

УДК 619:616-078:637.12.05-619:616.5-002.525
<https://doi.org/10.47612/2224-168X-2021-2-40-53>

Лысенко А.П., доктор ветеринарных наук, профессор¹
 Кучвальский М.В., аспирант²
 Красникова Е.Л., научный сотрудник¹
 Якобсон Е.И., магистрант²

¹РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелецкого», г. Минск

²Белорусский государственный университет, г. Минск

ИССЛЕДОВАНИЕ СВЯЗИ ЛИМФОСАРКОМЫ С ЛАТЕНТНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ

Резюме

В клетках тканей козы, павшей с признаками лимфосаркомы (резкая гиперплазия лимфатических узлов и селезенки, позитивная РИД с антигеном для диагностики лейкоза – FLK-BLV – bovine leukemia virus), обнаружена ДНК и антигены микобактерий туберкулеза (МБТ). Скрытая туберкулезная инфекция подтверждена выделением из деконтаминированных и профильтрованных через стерилизующий фильтр гомогенатов лимфатических узлов и селезенки некислоустойчивых МБТ (с дефектной клеточной стенкой – cell wall deficient – CWD). В популяциях CWD МБТ из лимфосаркоматозных тканей присутствовал ряд характерных разновидностей клеток, которые ранее были обнаружены в изолятах из крови туберкулин-положительной козы этого же стада, из лимфатического узла BLV-серопозитивной коровы и непосредственно из FLK-BLV.

В изолятах лимфосаркоматозных тканей, наряду с антигенами МБТ, обнаружены антигены, реагирующие с антителами к BLV и имевшие такую же молекулярную массу, как и антигены BLV, что свидетельствовало о существовании связи вирусоподобных форм МБТ с онкогенезом.

Ключевые слова: измененные формы микобактерий, латентный туберкулез, дефектная клеточная стенка, онкогенез, лимфосаркоматоз.

Summary

DNA and antigens of mycobacteria tuberculosis (MBT) were detected in the cells of the tissues of a goat that fell with signs of lymphosarcoma (sharp hyperplasia of the lymph nodes and spleen, a positive AGID with an antigen or the diagnosis of leukemia - FLK - BLV - bovine leukemia virus). Latent tuberculosis infection was confirmed by the isolation of non-acid - fast MBT (cell wall-cell wall deficient - CWD) from decontaminated and filtered through a sterilizing filter of lymph node and spleen homogenates. In the populations of CWD MBT from lymphosarcomatous tissues a number of characteristic cell varieties were present which were previously found in isolates from the blood of a tuberculin-positive goat of the same herd, from the lymph node of a BLV-seropositive cow and directly from FLK-BLV.

In the isolates of lymphosarcomatous tissues along with MBT antigens, antigens that reacted with antibodies to BLV and had the same molecular weight as BLV antigens were found, which indicated the existence of a connection between virus-like forms of MBT and oncogenesis.

Keywords: altered mycobacterial forms, latent tuberculosis, deficient cell wall, oncogenesis, lymphosarcomatosis.

Поступила в редакцию 06.08.2021 г.

ВВЕДЕНИЕ

Стада крупного рогатого скота, в которых обнаруживают животных, инфицированных вирусом лейкоза (bovine leukemia virus – BLV), встречаются по всему миру. В США инфицирование коров BLV зарегистрировано почти в 100 % крупных молочных стад [1].

Широкое распространение лейкоза

и тот факт, что в крови и в молоке инфицированных особей постоянно присутствуют лимфоциты, содержащие BLV [2, 3], вызывали необходимость изучения риска передачи BLV людям.

Исследования 1975–1979 годов по обнаружению у людей антител к антигенам BLV в реакции иммунодиффузии (РИД) не нашли серологических доказа-

тельств того, что BLV может заразить человека [4]. Использование иммуноблоттинга, который появился позже и имел чувствительность почти в 100 раз большую, чем РИД [5], позволило обнаружить в крови 39 % обследованных людей антитела к капсидному белку BLV р24 [6]. В дальнейшем с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), ПЦР *in situ* и иммуногистохимического (ИНС) тестирования геном и протеины BLV были обнаружены в тканях молочной железы женщин [7] и установлена связь инфицирования BLV с развитием рака молочной железы [8, 9]. Проблема тем не менее остается спорной, так как в ряде исследований такой связи не найдено [10].

Этиология рака молочной железы интенсивно изучалась еще в XX веке. В частности, было установлено, что почти в 100 % случаев из опухолей молочной железы можно выделить неокислостойчивые (с дефектной клеточной стенкой – *cell wall deficient* – CWD) микобактерии туберкулеза (МБТ) [11]. Недавно установлено, что CWD МБТ определенным образом связаны с BLV [12, 13]. В культуральной жидкости клеток почки эмбриона овцы, инфицированных BLV (FLK-BLV), были обнаружены кислотоустойчивые и CWD формы микобактерий и выделены CWD МБТ, вызывавшие у морских свинок образование антител, реагирующих с FLK-BLV. Более того, CWD МБТ были выделены из культуральной жидкости FLK-BLV, фильтрованной через стерилизующий фильтр, что указывало на присутствие в ней вирусоподобных форм МБТ. Идентичные культуры были выделены из фильтрованных сывороток крови и гомогенатов лимфатических узлов серопозитивных (BLV+) коров. Полученные результаты позволили предположить, что BLV может быть вирусоподобной формой МБТ. Безусловно, это требует подтверждения, в частности, по триаде Коха этиологический агент должен выделяться при всех случаях данного заболевания. В связи с этим **целью исследований** было изучение возможной связи лимфосаркомы у козы со скрытой туберкулезной инфекцией. Известно, что BLV может вызвать заболевание у

коз. В 70-х годах XX века болезнь была воспроизведена введением козе овечьих лимфоцитов, зараженных BLV. Через 8 лет животное пало от лимфосаркомы. Опухоли локализовались в лимфатических узлах брыжейки, сальнике, в ретробульбарных тканях. Результаты молекулярной гибридизации подтвердили, что лимфосаркома была индуцирована BLV [14]. Вместе с тем, позже были получены данные о существовании особого сероварианта BLV, к которому восприимчивы овцы и козы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали сыворотку крови, лимфатические узлы и селезенку павшей 5-летней козы.

Окраска мазков-отпечатков тканей. Мазки-отпечатки готовили общепринятым методом. Эндогенную пероксидазу (ЭП) инактивировали 3%-ной H_2O_2 и обработкой 96%-ным этанолом. Мазки окрашивали по Kinyoun с последующей иммунопероксидазной окраской (дифференцирующая иммунопероксидазная – ДИП-окраска), при которой кислотоустойчивые (КУ) микобактерии окрашиваются в красный, неокислостойчивые (НКУ) CWD МБТ и антигены МБТ – в коричневый с оттенками, немикобактериальная микрофлора и ткани – в синий цвет [15].

Для ДИП-окраски использовали:

- аффинно-очищенные Ig из антисыворотки к соникату *M. bovis* (истощенной смесью инактивированной нетуберкулезной микрофлоры);

- антисыворотку к изоляту из культуральной жидкости FLK-BLV серии 30 (Is CWD МБТ FLK-BLV с.30), 1:40;

- антисыворотку к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv, 1:40;

- с экспозицией 90–100 мин.

На мазки на 60 мин наносили конъюгат антител к IgG кролика с пероксидазой (Sigma), на 15 мин – субстратный раствор ДАБ (10 мг 3,3'-диаминобензидина «Fluka» в 2 мл ДМСО, 10 мл дистиллированной воды с 20 мкл 33%-ной H_2O_2). После каждого этапа мазки промывали водой с твином 20 (0,05 %). Контролем инактивации

ции ЭП служили мазки, окрашенные по Kinyoun и обработанные субстратным раствором ДАБ.

Микроскопию проводили на микроскопе Olimpus B51X.

Посев тканей лимфатических узлов и селезенки. Гомогенаты тканей центрифугировали при 500 g для осаждения крупных фрагментов. Надосадочную жидкость делили на 2 части. К первой части добавляли равный объем 6%-ной щавелевой кислоты и центрифугировали при 3000g 15 мин, часть осадка суспендировали в стерильном 0,9%-ном растворе NaCl и высевали на пробирки со средой Гельберга. Вторую часть осадка суспендировали в стимуляторе роста ВКГ (1:3) [16, 17], инкубировали 24 ч при температуре 37 °C и высевали на пробирки со средой MucCel DW.

Часть гомогенатов, освобожденных от крупных частиц, последовательно пропускали через фильтры Millex® GP 0.45 µm и 0.22 µm. Фильтраты (0.22 µm) смешивали со стимулятором роста ВКГ (1:3), инкубировали 24 ч при температуре 37 °C и высевали на пробирки со средой MucCel DW. Посевы инкубировали при температуре 37 °C. При отсутствии признаков роста через 1-2 дня делали «слепые» пересевы на среду MucCel DW. При появлении колоний делали мазки, которые окрашивали по Kinyoun и ДИП-методом.

ПЦР. Для выделения ДНК гомогенаты и бактериальную массу изолятов (0,2–0,5 мг/мл) прогревали (5 мин, 95 °C) в лизирующем буфере. ДНК выделяли на колонках с сорбентом (ИБОХ НАНБ) и исследовали с праймерами Mucobacteria: 16s RNA, MPB64, MPB 70, dev, а также Is 6110 в ПЦР-РТ. Амплификацию проводили на C1000TM ThermoCycler (BioRad) и CFX96™ Real-Time System (BioRad). Продукты амплификации детектировали в электрофорезе в 2%-ной агарозе (Sigma), результаты учитывали на Molecular Imager GelDoc™ XR+ (BioRad).

Сыворотку крови павшей козы получили центрифугированием сгустков крови из сердца. Антитела к BLV в сыворотке определяли РИД (OIE Manual, 2012) с ан-

тигеном для диагностики бычьего лейкоза (AgFLK-BLV) ООО «ТМ».

Антигенный состав изолятов изучали в РИД, в ракетном иммуноэлектрофорезе (РИЭФ, Axelsen N. et al.1977), в электрофорезе ПААГ-ДСН (Laemmli, 1970) с последующим иммуноблоттингом, в непосредственном иммуноферментном анализе (ИФА) с использованием соникатов, полученных дезинтеграцией бактериальной массы изолятов ультразвуком (Bandelin Sonopuls 2400). В исследованиях использовали кроличьи антисыворотки к соникатам типичных штаммов *M. tuberculosis* H₃₇Rv и *M. bovis* 8, к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv, к изоляту CWD МБТ из культуральной жидкости FLK-BLV серии 30, к изоляту CWD МБТ из культуральной жидкости FLK-BLV серии НС, фильтрованной через фильтр Millex® GP 0.22 µm, к культуральной жидкости FLK-BLV (AgFLK-BLV), а также 4 сыворотки крови BLV+ коров, 2 сыворотки волов, сенсibilизированных *M. avium* 1603 и *M. bovis* 8, 4 сыворотки здорового крупного рогатого скота.

Лекарственную чувствительность изолятов определяли в диффузионном тесте на среде MucCel DW с использованием стандартных дисков с антибиотиками (ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера). Для изучения изменения морфологии изолятов под действием антибиотиков делали мазки с границы зоны задержки роста, которые окрашивали по Kinyoun.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

У павшей козы обнаружена резкая гиперплазия лимфатических узлов (особенно брыжеечных) и селезенки (рисунок 1), что было характерно для лимфосаркомы.

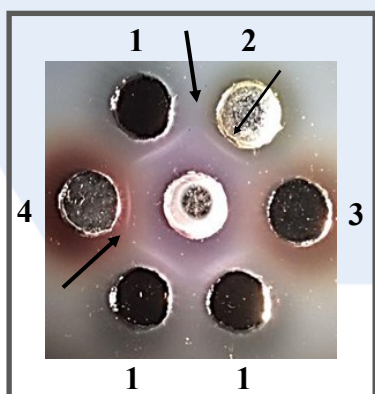
Сыворотка крови козы реагировала в РИД с антигеном FLK-BLV, образуя линию преципитации, идентичную линии положительной сыворотки коровы, больной лейкозом (рисунок 2, позиция 2, стрелка). Интересно, что такая же линия образовывалась с антисывороткой к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv (рисунок 2, позиция 4, стрелка).



**Рисунок 1. – Гиперплазия
бронхиального, брыжеечного
лимфатического узла
и селезенки**

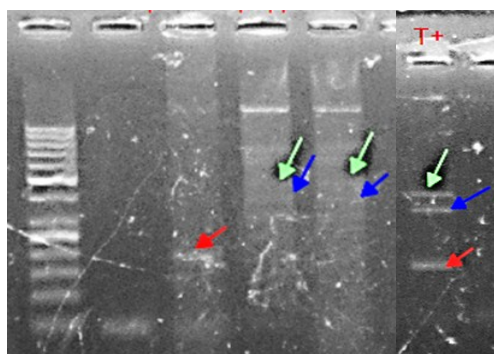
В ПЦР ДНК из гомогенатов лимфатических узлов и селезенки козы реагировала с праймерами *Mycobacteria* 16sRNA, MPB70, MPB64 (рисунок 3, таблица 1). В

ПЦР-RT с праймерами Is 6110 положительный результат получен только с ДНК из гомогената селезенки (рисунок 4, таблица 1).



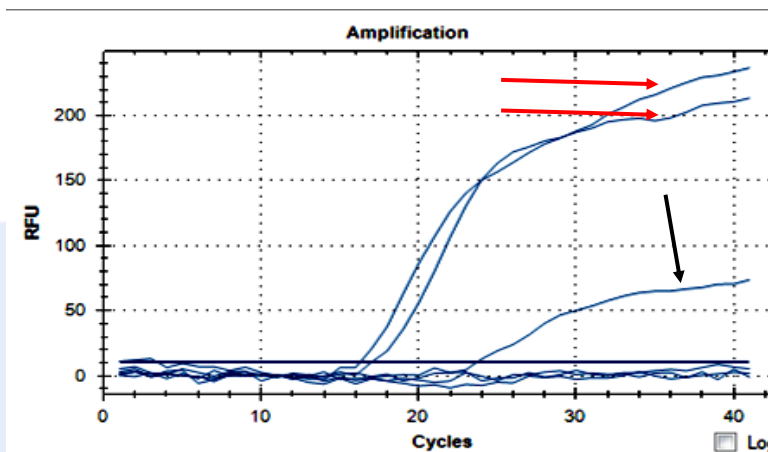
1 – сыворотка павшей козы; 2 – сыворотка коровы, больной лейкозом; 3 – отрицательная сыворотка; 4 – антисыворотка к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv

**Рисунок 2. – РИД с антигеном FLK-BLV
(в центральной лунке)**



Слева-направо: маркер молекулярной массы (м.м.); отрицательный контроль; бронхиальный лимфоузел; брыжеечный лимфоузел; селезенка; T+ – положительный контроль

**Рисунок 3. – Результат ПЦР ДНК гомогенатов
тканей козы с праймерами *Mycobacteria* 16s RNA
(зеленые стрелки), MPB70 (синие стрелки),
MPB 64 (красные стрелки)**

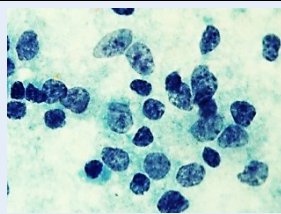
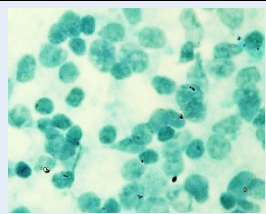
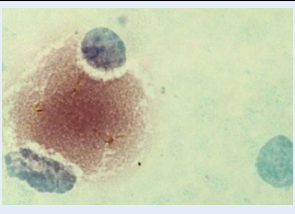
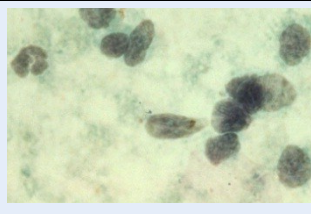
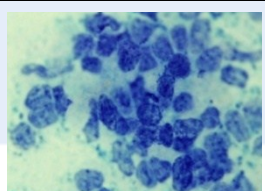
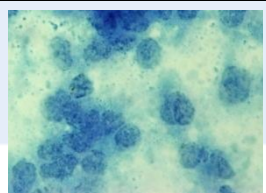
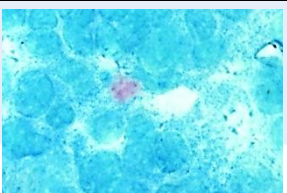
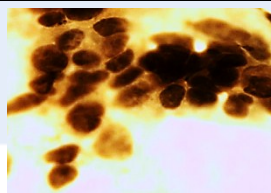
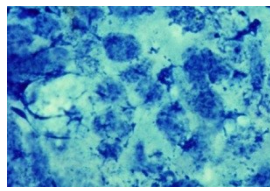
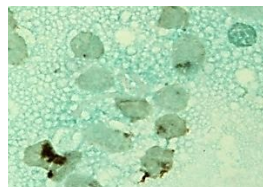
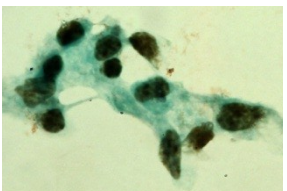
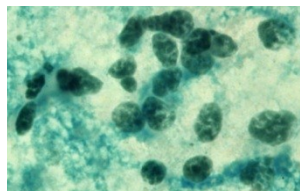


**Рисунок 4. – ПЦР-RT
с праймерами Is 6110.
Черная стрелка – положительная
реакция с ДНК из селезенки,
красные стрелки –
положительные контроли К+**

При ДИП-окраске в контрольных мазках тканей все клетки были синего цвета, что указывало на полную инактивацию

ЭП и позволяло корректно оценивать появление специфической коричневой окраски при использовании антител (таблица 1).

Таблица 1. – Результаты ДИП-окраски мазков и ПЦР тканей

Контроль инактивации ЭП	g из a/c к <i>M. bovis</i>	a/c к CWD МБТ FLK-BLV с.30	a/c к CWD <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv
Селезенка, ПЦР – 16sRNA+, MPB70+, Is 6110+			
			
Бронхиальный лимфатический узел, ПЦР – MPB64+			
			
Брыжеечный лимфатический узел, ПЦР – 16sRNA+, MPB70+			
			

С помощью очищенных антител к *M. bovis* (Ig a/c к *M. bovis*) клетки с коричневыми и черными включениями (антигены МБТ) были выявлены в селезенке и в брыжеечном лимфатическом узле (таблица 1). Кроме того, в селезенке обнаружены черно-коричневые коккоиды, похожие на зерна Муха (рисунок 5).

Специфическую черно-коричневую окраску давали клетки селезенки и брыжеечного лимфатического узла, окрашенные с применением антисыворотки к CWD МБТ FLK-BLV с.30 (таблица 1).

Наиболее интенсивная специфическая окраска клеток тканей была получена при ДИП-окраске с использованием антисыворотки к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv (таблица 1).

В целом результаты ДИП-окраски показали, что в клетках исследованных

тканей находились антигены, которые реагировали как с антителами к антигенам типичных МБТ, так и более интенсивно с антителами к CWD МБТ.

При посеве гомогенатов тканей, деконтаминированных щавелевой кислотой, на среду Гельберга типичных МБТ не выделено. В то же время гомогенаты тканей, инкубированные со стимулятором роста, дали рост на среде МусСел DW через 2–4 дня в исходном посеве или в I-II слепом пересеве (таблица 2). Для выделения изолята из гомогената селезенки, пропущенного через фильтры 0,45 μm и 0,22 μm, потребовалось 4 «слепых» пересева.

Изоляты имели характерный для CWD МБТ полиморфизм, причем клетки одинаковых форм встречались как в изолятах из разных тканей, так и в изолятах из гомогенатов, деконтаминированных щаве-

левой кислотой и фильтрацией через поры 0,45 μm и 0,22 μm (рисунки 6, 7).

Изоляты реагировали с антителами к антигенам *M. bovis* при ДИП-окраске приобретали специфический коричневый цвет (рисунок 8). Присутствие в изолятах общих антигенов с МБТ подтверждали результаты РА (рисунок 9). Интересно, что изоляты также агглютинировались сыворотками крови BLV+ коров (рисунок 9).

ДНК изолятов в ПЦР реагировала с праймерами MPB70 и dev комплекса *tuberculosis-bovis*, что в совокупности с культурально-морфологическими свойствами позволяло отнести их к CWD МБТ. Это подтверждали результаты ИФА соникатов изо-

лятов с антисывороткой к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv, с которой они реагировали в разведении 1:1200 с превышением ОП 3,5–9,4 (рисунок 10а).

Соникаты изолятов из тканей козы также интенсивно реагировали с антисывороткой (а/с) к изоляту CWD МБТ из культуральной жидкости FLK-BLV, пропущенной через фильтр 0,22 μm (рисунок 10b). Результаты РИЭФ подтвердили, что изоляты из тканей козы имели такой же антигенный состав, что и изолят CWD МБТ из культуральной жидкости FLK-BLV, фильтрованной через фильтр 0,22 μm , но концентрация общих антигенов в них была гораздо ниже (рисунок 11).

Таблица 2. – Результаты посева гомогенатов тканей козы, инкубированных со стимулятором роста на среду MycCel DW

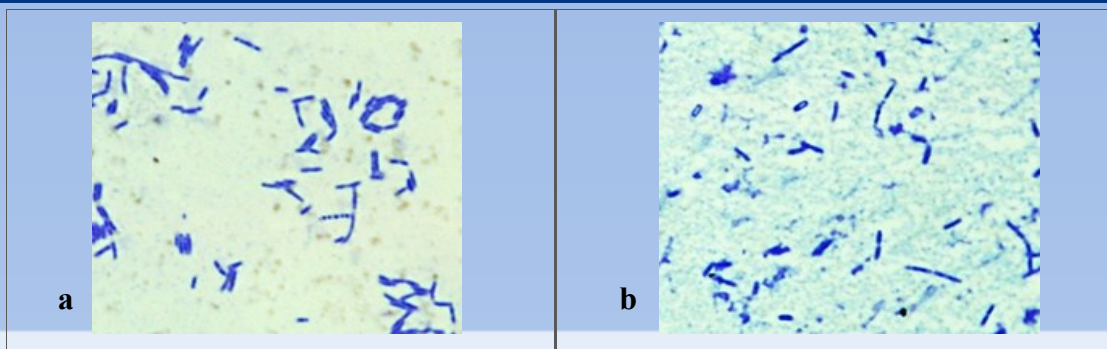
Материал	Метод деконтаминации	
	щавелевая кислота	фильтрация 0,45 μm и 0,22 μm
Бронхиальный лимфоузел	+	-
Брыжеечный лимфоузел	-	+
Селезенка	+	+



Рисунок 5. – Гомогенат селезенки. ДИП-окраска с Ig из а/с к *M. bovis*. Видны специфически окрашенные коккоиды (стрелки)

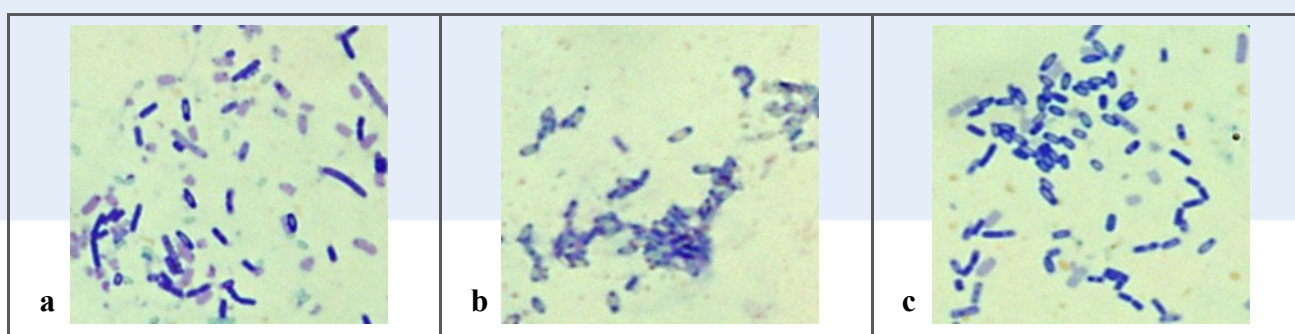
Самым интересным было то, что соникаты изолятов из тканей козы, павшей от лимфосаркомы, реагировали с антисывороткой к FLK-BLV, разведенной 1:300–1:600, а соникат изолята из брыжеечного лимфоузла (0,22 μm) – даже с разведением 1:1200 (рисунок 10с). То есть бактериальные изоляты явно содержали такие же антигены, что и BLV. Это подтверждали и результаты ИФА с сыворотками крови

BLV+ коров, которые реагировали с соникатом изолята из брыжеечного лимфоузла (0,45 и 0,22 μm) в разведениях 1:400–1:1600 (рисунок 12). Необходимо отметить, что этот же соникат одновременно давал положительные реакции с сыворотками волов, сенсibilизированных инактивированной бактериальной массой *M. bovis* и *M. avium*, но в разведении 1:200 (рисунок 12).



а – гомогенат бронхиального лимфатического узла, деконтаминированный щавелевой кислотой; б – гомогенат селезенки, пропущенный через фильтры 0,45 μm и 0,22 μm; Kinyoun, 10×100

Рисунок 6. – Первичный рост в посевах на среде MycCel DW



а – гомогенат бронхиального лимфатического узла, деконтаминированный щавелевой кислотой; б – гомогенат селезенки, деконтаминированный щавелевой кислотой; с – гомогенат брыжеечного лимфатического узла, пропущенный через фильтры 0,45 μm и 0,22 μm; Kinyoun, 10×100

Рисунок 7. – Рост в посевах на среде MycCel DW

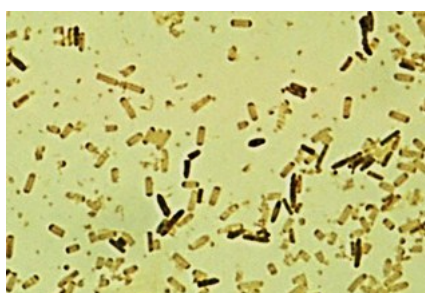
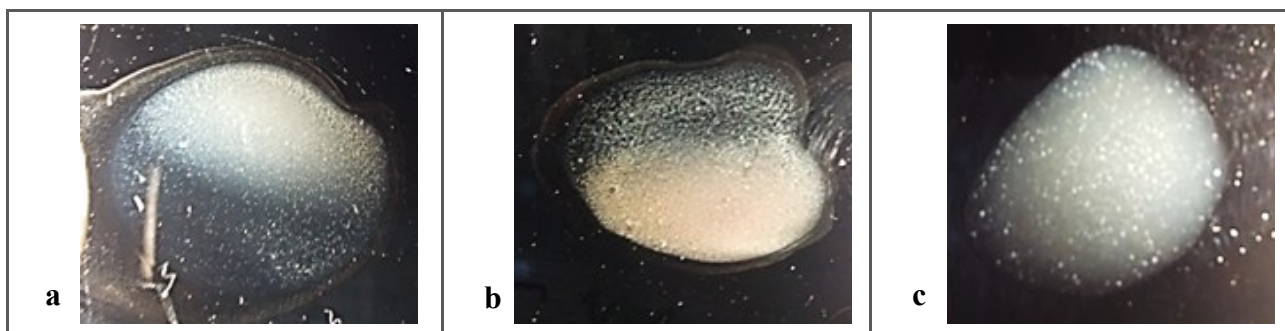
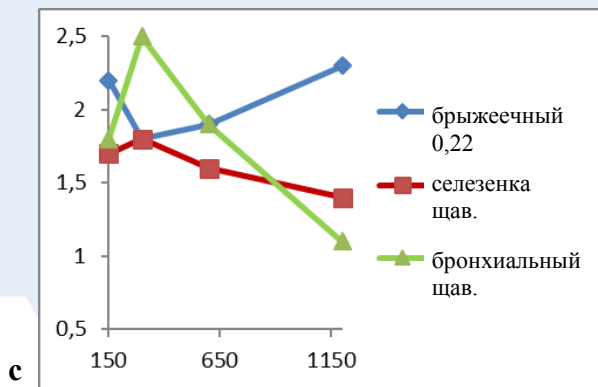
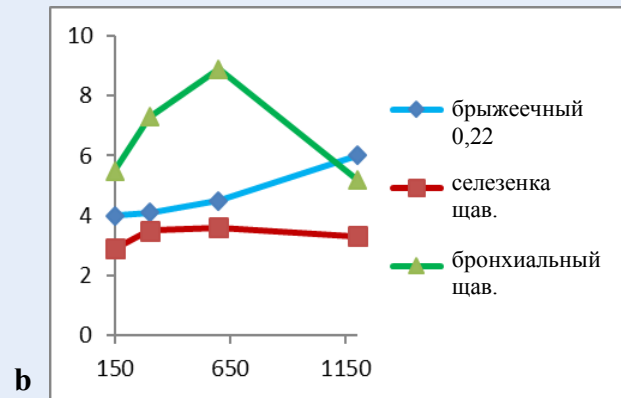
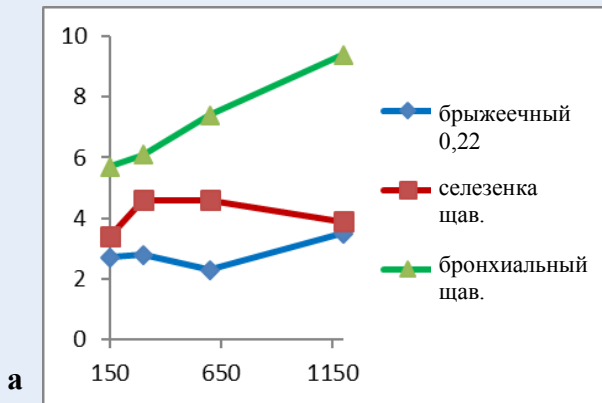


Рисунок 8. – Изолят из гомогената селезенки, деконтаминированного щавелевой кислотой. ДИП-окраска с использованием Ig из а/с к *M. bovis*; 10×100



а – с антисывороткой к *M. bovis* 8; б – к CWD *M. tuberculosis*;
с – с сывороткой коровы, больной лейкозом

Рисунок 9. – РА изолята из бронхиального лимфоузла



а – с антисывороткой к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv; б – к CWD МБТ FLK-BLV 0.22 HC; в – к FLK-BLV
Рисунок 10. – ИФА соникатов изолятов из тканей.
 Ось абсцисс – разведения антисывороток, ось ординат – превышение ОП с антисыворотками в сравнении с негативной сывороткой (Sample/negative)



1 – CWD МБТ из FLK-BLV, пропущенной через фильтр 0,22 μm; 2 – брыжеечный лимфоузел (0.45 и 0.22 μm); 3 – брыжеечный лимфоузел (щав.); 4 – селезенка (щав.); 5 и 6 – бронхиальный лимфоузел (рост в разных пробирках). В агарозе антисыворотка к CWD МБТ из FLK-BLV, пропущенной через фильтр 0,22 μm (50 мкл/мл). Стрелки – сливающиеся преципитаты общих антигенов

Рисунок 11. – РИЭФ соникатов изолятов из тканей козы

В иммуноблоттинге с сывороткой крови коровы, больной лейкозом, почти все фракции соникатов изолятов из лимфатического узла и селезенки, реагировавшие с антителами, соответствовали по молекулярной массе и подвижности фракциям антигена FLK-BLV (рисунок 12).

Изоляты из тканей козы оказались резистентными к антибиотикам, влияющим на клеточную стенку и проницаемость мембран (пенициллин, цефалоспо-

рины, ванкомицин), а также к аминогликозидам, ингибирующим синтез белков (таблица 3). Другие антибиотики, действующие на синтез белков (тетрациклин, доксициклин, фторхинолоны, линезолид), достаточно эффективно подавляли рост изолятов. Необходимо отметить, что профиль чувствительности изолятов к антибиотикам был похож на профиль экспериментально полученного штамма CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv (таблица 3).

Таблица 3. – Чувствительность CWD МБТ, выделенных из лимфатического узла и селезенки, к антибиотикам (диаметр зон задержки роста в диффузионном тесте в мм)

Изоляты	Бронхиальный лимфоузел (щав.)	Селезенка 0,22	CWD <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv (контроль)
Penicillin	10	8	0
Streptomycin	16	16	22
Kanamycin	15	15	21
Neomicin	18	15	24
Azitromicin	19	27	22
Tetracyclin	19	20	23
Doxiciclin	19	33	23
Linezolid	25	33	29
Levofloxacin	32	33	37
Norfloxacin	28	29	28
Ciprofloxacin	31	30	35
Ofloxacin	32	31	29
Cefazolin	12	12	12
Cefepime	15	16	16
Vancomycin	15	14	16

Примечание – зоны задержки роста 18 мм и меньше выделены красным цветом – результат, указывающий на резистентность изолята

Резкая гиперплазия лимфатических узлов и селезенки у павшей козы была характерна для лимфосаркомы. Диагноз подтверждался положительной РИД сыворотки крови с антигеном FLK-BLV, но в гомогенатах лимфатических узлов и селезенки обнаружена ДНК МБТ. Это явно не было

артефактом, так как в клетках лимфатических узлов и селезенки были найдены и антигены МБТ. Необходимо отметить, что геном МБТ ранее также находили в культурах лейкозных клеток человека «Kasumi» и «Jurkat» [18].

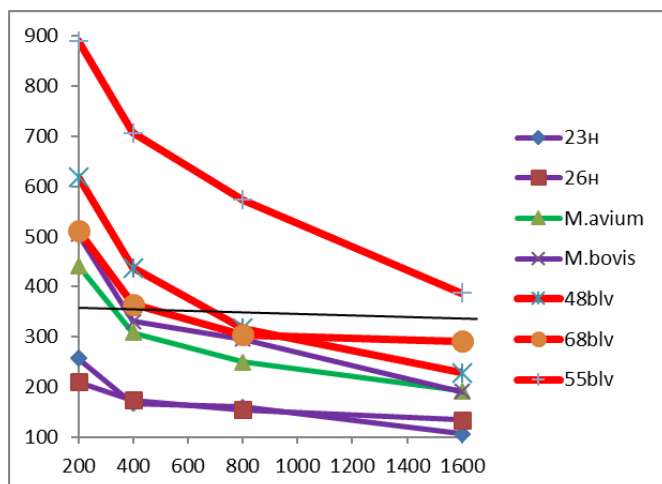
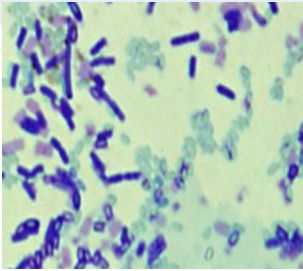
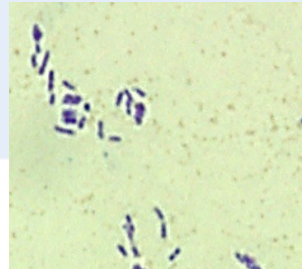
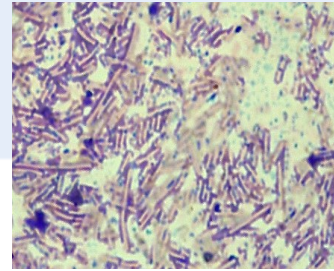

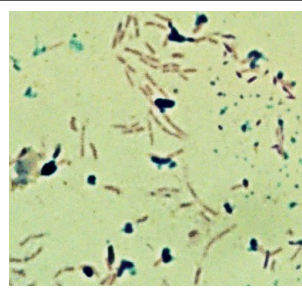
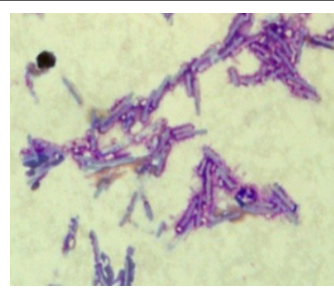
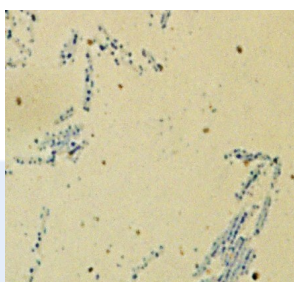
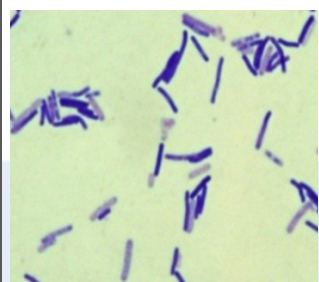
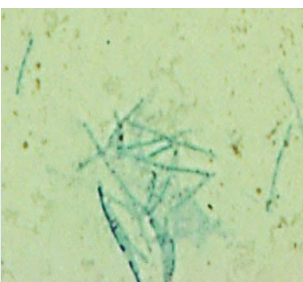



Рисунок 12. – ИФА сониката изолята из брыжеечного лимфоузла (0.45 и 0.22 μm) с 2 сыворотками крови здоровых коров (23н, 26н), волов, сенсibilизированных бактериальной массой *M. avium* и *M. bovis*, 3 коров BLV+ (красные линии). Горизонтальная линия – cut off

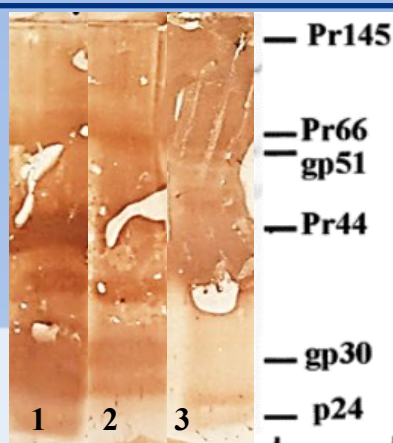
При посеве с применением стимулятора роста и специальной питательной среды из гомогенатов тканей выделены изоляты, которые по результатам ПЦР и фенотипическим свойствам были отнесены к не-кислотоустойчивым МБТ. Изоляты были выделены после деконтаминации гомогенатов тканей 6%-ной щавелевой кислотой, а также после стерилизующей фильтрации, что характерно именно для микобактерий. У изолятов были общие антигены с типичными и CWD МБТ. У них наблюдался характерный для CWD МБТ полиморфизм [13]. Профили чувствительности изолятов

к антибиотикам и экспериментально полученного штамма CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv не различались. Они были резистентны к антибиотикам, влияющим на синтез клеточной стенки. Еще в XX веке было установлено, что характерной чертой CWD МБТ и изолятов из опухолей, в частности, является резистентность к пенициллину [19]. Антибиотики резко усиливали полиморфизм изолятов и в ряде случаев повышали их кислотоустойчивость, что проявлялось красной окантовкой и коричневатой окраской клеток (таблица 4).

Таблица 4. – Изменение морфологии изолята из бронхиального узла козы при контакте с антибиотиками в диффузионном тесте; Kinyoun 10×100

Исходная морфология	Пенициллин – 10	Канамицин – 15	
			
Стрептомицин – 16	Цефазолин – 12	Азитромицин – 19	
			
Доксициклин – 19	Линезолид – 25	Левифлоксацин – 32	Офлоксацин – 32
			

Примечание – числами указан диаметр зоны задержки роста в мм



1 – бронхиальный лимфоузел; 2 – селезенка (щав.),
3 – аг FLK-BLV. 12 % ПААГ-ДСН

Рисунок 13. – Иммуноблоттинг с сывороткой крови коровы, больной лейкозом (1:20), соникатов изолятов

При микроскопии типичные МБТ не обнаружены, только в селезенке были немногочисленные гранулы, похожие на зерна Муха, которые, однако, было трудно идентифицировать. При бактериологическом посеве типичных микобактерий не выделено. То есть у павшего животного не было активной туберкулезной инфекции.

Полученные результаты указывали на то, что у павшей козы была латентная туберкулезная инфекция, связанная с персистенцией МБТ с измененными свойствами [20]. Вместе с тем выделение CWD МБТ не означает, что инфекционный агент персистировал именно в этой форме. Особенностью посева с использованием стимуляторов роста (ВКГ, МусСел DW, Влакон) является то, что независимо от того, в какой форме в патологическом материале находятся МБТ, на специальных питательных средах (ВКГ, Мус Сел DW) [16, 17, 21] вырастают именно CWD МБТ. Это отражает одну из линий стратегии выживания МБТ – появление CWD МБТ, способных в 20–30 раз быстрее размножаться, причем на простых средах и в широком температурном диапазоне [22].

Выделение CWD МБТ из патологического материала, подвергнутого стерилизующей фильтрации, указывает на то, что в тканях находились вирусоподобные формы МБТ. Такие же CWD МБТ были выделены и из проб, деконтаминированных щавелевой кислотой с использованием центрифугирования (2000 g). С одной стороны, это позволяет предположить, что инфекционный агент по массе сопоставим с бактериальными формами, но, скорее

всего, рост давали именно ультрамелкие формы [23], находившиеся в клетках тканей, осаждавшихся при центрифугировании. Независимо от того, были ли изоляты выделены из фильтрованных или деконтаминированных кислотой проб, они принципиально не отличались по морфологии и антигенному составу. Это также подтверждало, что инфекционный агент по размерам сопоставим с вирусами, но, в отличие от них, выдерживал обработку щавелевой кислотой.

Так как в тканях не обнаружено типичных и CWD МБТ, но в клетках найдены их антигены, можно предположить, что инфекционный агент персистировал в клетках и, судя по ДИП-окраске, проникал в их ядра. При исследовании связи туберкулезной инфекции и рака легких также была установлена локализация инфекционного агента в ядрах, где были обнаружены включения, похожие на L-формы МБТ и фрагменты их генома [24, 25].

Безусловно, обнаружение генома и антигенов МБТ, выделение CWD МБТ из лимфосаркоматозных тканей еще не доказывает связь туберкулезной инфекции с онкогенезом. Оба процесса могут протекать независимо друг от друга. Однако антигенные свойства изолятов указывают на то, что связь все-таки есть: соникаты изолятов из лимфосаркоматозных тканей реагировали с антисывороткой к культуральной жидкости клеток почки эмбриона овцы, инфицированных вирусом бычьего лейкоза (антиген FLK-BLV для диагностики лейкоза крупного рогатого скота в РИД). Антисыворотка к FLK-BLV, кроме

антител к антигенам BLV, содержала антитела к антигенам почки овцы, сывороткам крови эмбрионов коров и лошади, которые добавляют в ростовую среду. Было установлено, что соникаты типичных и CWD МБТ не реагировали с антисыворотками к указанным тканевым антигенам. Следовательно, позитивные результаты в ИФА соникатов изолятов CWD МБТ из лимфосаркоматозных тканей с антисывороткой к FLK-BLV могли быть только за счет связывания с антителами к антигенам BLV. То есть у них были такие же антигены, как и у BLV. Именно это было подтверждено и в иммуноблоттинге с сывороткой крови коровы, больной лейкозом (рисунок 13). Косвенным подтверждением антигенного родства CWD МБТ и BLV также было обнаружение одинаковых по специфичности антител в положительной сыворотке крови для диагностики лейкоза в РИД и в антисыворотке к CWD *M. tuberculosis H₃₇Rv* (рисунок 2), а также положительных реакций в ИФА с лейкозными сыворотками коров при использовании в качестве антигенов соникатов изолятов из лимфосаркоматозных тканей (рисунок 12). Интересно, что в последнем случае соникаты также реагировали с сыворотками животных, экспериментально сенсibilизированных микобактериями. То есть в антигенном спектре изолятов присутствовали как антигены общие с типичными и CWD МБТ, так и с BLV. Полученные результаты указывают на то, что в геноме изолятов CWD МБТ из лимфосаркоматозных тканей должны быть гены, кодирующие такие же протеины, как и у BLV.

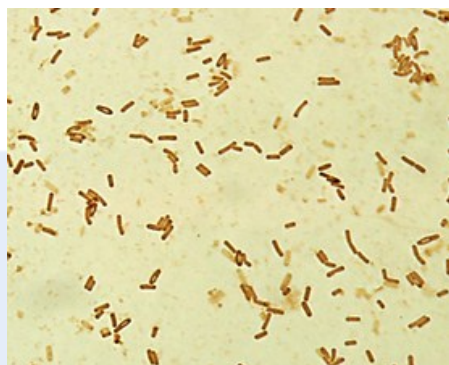



Рисунок 14. – Изолят CWD МБТ из крови туберкулинпозитивной козы (исследование 2016 г.) из стада, в котором в 2015 г. родилась коза, впоследствии павшая от лимфосаркомы

В конце XIX века J. Ferran, впервые получивший НКУ МБТ, выдвинул гипотезу о том, что типичные патогенные МБТ представляют лишь незначительную часть популяции, а ее большая часть существует в виде НКУ форм, обитающих и размножающихся во внешней среде [26]. Спорная гипотеза до сих пор не опровергнута. Исходя из полученных данных [12, 13, 18], можно также предположить, что типичные патогенные МБТ – инвазивная форма, представляющая лишь часть популяции, а ее большая часть – персистирующие измененные формы, которые в определенных условиях могут способствовать возникновению заболеваний, которые не связывают с туберкулезной инфекцией. В известной мере это отражает и рассматриваемый случай. Когда козе, впоследствии павшей, было около 1 года, в стаде, в котором она находилась, было обнаружено несколько особей, реагировавших на туберкулин. Они не имели при аутопсии туберкулезных изменений, хотя из крови были выделены CWD МБТ (рисунок 14). Больше туберкулинпозитивных животных не выявляли, но скрытая инфекция явно осталась в стаде. Изоляты из тканей павшей козы были удивительно похожи на изоляты от туберкулинпозитивной особи. В таблице 4 приводятся одинаковые характерные формы, присутствующие на рисунках 8 и 14. Самое интересное, что такие же формы ранее были обнаружены в мазках изолятов из лимфатического узла коровы BLV+ и из FLK-BLV (таблица 5) [13]. То есть подтверждался постулат Коха о том, этиологический агент должен выделяться при разных случаях заболевания.

Таблица 5. – Характерные формы клеток в мазках изолятов CWD МБТ (ДИП-окраска с использованием Ig из антисыворотки к *M. bovis* 8)

1	2	3	4	Характеристика
				полностью окрашенные в коричневый цвет палочки
				биполярные «пустые» палочковидные формы
				колбовидные формы
				короткие «обрезанные» палочковидные формы с одним «зерном»

Примечания:

- 1 – из крови туберкулинположительной козы из стада, в котором родилась коза, павшая впоследствии от лимфосаркомы (рисунок 14);
- 2 – из селезенки павшей от лимфосаркомы козы (рисунок 8);
- 3 – из лимфатического узла коровы BLV+ [13];
- 4 – из FLK-BLV [13]

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сейчас уже установлено, что МБТ, попадая в организм, могут не вызывать классический туберкулез [20], а персистировать в виде dormantных нечувствительных, полностью лишенных клеточной стенки спороподобных и вирусоподобных форм. Каждая из этих форм повышает вероятность выживания вида. В частности, длительная персистенция и уход от конт-

роля иммунной системы, вероятно, может обеспечиваться за счет интеграции вирусоподобных форм, подобно ретровирусам, в ядра и в геном хозяина [24, 25]. При этом, учитывая такое ранее неизвестное свойство МБТ и их вирусоподобных форм, как «бессмертность» [23], вероятно, в определенных условиях они могут придавать его клеткам и инициировать онкогенез, что было доказано и в эксперименте [27].

ЛИТЕРАТУРА

1. US Department of Agriculture Animal and Plant Health Services, Veterinary Services, Center for Epidemiology and Animal Health. Info sheet : bovine leukosis virus (BLV) on U.S. dairy operations. – 2007.
2. Schwartz, I. Pathobiology of bovine leukemia virus / I. Schwartz, D. Lévy // *Veterinary Research*. – 1994. – Vol. 25. – № 6. – P. 521–536.
3. Mechanisms of leukemogenesis induced by bovine leukemia virus: prospects for novel anti-retroviral therapies in human / N. Gillet [et al.] // *Retrovirology*. – 2007. – Vol. 4. – № 1. – P. 18.
4. BurrIDGE, M. J. The zoonotic potential of bovine leukemia virus / M. J. BurrIDGE // *Veterinary Research Communications*. – 1981. – Vol. 5. – № 1. – P. 117–126.
5. Choi, K. Y. Relative sensitivity and specificity of agar gel immunodiffusion, enzyme immuno-sorbent assay, and immunoblotting for detection of anti-bovine leukemia virus antibodies in cattle / K. Y. Choi, R. B. Liu, G. C. Buehring // *Journal of Virological Methods*. – 2002. – Vol. 104. – № 1. – P. 33–39.
6. Buehring, G. C. Humans Have Antibodies Reactive with Bovine Leukemia Virus / G. C. Buehring, S. M. Philpott, K. Y. Choi // *AIDS Research and Human Retroviruses*. – 2003. – Vol. 19. – № 12. – P. 1105–1113.

7. Bovine Leukemia Virus DNA in Human Breast Tissue / G. C. Buehring [et al.] // *Emerging Infectious Diseases*. – 2014. – Vol. 20. – № 5. – P. 772–782.
8. Exposure to Bovine Leukemia Virus Is Associated with Breast Cancer: A Case-Control Study / G. C. Buehring [et al.] // *PloS One*. – 2015. – Vol. 10. – № 9. – P. e0134304.
9. Bovine leukemia virus linked to breast cancer in Australian women and identified before breast cancer development / G. C. Buehring [et al.] // *PloS One*. – 2017. – Vol. 12. – № 6. – P. e0179367.
10. Gillet, N. A. Whole genome sequencing of 51 breast cancers reveals that tumors are devoid of bovine leukemia virus DNA / N. A. Gillet, L. Willems // *Retrovirology*. – 2016. – Vol. 13. – № 1. – P. 75.
11. Livingston V. Cancer : a new breakthrough / V. Livingston, V. Wuerthele-Caspe. – Los Angeles : Nash Publishing, 1972. – 269 p.
12. Further evidence for cancer as cell-wall-deficient mycobacterial disease / A. P. Lysenko [et al.] // *Journal of Molecular Pathological Epidemiology*. – 2016. – Vol. 1. – № 1. – P. 1–12.
13. Вирус бычьего лейкоза – вирусоподобная форма микобактерий туберкулеза? / А. П. Лысенко [и др.] // *Экология и животный мир*. – 2019. – № 1. – С. 15–24.
14. Goat Lymphosarcoma From Bovine Leukemia Virus / C. Olson [et al.] // *JNCI : Journal of the National Cancer Institute*. – 1981. – Vol. 67. – № 3. – P. 671–675.
15. Выявление микобактерий туберкулеза в тканях с помощью дифференцирующей иммунопероксидазной окраски / А. П. Лысенко [и др.] // *Туберкулез и болезни легких*. – 2014. – № 10. – С. 55–58.
16. Власенко, В. В. Туберкулез в фокусе проблем современности / В. В. Власенко. – Винница : Наука, 1998. – 350 с.
17. 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.*
18. Вероятная связь миелоидного и лимфобластного лейкоза с туберкулезной инфекцией / А. П. Лысенко [и др.] // *Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария*. – 2020. – № 1. – С. 55–58.
19. Diller, I. Cytological studies of relationships between microorganisms isolated from tumor tissue and normal and malignant cells of the host / I. Diller // *Cancer Research*. – 1952. – № 12. – P. 257.
20. Дорожкова, И. Р. Скрыто протекающая туберкулезная инфекция / И. Р. Дорожкова, З. С. Земскова. – М. : Медицина, 1984. – 222 с.
21. Живильне середовище «Влакон» для експрес-діагностики туберкулезу / В. В. Власенко [и др.] // *Науковий вісник Львівської Національної академії ветеринарної медицини ім. С. З. Гжицького*. – 2005. – Т. 7. – № 1. – С. 56–60.
22. Markova N. Cell Wall Deficiency in Mycobacteria : Latency and Persistence / N. Markova // *Understanding Tuberculosis – Deciphering the Secret Life of the Bacilli* / ed. P.-J. Cardona. – InTech, 2012. – *Cell Wall Deficiency in Mycobacteria*. – P. 1–35.
23. Микобактерии туберкулеза при термическом воздействии образуют защитные формы, проходящие через ультрафильтры и восстанавливающие жизнеспособность в виде CWD форм / А. П. Лысенко [и др.] // *Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария*. – 2019. – № 1. – С. 33–45.
24. Tian, Y. Detection of Mycobacterium tuberculosis L-forms and MPB64 gene in breast cancer tissues / Y. Tian, X. K. Cui, T. Hao // *J. of Practical Medicine*. – 2013. – № 15. – P. 45–46.
25. Clinical end-points associated with Mycobacterium tuberculosis and lung cancer : implications into host-pathogen interaction and coevolution / Y. Tian [et al.] // *BioMed Research International*. – 2015. – Vol. 2015. – P. 1–9.
26. Ferran, J. La nueva bacteriologia de la tuberculosis : Congreso de la Tuberculosis / J. Ferran. – Valencia : Litografia de Jose Ortega, 1912. – 51 p.
27. Lung carcinogenesis induced by chronic tuberculosis infection: the experimental model and genetic control / A. Nalbandian [et al.] // *Oncogene*. – 2009. – Vol. 28. – № 17. – P. 1928–1938.