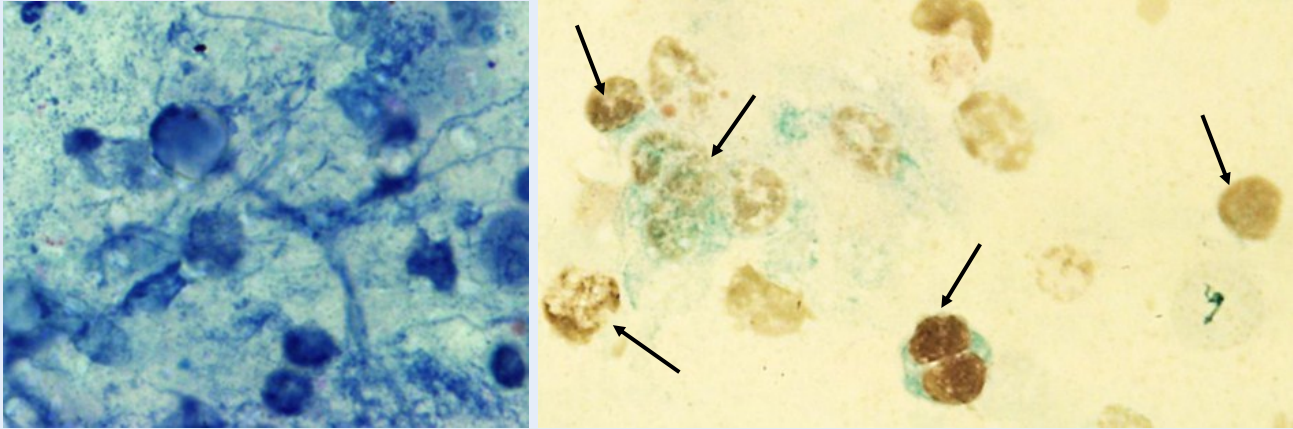
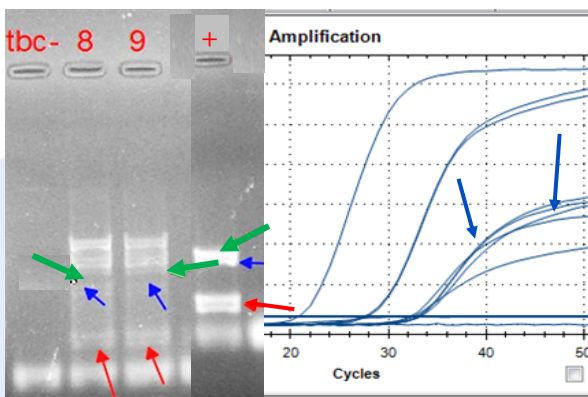


Рисунок 9. – Клетки в гомогенате печени и селезенки 6-месячного плода коровы, больной туберкулезом. ДИП-окраска с использованием конъюгата пероксидазы с Ig к антигенам *M. bovis* 8, 10x100


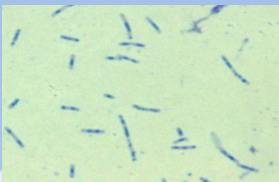


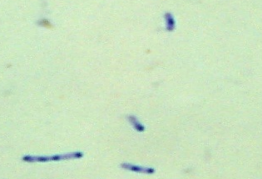
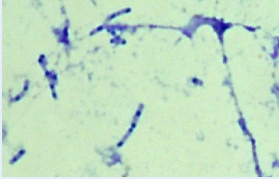
Полипептидный и антигенный состав CWD изолята из гомогената печени и селезенки плода коровы № 32, деконтаминированного 6%-ной щавелевой кислотой, изолятов из стерилизованной фильтрацией аллантаоисной жидкости, выделенных с использованием стимуляторов роста ВКГ и МусСел DW, был одинаков и не отличался от состава CWD МБТ из лимфатического узла коровы № 32, больной туберкулезом (рисунок 11). Это указывает на то, что изоляты не были контаминантами, так как имели идентичный антигенный спектр, выявляемый антисывороткой к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv, и были CWD-формой од-

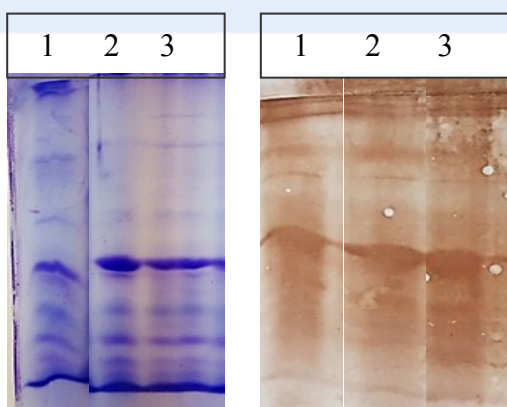
ного и того же штамма *M. bovis*. Наиболее важным явилось выделение из гомогената печени и селезенки 6-месячного плода типичных МБТ (рисунок 12). На среде Гельберга рост (1 колония Ø2 мм) был обнаружен только через 3,5 месяца после посева. Большую часть популяции изолята составляли КУ красного цвета палочки разной длины, но встречались и НКУ синего цвета, похожие по морфологии на ранее выделенные из этого материала CWD-формы. Исследование ДНК в ПЦР подтвердило принадлежность изолята к *M. bovis* (Is 6110, Cq 20.90).



tbc- – отрицательный контроль;
+ – положительный контроль
Рисунок 10. – Результаты ПЦР с праймерами 16s RNA (зеленая стрелка), MPB70 (синяя стрелка), MPB 64 (красная стрелка) и ПЦР-RT с праймерами Is 6110 ДНК изолятов из амниотической жидкости (проба № 8) и из гомогената печени и селезенки 6-месячного плода (проба № 9) (положительные реакции – стрелки)

Таблица. – Результаты посева на среду MucCel DW амниотической жидкости, гомогената печени и селезенки 6-месячного плода коровы № 32, больной туберкулезом

| Материал, посеянный на среду MucCel DW | Рост в исходном посеве | Рост после нескольких пересевов |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| Амниотическая жидкость, пропущенная через фильтр 0,22 мк |  |  |
| Гомогенат печени и селезенки плода коровы, деконтаминированный 6%-ной щавелевой кислотой |  |  |
| Гомогенат лимфатического узла с туберкулезными изменениями коровы № 32, деконтаминированный 6%-ной щавелевой кислотой |  |  |



1 – CWD МБТ из лимфоузла коровы № 32;
 2 – CWD МБТ из гомогената печени и селезенки плода коровы № 32;
 3 – CWD МБТ из аллантоисной жидкости
Рисунок 11. – Электрофорез (12 % ПААГ–ДСН) и иммуноблоттинг с а/с к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv

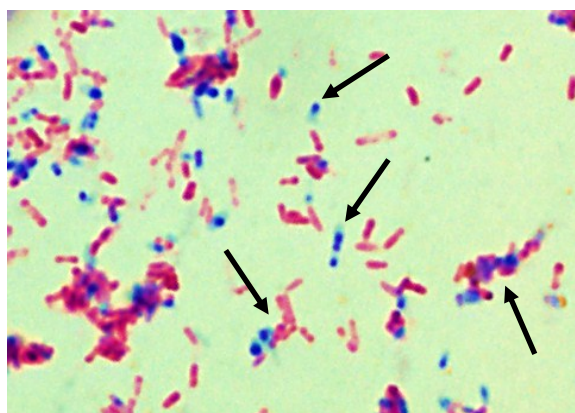


Рисунок 12. – Изолят из гомогената печени и селезенки 6-месячного плода коровы № 32, выросший на среде Гельберга, НКУ (синего цвета) формы МБТ (стрелки)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Факт выделения типичных МБТ из смеси тканей печени и селезенки плода коровы с локальными туберкулезными изменениями в лимфатических узлах лег-

ких и без видимой патологии матки и плаценты достоверно свидетельствует о трансплацентарной передаче туберкулезной инфекции. Известно, что в основе трансплацентарной передачи туберкулез-

ной инфекции может лежать колонизация плаценты L-формами МБТ, образующими ультрамелкие вирусоподобные формы, преодолевающие плацентарный барьер [5]. В проведенных исследованиях подтверждено, что трансплацентарный перенос явно осуществлялся за счет вирусоподобных фильтрующихся форм МБТ, так как из амниотической жидкости, пропущенной через фильтр 0.22 μm , были выделены CWD МБТ, являющиеся результатом развития фильтрующихся форм МБТ под действием стимулятора роста и культивирования на специальной питательной среде.

Установлено, что преодолевшие плацентарный барьер вирусоподобные формы МБТ инфицировали клетки тканей плодов и трансформировались в бактериальные неокислостойчивые CWD-формы, фактически вызывавшие бактериемию (рисунки 3, 4). Локализуясь в тканях, они частично восстанавливали кислотоустойчивость (рисунок 2) и даже в одном случае реверсировали в типичные МБТ (рисунок

12). Способность к реверсии L-форм МБТ, преодолевших плацентарный барьер, отмечалась и другими исследователями [5]. Последствием этого может быть развитие эндогенного туберкулеза после рождения [1, 3]. Вместе с тем, CWD МБТ не всегда могут трансформироваться в типичную форму [7, 8, 11], однако способны пожизненно персистировать в организме, оставаясь незамеченными, так как не индуцируют развитие гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к туберкулину [9–11]. При этом нельзя исключить, что персистенция у плодов CWD и типичных МБТ может приводить к иммунологической толерантности к их антигенам, что резко снижает эффективность иммунологических методов выявления туберкулезной инфекции у взрослых животных. То есть телята, родившиеся в неблагополучном по туберкулезу стаде, представляют собой скрытый резервуар инфекции и должны исключаться из воспроизводства стада и получения молока.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ротов, В. И. Туберкулез сельскохозяйственных животных / В. И. Ротов, П. И. Кокуричев, П. Е. Савченко. – Киев : Урожай, 1973. – 384 с.
2. Cousins, D. V. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock / D. V. Cousins // *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.* – 2001. – Vol 20, № 1. – P. 71–85.
3. Юсковец, М. К. Туберкулез сельскохозяйственных животных и птиц / М. К. Юсковец. – Минск, 1963. – 446 с.
4. Врожденный туберкулез / Е. В. Богданова [и др.] // *Туберкулез и болезни легких.* – 2012. – № 1. – С. 54–58.
5. *Mother-to-newborn transmission of mycobacterial L-forms and V δ 2 T-cell response in placentobiotome of BCG-vaccinated pregnant women* / T. Dimova [et al.] // *Scientific Reports.* – 2017. – 11 – P. 1–11.
6. Выявление микобактерий туберкулеза в тканях с помощью дифференцирующей иммунопероксидазной окраски / А. П. Лысенко [и др.] // *Туберкулез и болезни легких.* – 2014. – № 10. – С. 55–58.
7. Феномен изменчивости микобактерий туберкулеза и его использование для обнаружения туберкулезной инфекции / А. П. Лысенко [и др.] // *Туберкулез – глобальная катастрофа человечества: материалы I Междунар. заочной науч.-практ. конф., 24 марта 2014 г. / Ростов-на-Дону : РостГМУ, 2014. – С. 176–198.*
8. Власенко, В. В. Современная диагностика туберкулеза / В. В. Власенко, А. П. Лысенко, И. Г. Власенко. – Vinnica : Edelweis I K^o, 2011. – 198 с.
9. Diller, I. *Three similar strains of pleomorphic acid-fast organisms isolated from rat and mouse tissues and from human blood* / I. Diller // *Am. Rev. Resp. Dis.* – 1962. – Vol. 86. – P. 932–935.
10. *Morphological, biological and immunological studies on isolates from tumors and leukemic bloods* / F. Seibert [et al.] // *Ann. NY Acad Sci.* – 1970. – Vol. 174, № 2. – P. 690–728.
11. Chandrasekhar, S. *Studies on cell-wall deficient non-acid fast variants of Mycobacterium tuberculosis* / S. Chandrasekhar, S. Ratnam // *Tubercle and Lung Disease.* – 1992. – Vol. 73. – № 5. – P. 273–279.