

Лысенко А.П., доктор ветеринарных наук, профессор¹

Высоцкий А.Э., кандидат ветеринарных наук, доцент²

Кучвальский М.В., аспирант³

Притыченко А.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент¹

Красникова Е.Л., научный сотрудник¹

Притыченко А.В., кандидат ветеринарных наук, доцент⁴

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

²Научно-исследовательский институт «БиоФарм», г. Минск

³Белорусский государственный университет, г. Минск

⁴УО «Витебская ордена «Знак Почёта» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск

ЛАТЕНТНАЯ ТУБЕРКУЛЕЗНАЯ ИНФЕКЦИЯ У НОВОРОЖДЁННЫХ ТЕЛЯТ ТУБЕРКУЛИННЕГАТИВНЫХ КОРОВ

Резюме

При посеве на питательную среду MycCel DW деконтаминированных 6%-ной щавелевой кислотой гомогенатов смесей тканей телят 7–14-дневного возраста, инкубированных в стимуляторе роста ВКГ, в 77,8 % случаев удалось выделить некислоустойчивые и частично кислотоустойчивые микобактерии туберкулёза (МБТ) с дефектной клеточной стенкой, являющиеся маркером туберкулёзной инфекции. Так как телята были 7–14-дневного возраста, скорее всего, имело место трансплацентарная передача инфекции и персистенция МБТ в изменённых формах, незаметных для рутинных методов диагностики. Это подтверждает риск появления в стадах туберкулин-положительных особей и рецидивов болезни без заноса инфекции, а также вызывает необходимость дальнейшего совершенствования противотуберкулёзных мероприятий и использование методов, выявляющих изменённые формы МБТ для формирования неинфицированных стад.

Ключевые слова: микобактерии туберкулёза с дефектной клеточной стенкой, CWD формы микобактерий, телята, диагностика туберкулёза, латентная туберкулёзная инфекция.

Summary

When sowing 6% oxalic acid decontaminated homogenates of 7-14-day-old calf tissue mixtures incubated in a growth stimulant VKG on MycCel DW nutrient medium, non-acid-fast and partially acid-fast cell wall deficient mycobacteria tuberculosis (CWD MBT) which are a marker of tuberculosis infection were isolated in 77,8% of cases. Since the calves were 3-14 days old, there was most likely a transplacental transmission of infection and the persistence of MBT in changed forms that were invisible to routine diagnostic methods. This confirms the risk of tuberculin-positive individuals appearing in herds and relapses of the disease without infection, and also calls for further improvement of anti-tuberculosis measures and the use of methods that detect CWD MBT for the formation of uninfected herds.

Keywords: Mycobacterium tuberculosis with a defective cell wall, CWD forms of mycobacteria, calves, diagnosis of tuberculosis, latent tuberculosis infection.

Поступила в редакцию 19.09.2022 г.

ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на огромный массив сведений о микобактериях туберкулёза (МБТ), проблема латентной (скрытой) туберкулёзной инфекции (ЛТИ) нуждается в дальнейшем изучении. Представления о ЛТИ противоречивы. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) определяет её как состояние стойкого иммунного ответа, вызванного присутствием в организме антигенов *Mycobacterium tuberculosis* без клинических проявлений активной формы болезни [1]. Но остаётся неясным, что подразу-

меваётся под антигенами *Mycobacterium tuberculosis*, так как до сих пор преобладают представления, признающие этиологическими агентами только микроорганизмы с классическими признаками, описанными на заре микробиологии [2]. В то же время, уже достоверно известно, что МБТ могут существовать в виде форм с дефектной клеточной стенкой – cell wall deficient (CWD-, L-), ультрамелких и фильтрующихся, а также защитных форм [3, 4, 5, 6, 7].

В определении ВОЗ вызывает вопрос

и стойкость иммунного ответа, так как при ЛТИ не всегда развивается реакция на туберкулин. Даже при систематических аллергических исследованиях крупного рогатого скота не удаётся выявить всех инфицированных животных, особенно тех, у которых персистируют изменённые МБТ [8, 9], так как трансформация МБТ в L- и CWD- формы – это, в известной степени, уход от контроля иммунной системы [3, 4].

Неоднозначны и представления об опасности ЛТИ. Вероятность развития активной формы болезни у людей с ЛТИ оценивается в 5–10 % [1], при этом не учитывается, что персистенция МБТ повышает риск развития сахарного диабета, болезней сердечнососудистой системы и опухолей [10, 11, 12]. Считается, что люди с ЛТИ не заразны [1], но этот вывод сделан на основе рутинных методов диагностики, не выявляющих изменённые формы МБТ. Тем не менее, уже достоверно известно о роли фильтрующихся форм, в частности, в трансплацентарной передаче инфекции [13].

Не ясен масштаб распространения ЛТИ. ВОЗ считает, что «...треть населения планеты инфицирована *M. tuberculosis*» [1]. Однако эта цифра явно не учитывает инфицированность изменёнными формами МБТ, так как такие исследования не проводились. В ветеринарной медицине существует представление, что крупный рогатый скот с ЛТИ ещё может оставаться в стаде после оздоровительных мероприятий [8, 9], но в благополучных стадах животных с ЛТИ не должно быть. Тем не менее рецидивы болезни отмечаются даже в странах, считающихся оздоровленными от туберкулёза [14].

Предполагается, что у животных рецидивы туберкулёза возникают при снижении резистентности из-за реверсии L-форм МБТ в классическую форму [8, 9]. Однако явных доказательств этого не получено, процесс может быть гораздо сложнее, так как *in vitro* получить реверсию трудно [4], а *in vivo* переход стабильных L-форм в типичные МБТ происходит только после многократных (иногда не менее 13) пассажей на морских свинках [2].

Для контроля эпизоотической ситуации в стадах предлагается бактериологиче-

ский надзор путём посева патологического материала от туберкулинположительных особей на модифицированную питательную среду Школьниковой для выделения L-форм МБТ [8, 9]. Однако метод не рекомендован для прижизненной диагностики, трудоемок, низкоспецифичен из-за щадящих режимов деконтаминации и позволяет выделять преимущественно осмосзависимые формы МБТ [2, 8, 9]. Этим недостатком лишен метод инкубации биологического материала (в том числе взятого при жизни) в специальных стимуляторах роста (ВКГ, МусСел DW) с последующим посевом на соответствующую питательную среду (ВКГ, ВЛАКОН, МусСел DW) [15, 16, 17]. При этом независимо от того, в какой форме в пробе присутствуют МБТ (типичные КУ, вирусоподобные фильтрующиеся, CWD- или L-формы), на питательной среде через 1–10 суток вырастают неокислотоустойчивые (НКУ) CWD МБТ, что отражает одно из направлений стратегии выживания МБТ. Метод успешно используется для прижизненной диагностики и выяснения причин реакций на туберкулин путем посева крови и молока реагирующих на туберкулин коров [16, 17]. Вместе с тем выявление маркеров туберкулёзной инфекции в молоке коров длительно благополучных стад [18, 19] вызывает необходимость изучения инфицированности туберкулинотрицательных животных. Наибольший интерес представляют новорождённые телята, так как их статус в большей степени связан с состоянием здоровья матерей, а не инфицированием из внешней среды.

Цель работы – выявление бактериологических маркеров туберкулёзной инфекции в случайно отобранном патологическом материале новорождённых телят, родившихся от туберкулинотрицательных коров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали патологический материал (гомогенат фрагментов печени, почек, легких, сердца) от 9 телят 7–14-дневного возраста, павших от причин, не связанных с заболеванием туберкулёзом и родившихся от туберкулиннегативных коров 4 благополучных по туберкулёзу хозяйств.

Препараты-отпечатки тканей и препараты-мазки изолятов окрашивали по Kinyoun. Микроскопию проводили на Olympus B51X.

Для посева ткани растирали в ступках, добавляя 6%-ную щавелевую кислоту. Гомогенаты центрифугировали при 3600 g 10 мин. К осадкам добавляли по 5 мл стимулятора роста ВКГ («Hansa») [15], смеси выдерживали 24 ч при температуре 37 °С и высевали на среду МусСел DW [16] (по 2 пробирки). Посевы инкубировали при температуре 37 °С. При отсутствии роста через 1–2 суток проводили «слепые» пассажи.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) с электрофоретической детекцией. Изоляты (0,2–0,5 мг/мл) прогревали в лизирующем буфере (5 мин, 95 °С), ДНК выделяли на колонках с сорбентом (ИБОХ НАНБ).

Аmplification проводили на CFX1000 Thermal Cycler (BioRad) с праймерами, синтезированными в ОДО «Праймтех» (Минск):

Режим амплификации: первичная денатурация – 95 °С, 10'; затем 40 циклов – денатурация 94 °С, 30'; отжиг 54 °С, 90'; финальная элонгация 72 °С, 10'.

ДНК части изолятов исследовали в ПЦР с праймерами 16s RNA, MPB 64, MPB 70 («Праймтех») и электрофоретической детекцией продуктов амплификации.

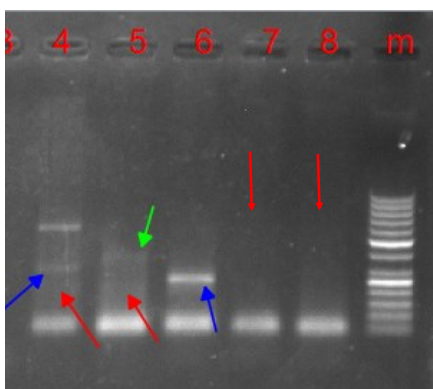
Полипептидный состав изучали в электрофорезе в 10 % ПААГ-ДСН по Laemmli (1970), используя лизат отмытой

бактериальной массы изолятов, полученный прогреванием 7 мин при температуре 98 °С в буферном растворе для нанесения образцов (4x).

Антигенный состав изолятов, изучали в реакции иммунодиффузии (РИД) и в ракетном иммуноэлектрофорезе (РИЭФ) с антисыворотками к СWD МБТ «Br 2/17» [20], к СWD МБТ «Is Hela 3 kD» [21] и к типичному штамму *M. avium* 1603. Соникаты бактериальной массы получали дезинтеграцией на Bandelin Sonopuls 2400 (8x, 4 цикла по 5 мин). Контролями служили соникаты экспериментально полученных штаммов СWD *M. tuberculosis* H37Rv и СWD *M. bovis* 8d, СWD МБТ Is «Hela is 6» [21] и *M. avium* 1603.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При микроскопии препаратов-мазков и препаратов-отпечатков тканей, окрашенных по Kinyoun, ни в одном случае не обнаружено КУ палочковидных форм (МБТ). Тем не менее, из 9 посеянных проб 7 проб (77,8 %) дали рост колоний, которые в 4 случаях (57,1 %) появились в исходном посеве через 3–6 дней, в 2 случаях (28,6 %) – в I «слепом» пересеве и в 1 случае (14,3 %) – во II «слепом» пересеве. Изоляты представляли собой НКУ и частично кислотоустойчивые (ЧКУ) полиморфные палочковидные формы типичные для СWD МБТ, что и подтвердили результаты ПЦР (таблица 1, рисунок 1).

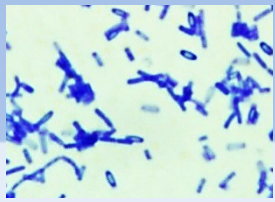
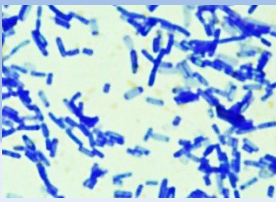
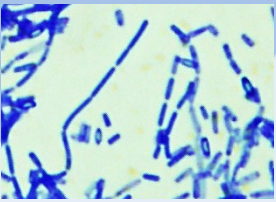
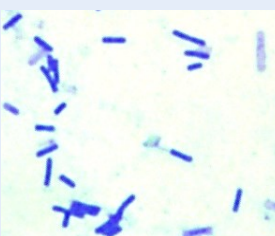
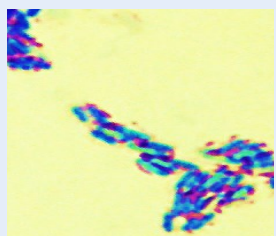
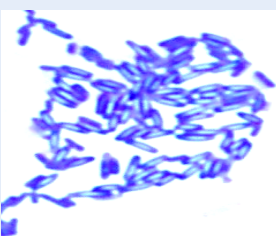
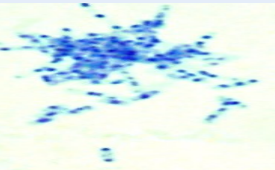
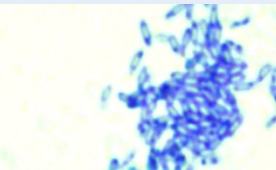

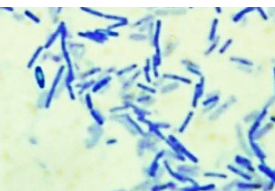
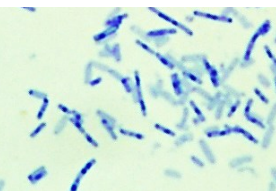
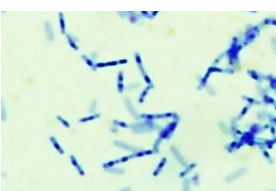
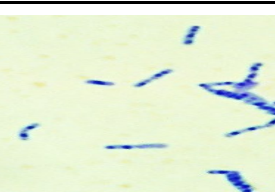
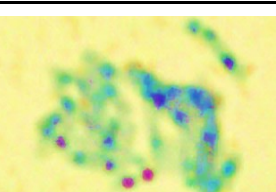
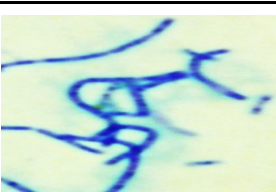
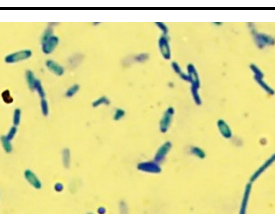
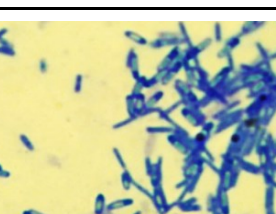
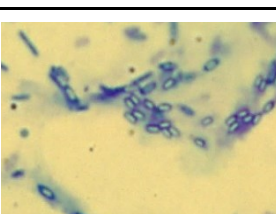
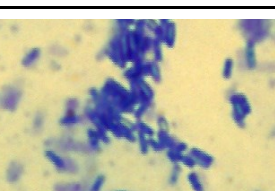
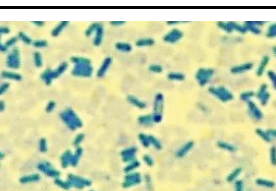
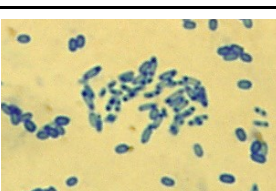


- 4 – № 9/2 пн (MPB 70+, MPB 64+);
- 5 – № 9/1 пн (16s RNA+, MPB 64±);
- 6 – № 8 мо (MPB 64+);
- 7 – № 725 мо (MPB 64±);
- 8 – № 1 мо (MPB 64±)

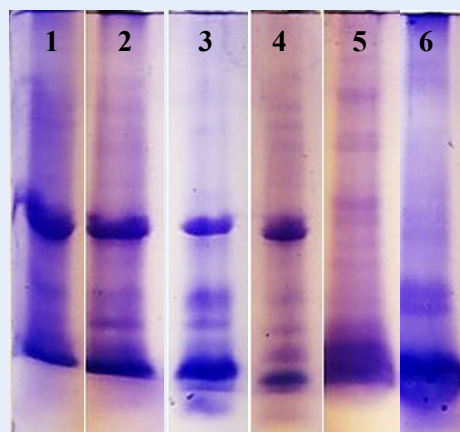
Рисунок 1. – Результат ПЦР с ДНК изолятов

ЭПИЗООТОЛОГИЯ

Таблица 1. – Посев патологического материала телят, деконтаминированного 6%-й щавелевой кислотой на среду МусСел DW и идентификации изолятов в ПЦР

№, возраст, ПЦР	Морфология изолятов и её изменение при пересевах		
Хозяйство «ПН»			
№ 9/2 пн, 14 дней, MPB 70+ , MPB 64±			
№ 9/1 пн, 14 дней, 16s RNA+ MPB 64±			
Хозяйство «МО»			
№ 8 мо, 14 дней, MPB 64+			
№ 725 мо, 10 дней, MPB 64±			
№ 1 мо, 14 дней, MPB 64±			
Хозяйство «СТ»			
«Ст 2», 7 дней, Is 6110+			
Хозяйство «ХО»			
«Хо 3», 14 дней, Is 6110+			

Несмотря на то, что по результатам ПЦР изоляты можно отнести к комплексу *tuberculosis-bovis*, они имели различающиеся полипептидные спектры (рисунок 2).

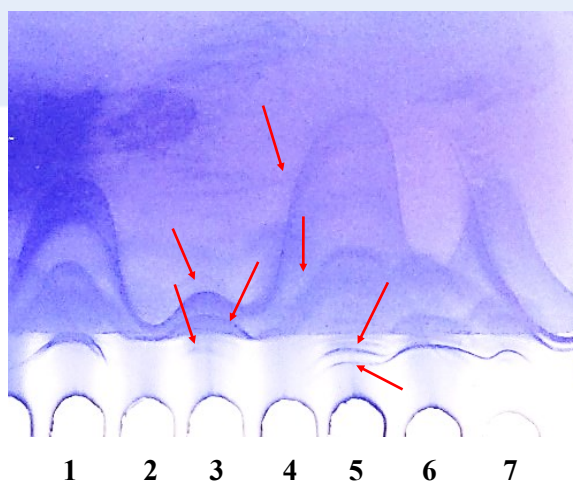


- 1 – CWD *M. bovis* 8 dm;
- 2 – изолят 9/2 пн (MPB 70+, MPB 64+);
- 3 – изолят № 725 мо (MPB 64±);
- 4 – изолят 1мо (MPB 64±);
- 5 – изолят 9/1 пн (16s RNA+, MPB 64±);
- 6 – изолят № 8 мо (MPB 64±)

Рисунок 2. – ЭФ в 12% ПААГ-ДСН

Если изоляты 9/2 пн (MPB 70+, MPB 64+), 725 мо (MPB 64±), 1 мо (MPB 64±) были по спектру очень близки к экспериментально полученному штамму CWD *M. bovis* 8 dm, то спектры изолятов 8 мо (MPB 64±) и 9/1 пн (16s RNA+, MPB 64±)

отличались. Тем не менее, по данным РИ-ЭФ, их антигенный состав практически не отличался от состава штамма CWD *M. bovis* 8 dm и был близок к составу CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv dm (рисунок 3).

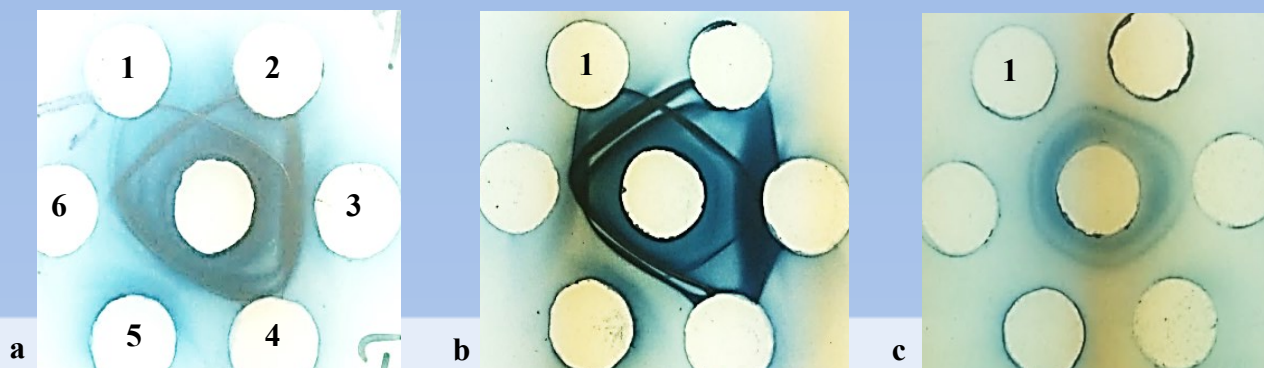


- 1 – CWD *M. bovis* 8 dm; 2 – изолята № 8 мо (1:4); 3 – изолята № 8 мо (1:1);
 - 4 – изолята № 9/1 пн; 5 – изолята № 725 мо; 6 – CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv dm;
 - 7 – CWD МБТ «Br 2/17» (стрелки преципитаты общих антигенов с CWD *M. bovis* 8 dm и CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv dm).
- геле агарозы антисыворотка к CWD МБТ «Br 2/17»

Рисунок 3. – РИЭФ соникатов

У изолятов «Ст 2» и «Хо 3» антигенный состав также не отличался от состава CWD *M. bovis* 8 dm и CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv dm. Варьировала только концентрация отдельных антигенов (рисунок 4). Ин-

тересно, что в РИД с антисывороткой к типичному штамму *M. avium* 1603 изоляты формировали плавно сливающиеся преципитаты.



а – к CWD МБТ «Br 2/17»; б – к CWD МБТ «Is Hela 3 kD»;
 с – к *M. avium* 1603 и соникатов: 1 - CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv, 2 – «Ст 2»;
 3 – CWD *M. bovis* 8d; 4 – «Хо 3»; 5 – CWD *M. bovis* Ne;
 6 – Is «Hela is 6» (расположение одинаковое)

Рисунок 4. – РИД антисывороток (в центре)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Из тканей 77,8 % обследованных новорождённых телят туберкулиннегативных коров пяти благополучных стад выделены CWD формы МБТ, являющиеся бактериологическим маркером туберкулёзной инфекции. Так как возраст телят составлял всего 7–14 дней, скорее всего, имела место трансплацентарная передача инфекции, причём в виде фильтрующихся вирусоподобных форм, как и при активном заболевании коров [22].

МБТ персистировали у телят явно в изменённой форме, что делало их незаметными для рутинных методов диагностики. С помощью специального метода посева с использованием стимулятора роста и соответствующей питательной среды были вы-

делены CWD-формы МБТ, несколько отличавшиеся друг от друга по полипептидному составу, что, возможно, связано с персистенцией у матерей МБТ бычьего или человеческого вида.

Обнаружение латентной туберкулёзной инфекции у телят в известной степени, объясняет обнаружение генома и CWD МБТ в молоке туберкулинотрицательных коров благополучных стад [18, 19] и подтверждает риск постоянного появления туберкулинпозитивных особей и даже рецидивов болезни без заноса инфекции. Это вызывает необходимость дальнейшего совершенствования противотуберкулёзных мероприятий и использования методов, выявляющих изменённые формы МБТ для формирования неинфицированных стад.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Latent tuberculosis infection: updated and consolidated guidelines for programmatic management [Electronic resource] : World Health Organization. – Mode of access: <https://apps.who.int/iris/handle/10665/260233>. – Date of access: 23.09.2022.*
2. Дорожкова, И. Р. *Скрыто протекающая туберкулёзная инфекция* / И. Р. Дорожкова, З. С. Земскова. – М. : Медицина, 1984. – 222 с.
3. Tefu, L. *Mycobacterium tuberculosis L-forms* / L. Tefu, H. Guliang // *Microbial Ecology in Health and Disease*. – 1999. – Vol. 10. – P. 129–133.
4. Mattman, L. *Cell Wall Deficient Forms – Stealth Pathogens* / L. Mattman. – 3rd ed. – CRC Press Boca Raton, 2001. – 416 p.
5. Гольшевская, В. И. *Роль ультрамелких форм микобактерий в патоморфозе туберкулёза* / В. И. Гольшевская // *Пробл. туберкулёза*. – 2003. – № 3. – С. 26–30.
6. Slavchev, G. *Stress-induced L-forms of M. bovis: challenge to survivability* / G. Slavchev, L. Michailova, N. Markova // *New Microbiologica*. – 2013. – Vol. 36. – P. 157–166.

7. Sporulation in mycobacteria / J. Ghosh [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. – 2009. – Vol. 106, № 26. – P. 10781–10786.
8. Хамзин, А. З. Роль L-форм микобактерий в эпизоотологии туберкулеза крупного рогатого скота и прогнозирование эпизоотической ситуации с помощью бактериологического надзора : дисс. ... канд. ветеринар. наук : 16.00.03 / А. З. Хамзин. – Казань, 2001. – 167 л.
9. Семенов, В. И. Латентная туберкулезная инфекция и ее роль в эпизоотологии туберкулеза крупного рогатого скота : дисс. ... канд. ветеринар. наук : 16.00.03 / В. И. Семенов. – Благовещенск, 2003. – 100 л.
10. Смурова, Т. Ф. Туберкулез и сахарный диабет / Т. Ф. Смурова, С. И. Ковалева. – М. : Медкнига, 2007. – 317 с.
11. Dooley, K. Tuberculosis and diabetes mellitus: convergence of two epidemics / K. Dooley, R. Chaisson // *Lancet Infect. Dis*. – 2009. – Vol. 9. – P. 737–746.
12. 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.
13. Mother-to-newborn transmission of mycobacterial L-forms and Vδ2 T-cell response in placentobiotome of BCG-vaccinated pregnant women / T. Dimova [et al.] // *Scientific Reports*. – 2017. – P. 1–11.
14. Humphrey, H. M. Bovine tuberculosis slaughter surveillance in the United States 2001–2010: assessment of its traceback investigation function / H. M. Humphrey, K. A. Orloski, F. J. Olea-Popelka // *BMC Veterinary Research*. – 2014. – Vol. 10, № 1. – P. 182.
15. Власенко, В. В. Туберкулез в фокусе проблем современности / В. В. Власенко. – Винница : Наука, 1998. – 350 с.
16. 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 н/Д : РостГМУ, 2014. – С. 176–198.
17. Лемши, А. П. Ранняя диагностика туберкулеза крупного рогатого скота на основе выявления бактериологического маркера инфекции : автореф. дисс. ... канд. ветеринар. наук : 16.00.03 / А. П. Лемши. – Минск, 2008. – 21 с.
18. Detection of *Mycobacteria* by Culture and DNA-Based Methods in Animal-Derived Food Products Purchased at Spanish Supermarkets / I. A. Sevilla [et al.] // *Frontiers in Microbiology*. – 2017. – Vol. 8. – P. 1030.
19. Обнаружение маркеров туберкулезной инфекции в ультрапастеризованном молоке, произведенном в разных странах / А. П. Лысенко [и др.] // *Экология и животный мир*. – 2021. – № 2. – С. 13–26.
20. CWD Tuberculosis Found in Spongiform Disease Formely Attributed to Prions: Its Implication towards Mad Cow Disease, Scrapie and Alzheimer's / A. P. Lysenko [et al.] // *Journal of Molecular Pathological Epidemiology*. – 2017. – Vol. 3, № 3. – P. 1–13.
21. Возможная роль туберкулезной инфекции в возникновении опухолей / А. П. Лысенко [и др.] // *Экология и животный мир*. – 2020. – № 1. – С. 53–69.
22. Трансплацентарная передача туберкулезной инфекции у коров, зараженных *Mycobacterium bovis* / А. П. Лысенко [и др.] // *Эпизоотология Иммунобиология Фармакология Санитария*. – 2021. – № 2. – С. 18–26.

ПРЕПАРАТ ВЕТЕРИНАРНЫЙ

ХРОМАРЦИН



ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ГИПОМИКРОЭЛЕМЕНТОЗОВ,
ПОВЫШЕНИЯ УСТОЙЧИВОСТИ ОРГАНИЗМА МОЛОДНЯКА
И ЕГО СОХРАННОСТИ

НАНОЧАСТИЦЫ ЖЕЛЕЗА, ЦИНКА, МАРГАНЦА

- улучшают работу сердечной мышцы;
- ускоряют ключевые биохимические процессы;
- повышают обмен веществ

