

УДК 619:616-078:637.12.05-619:616.5-002.525

Высоцкий А.Э., кандидат ветеринарных наук, доцент¹
 Лысенко, А.П., доктор ветеринарных наук, профессор¹
 Кучвальский М.В., научный сотрудник²
 Красникова Е.Л., старший научный сотрудник³
 Притыченко А.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент⁴
 Якобсон Е.И., магистрант⁵

¹УП «Научно-исследовательский институт “БиоФарм”», г. Минск, Республика Беларусь

²РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского», г. Минск, Республика Беларусь

³РУП «Институт мясо-молочной промышленности», г. Минск, Республика Беларусь

⁴РУП «Опытная научная станция по птицеводству», г. Заславль, Республика Беларусь

⁵ЗАО «Белорусская национальная биотехнологическая корпорация», Минская обл., Республика Беларусь

ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ МИКОБАКТЕРИЙ В ПОЧВЕ ПОСЛЕ ОБРАБОТКИ ГЛУТАРОВЫМ АЛЬДЕГИДОМ

Резюме

Инактивированные глутаровым альдегидом (ГА) клетки *Mycobacterium bovis* после внесения в стерильную увлажненную почву сохраняли кислотоустойчивость и визуально обнаруживались в течение 15 месяцев, хотя их количество уменьшалось за счет восстановления жизнеспособности в виде некислотоустойчивых (НКУ) форм с дефектной клеточной стенкой (CWD). К 21-му месяцу они превращались в малозаметные спороподобные формы. В течение 21-го месяца во всех случаях из контаминированной почвы удавалось выделить НКУ CWD *M. bovis* при посеве суспензии почвы с предварительной инкубацией в стимуляторе роста MycCel DW и без нее. Изоляты слабо индуцировали гиперчувствительность к туберкулинам, были резистентны к большинству природных антибиотиков, обладали повышенной устойчивостью к ГА и резистентностью к полигексаметиленгуанидину.

Предположено, что обнаруженный феномен приводит к формированию природных очагов инфекции и может играть роль в индукции реакций на туберкулин у крупного рогатого скота.

Ключевые слова: микобактерии туберкулеза, инактивация дезинфектантами, контаминированная почва, восстановление жизнеспособности, микобактерии с дефектной клеточной стенкой.

Summary

Mycobacterium bovis cells inactivated with glutaraldehyde (GA) after application to sterile moistened soil retained acid fastness and were visually detected for 15 months, although their number decreased due to the restoration of viability in the form of non-acid-fast (NAF) cell wall deficient (CWD) forms. By the 21st month, these forms turned into inconspicuous spore-like forms. For 21 months, in all cases, NAF CWD *M. bovis* was isolated from contaminated soil when sowing a soil suspension with pre-incubation in the MycCel DW growth stimulant and without it. The isolates weakly induced hypersensitivity to tuberculins, were resistant to most natural antibiotics, had increased resistance to GA and resistance to polyhexamethylene guanidine. It is assumed that the discovered phenomenon leads to the formation of natural foci of infection, and may play a role in the induction of reactions to tuberculin in cattle.

Keywords: *Mycobacterium bovis*, inactivation with disinfectants, contaminated soil, restoration of viability, non-acid-fast mycobacteria.

Поступила в редакцию 20.05.2024 г.

ВВЕДЕНИЕ

В 1897 г. Jaime Ferrán Clúa сообщил, что при пересевах микобактерий туберкулеза (МБТ) на питательной среде с уменьшающейся концентрацией пептона, глицерина и сахаров появляются некислотоустойчивые (НКУ) клетки, стадийно трансформирующиеся в разные по морфологии

непатогенные α -, β -, Δ -, ϵ -формы. На основании этого исследователь выдвинул гипотезу о том, что кислотоустойчивые (КУ) МБТ представляют лишь часть популяции вида, в основном они существуют в α - и β -формах, находящихся и размножающихся во внешней среде, но способны при попадании в организм трансформироваться в

патогенную γ -форму [1, 2, 3]. Поэтому Ferrán предположил, что туберкулез невозможно ликвидировать из-за неконтролируемого источника инфекции, а бороться с болезнью можно только вакцинацией. Для этого он разработал вакцину из смеси α - и ϵ -форм МБТ, которой было привито около 1 млн детей в Испании, Аргентине и Уругвае [4].

Из-за методических сложностей спорная гипотеза Ferrán'a так и не нашла подтверждения. Вместе с тем МБТ действительно могут долго (до 2 лет) сохраняться во внешней среде, а заражение, в частности крупного рогатого скота, чаще происходит при контакте с контаминированными объектами [5, 6]. В связи с этим дезинфекция признана ключевой мерой борьбы с инфекцией [6]. Так как у МБТ мощная липидная клеточная стенка, придающая им устойчивость к химическим веществам, для дезинфекции используют специальные композиции [6, 7]. Однако было замечено, что некоторые дезинфектанты, например традиционно применяющиеся при профилактике туберкулеза 3%-ный щелочной раствора формальдегида, 3%-ные растворы едкого натрия и хлорамина Б, способствуют трансформации МБТ в НКУ и L-формы формы, отличающиеся повышенной устойчивостью к ним [8, 9]. Более того, было установлено, что даже если под действием дезинфектанта происходит гибель МБТ, они, реагируя на химический стресс, успевают образовать «защитные» формы, способные восстанавливать жизнеспособность в виде НКУ МБТ с дефектной клеточной стенкой (cell wall deficient – CWD) [10]. Скорее всего, это не частный эффект *in vitro*, а универсальный защитный механизм при любых стрессах [11]. Поэтому представляет интерес выяснить, что может происходить с инактивированными МБТ во внешней среде, в частности в почве.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Почву с границы плодородного и подстиляющего слоя подсушивали при температуре 100 °С, просеивали через сито (4 мм) и стерилизовали гамма-лучами (24,6 Кгрей).

Бактериальную массу *Mycobacterium bovis* 8 гомогенизировали в 0,9%-ном сте-

рильном растворе NaCl. Суспензию с 3,3 мг клеток смешивали 1:1 с 3%-ным раствором дезинфектанта на основе глутарового альдегида (ГА) и поверхностно активного вещества (ПАВ), инкубировали 2 ч при температуре 23 °С. Микобактерии осаждали (14000 об/мин), осадок суспендировали в стерильной воде. Для проверки полноты инактивации суспензию МБТ высеивали на среду Гельберга.

В стерильную почву, помещенную в 3 чашки Петри, внесли суспензию инактивированных МБТ (по 2 мг бактериальной массы). Чашки в герметичных пакетах хранили 21 месяц при температуре 21–23 °С, при этом почву периодически увлажняли стерильной водой.

Микроскопию и посев контаминированной почвы проводили через 1, 4, 7, 15 и 21 месяц. Для посева через 1 и 4 месяца суспензию почвы смешивали со стимулятором роста ВКГ («Hansa»), инкубировали 24 ч при температуре 37 °С и высеивали по 0,3 мл на пробирки с питательной средой MucCel DW [12].

На 7-й, 15-й и 21-й месяц на среду MucCel DW высеивали непосредственно увлажненную суспензию почвы без инкубации в стимуляторе роста. Посевы инкубировали при температуре 37 °С, если видимого роста не было, через 1-2 суток проводили «слепые» пересевы.

Мазки почвы и изолятов окрашивали по Kinyoun и дифференцирующим иммунопероксидазным методом (ДИП), включавшим инактивацию эндогенной пероксидазы (3 % H₂O₂), окраску по Kinyoun, инкубацию с конъюгатом пероксидазы и аффинно очищенных антител к *M. bovis*, обработку раствором 3,3'-диаминобензидина с H₂O₂. Метод обеспечивал окрашивание КУ клеток в красный цвет, НКУ CWD МБТ – в коричневый, а немикобактериальной микрофлоры и тканей – в синий [13]. Микроскопию проводили на Olympus B51X.

ДНК из пробы почвы и изолятов исследовали в полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами 16S RNA, MPB 70, MPB 64, а также Is 6110 (ПЦР-RT). ДНК выделяли из проб, прогретых в лизирующем буфере (95 °С, 5 мин) и на колонках с сорбентом (ИБОХ НАНБ). Амплификацию проводили на C1000TM ThermoCycler

(BioRad) и на CFX96™ Real-Time System (BioRad) по стандартным протоколам.

Изоляты выращивали на среде MycCel DW, отмывали 1%-ным раствором фенола и дезинтегрировали на Bandelin Sonopuls 2400 (4 цикла по 5 мин). Антигенный состав соникатов изолятов изучали в реакции иммунодиффузии (РИД) с антисывороткой к НКУ CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv в сравнении с соникатом *M. bovis* «tbc 24» из лимфатического узла коровы, зараженной *M. bovis*.

Для изучения патогенности и сенсибилизирующих свойств 3 изолятами заразили 3 морских свинок (подкожно по 3–4 мг). Через 45 суток их исследовали туберкулином очищенным (ТО) для млекопитающих, ППД туберкулином для птиц (по 100 МЕ) и аллергеном из сониката НКУ CWD *M. bovis* 8 (в эквивалентной по белку дозе), а также в ИФА с соникатами *M. bovis* 8 и *M. avium*.

Чувствительность изолятов НКУ CWD МБТ к композициям на основе ГА и ПАВ (№ 1), ГА и четвертичных аммониевых соединений (ЧАС, № 2), полигексаметиленгуанидина (ПГМГ, № 3), а также к антибиотикам (стандартные диски) определяли в диффузионном тесте.

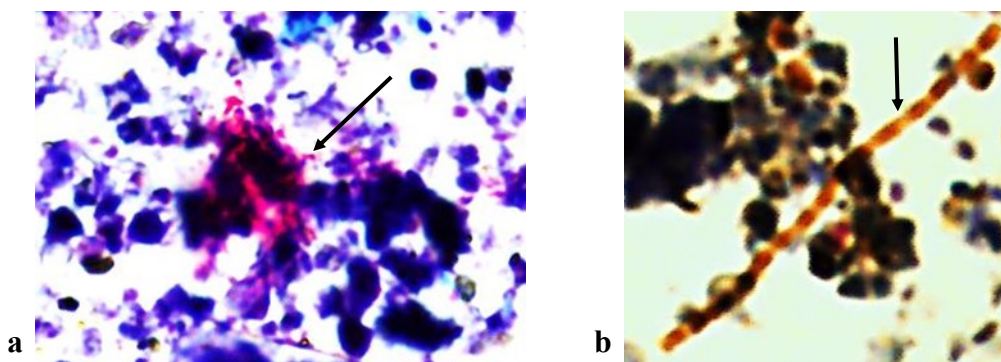
Для постановки диффузионного теста с дезинфектантами чашки Петри со средой MycCel DW засеивали культурами НКУ CWD МБТ. В слое питательной среды вы-

резали лунки, в которые вносили по 100 мкл разведений растворов дезинфектантов в концентрации 0,063–1 %. Через 20–22 ч инкубирования посевов при температуре 37 °С проводили учет роста культур и определение размеров зон его задержки. Для последующего пассажа делали посев бактериальной массы, взятой с границы зоны задержки роста.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Через 1 месяц после контаминации в мазках почвы обнаружены отдельные КУ МБТ и их кластеры (рисунок 1 а), а также длинные зернистые НКУ палочковидные формы (НКУ CWD МБТ), связывавшие при ДИП окраске антитела к антигенам *M. bovis* (рисунок 1 б, стрелка).

Через 15 месяцев в мазках почвы КУ МБТ не обнаружено, но найдены единичные утолщенные короткие частично кислотоустойчивые (ЧКУ) красного цвета палочки с НКУ зернами (рисунок 2 а), веретеноподобные клетки, иногда образующие ЧКУ палочковидные зернистые формы (рисунок 2 б, стрелка), короткие НКУ биполярные и полностью окрашенные палочки (рисунок 2 с). Также встречались длинные зернистые ЧКУ палочковидной формы (рисунок 2 д), такие, как в единичных случаях были обнаружены в начале опыта (рисунок 1 б).



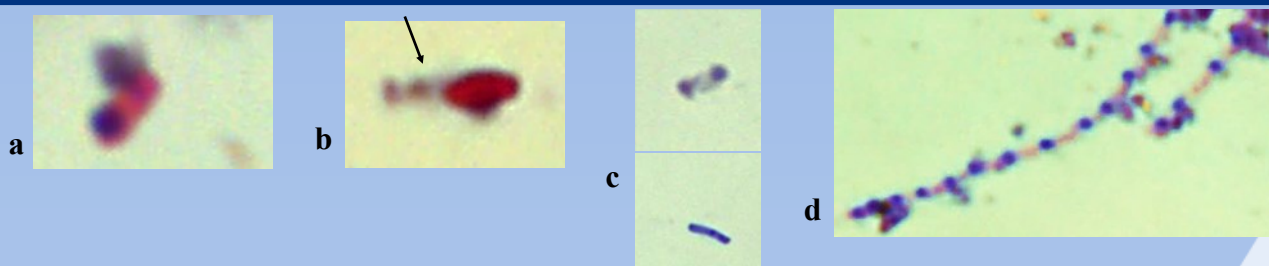
а – Kinyoun; б – ДИП окраска, 10×100

Рисунок 1 – Инактивированные МБТ в почве через 1 месяц опыта

При микроскопии почвы через 21 месяц МБТ и их измененных форм и генома не обнаружено.

Посевы через 1 и 4 месяца, проведенные с предварительной инкубацией проб почвы в стимуляторе роста, а также

через 7, 15 и 21 месяц без инкубации в стимуляторе роста во всех случаях дали рост НКУ и ЧКУ микроорганизмов, который, как правило, появлялся на 4–7-й день или через 1–2 дня в I-II «слепом» пересеве во всех 3 чашках.

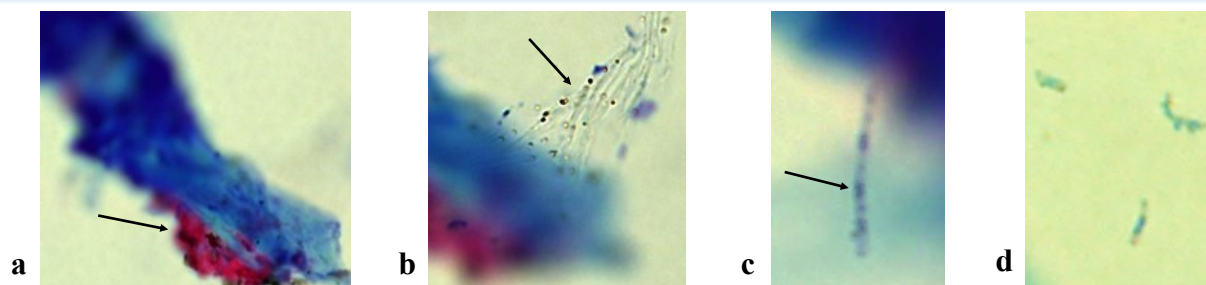


а – ЧКУ палочки с НКУ зернами красного цвета; б – ЧКУ палочковидные зернистые формы; в – НКУ биполярные окрашенные палочки; д – зернистые ЧКУ палочковидной формы

Рисунок 2 – Инактивированные МБТ в почве через 15 месяцев опыта. Kinyoun, 10×100

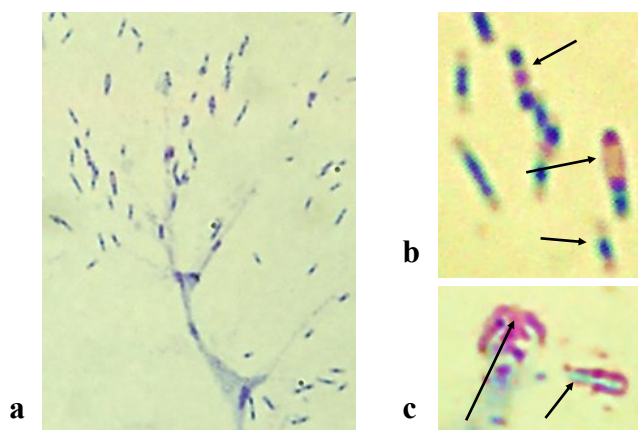
В посевах почвы через 1 месяц были заметны кластеры КУ клеток, образовывавших НКУ синего цвета протопласты (рисунок 3 а), из которых прорастали мицелиоподобные формы (рисунки 3 б, 4 а), превращавшиеся в НКУ зернистые палочковидные формы (рисунок 3 с), которые, вероятно, распадались на мелкие палочки (рисунок 3 д), в том числе биполярные с

КУ зерном (рисунок 4 б), а также ЧКУ веретеноподобные клетки (рисунок 4 в). Кроме того, появлялись округлые НКУ образования с красной ЧКУ окантовкой, окруженные НКУ зернистостью, в которой явно образовывались палочковидные формы (рисунок 4 с). При дальнейших пересевах образовывались клетки с характерной для НКУ CWD МБТ морфологией [14].



а – кластер КУ клеток (стрелка) с НКУ протопластом (синего цвета); б – мицелиоподобные формы (стрелка), в – зернистые палочковидные формы, д – мелкие палочки. Kinyoun, 10×100

Рисунок 3 – Посев почвы через 1 месяц



а – образование палочковидных форм; б – зернистые палочки и веретеноподобная клетка (ЧКУ элементы – стрелки); в – ЧКУ палочковидные формы (стрелки). Kinyoun, 10×100

Рисунок 4 – Рост в посевах контаминированной почвы (посев через 1 месяца опыта)

В посевах почвы через 4 месяца отмечен рост длинных зернистых форм с КУ элементами, а также отдельных ЧКУ клеток (рисунок 5 а, стрелки). Встречались короткие биполярные палочки (рисунок 5 б), а также крупные формы с ЧКУ элементами, в которых образовывались округлые НКУ формы (рисунок 5 с).



а – мазок из чашки № 1; б – мазок из чашки № 2; с – мазок из чашки № 3. Kinyoun, 10×100

Рисунок 5 – Рост в посевах почвы через 4 месяца

Через 7, 15 и 21 месяц посев контаминированной почвы из всех чашек без предварительной инкубации проб в стимуляторе дал рост культур, похожих по морфологии на предыдущие изоляты (стрелки – рисунки 5 а, 6 а, 4 а, 7).

Среди них встречались весьма характерные формы, такие же, как образовывались при экспериментальной трансформации штамма *M. bovis* 8 или при росте изолята НКУ CWD *M. bovis* из лимфатического узла коровы, больной туберкулезом (рисунок 8 а, 8 б, 8 с).

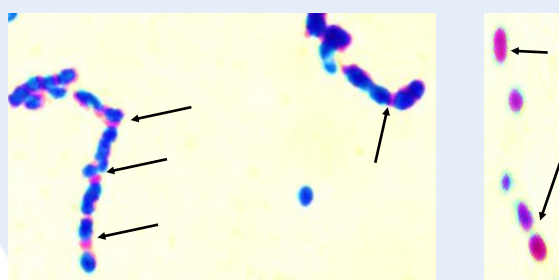
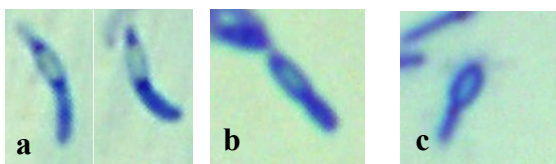


Рисунок 6 – Рост в посевах почвы из чашки № 1, посев через 7 месяцев опыта (стрелки – ЧКУ фрагменты клеток). Kinyoun, 10×100



Рисунок 7 – Характерные формы клеток роста в посевах почвы (чашка № 2) через 15 месяцев после контаминации. Kinyoun, 10×100

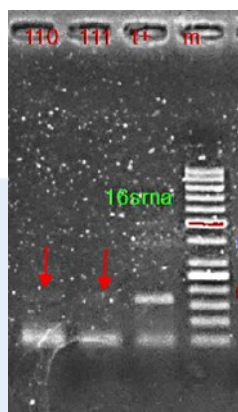


а – в посевах через 21 месяц почвы из чашки № 3; б, с – аналогичные формы НКУ CWD *M. bovis* 8 и изолята из туберкулезной гранулемы

Рисунок 8 – Характерная форма НКУ МБТ

ДНК изолятов из контаминированной почвы реагировала в ПЦР с праймерами 16s RNA, MPB 64, Is 6110, и это подтверждало, что они являлись НКУ МБТ (рисунок 9, таблица 1). Их антигенный сос-

тав, соответственно, не отличался от состава НКУ CWD *M. bovis* «tbc 24» из лимфатического узла коровы, зараженной *M. bovis* (рисунок 10).



а – из изолятов, выделенных через 1 месяц: 110 – из чашки № 1; 111 – из чашки № 2; t+ – положительный контроль; m – маркер молекулярного веса; б – из изолятов, выделенных через 21 месяц: 9 – отрицательный контроль; 10 – из чашки № 3 (праймеры 16s RNA, MPB 70, MPB 64); стрелками обозначены ампликоны

Рисунок 9 – Амплификаты ДНК изолятов из почвы

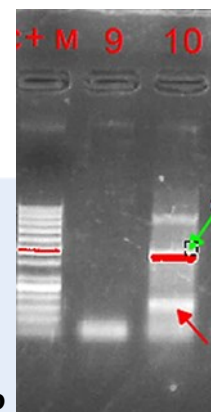
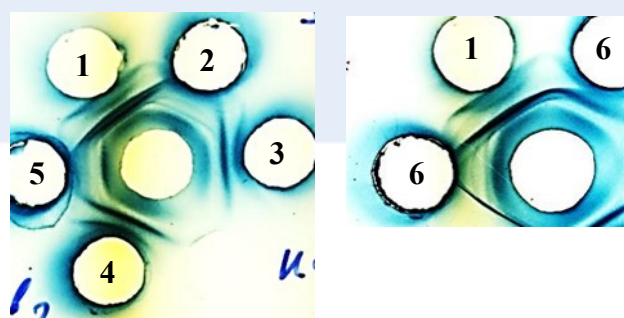


Таблица 1 – Результаты ПЦР ДНК изолятов из контаминированной почвы

Изоляты из чашек	16s RNA	MPB 70	MPB 64	Ct IS 6110
через 1 месяц				
№ 1, пробирка № 1	-	-	+	38,20
№ 2, пробирка № 2	-	-	+	35,21
№ 3, пробирка № 2	+	-	-	35,08
через 21 месяц				
№ 3, пробирка № 1	+	-	+	39,15

Морские свинки, зараженные НКУ МБТ из почвы, слабо реагировали на туберкулины для млекопитающих и птицы (папулы 4,5–7,0 мм) и несколько сильнее – на аллерген из НКУ CWD *M. bovis* 8 (папулы 8,0–13,0 мм). Вместе с тем у зара-

женных животных развивался выраженный гуморальный ответ на антигены типичных МБТ (титры в ИФА 1:2560–1:5120), причем более интенсивный – на соникат *M. bovis*, чем *M. avium* (таблица 2).



В центре – антисыворотка к НКУ CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv, соникаты изолятов:
 1 – НКУ CWD МБТ «tbc 24» из почвы;
 2 – из чашки № 3 через 1 месяц;
 3 – из чашки № 1; 4 и 5 – из чашки № 2;
 6 – из чашки № 2 через 7 месяцев

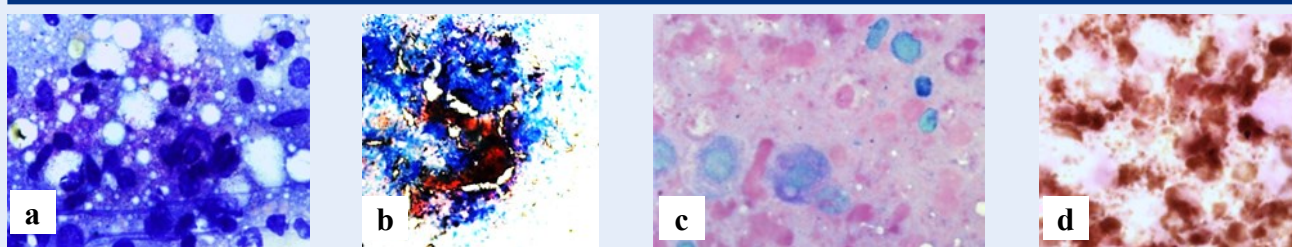
Рисунок 10 – Исследование антигенного состава изолятов из контаминированной почвы в РИД

Морская свинка, зараженная изолятом из чашки № 2, пала через 64 дня. На вскрытии отмечена гиперплазия селезенки, в которой выявлены микрогранулемы с ан-

тигенами МБТ (коричневые участки, рисунок 11). Остальные зараженные животные оставались живыми (срок наблюдения 90 дней).

Таблица 2 – Результаты исследования в ИФА крови морских свинок, зараженных изолятами из почвы с соникатами *M. avium* и *M. bovis*

Разведение сывороток	Сыворотка свинки, зараженной изолятом из чашки № 1				Сыворотка свинки, зараженной изолятом из чашки № 3			
	<i>M. avium</i>		<i>M. bovis</i>		<i>M. avium</i>		<i>M. bovis</i>	
	ОП	S/neg	ОП	S/neg	ОП	S/neg	ОП	S/neg
1:40	923	2,1	1801	6,4	1199	2,6	1527	5,5
1:80	1041	3,3	1235	8,4	1392	4,5	15871	10,6
1:160	792	3,3	1304	6,9	1114	4,6	1753	9,3
1:320	638	2,4	1037	5,5	744	2,8	1084	5,7
1:640	446	3,1	584	4,3	447	3,1	634	4,7
1:1280	319	2,5	365	2,9	374	2,5	567	4,6
1:2560	308	2,4	304	2,5	343	2,7	417	3,2
1:5120	246	1,9	235	1,8	312	2,4	279	2,2



а, b – селезенка; с, d – печень (а, с – контроль инактивации эндогенной пероксидазы; b, d – ДИП окраска)

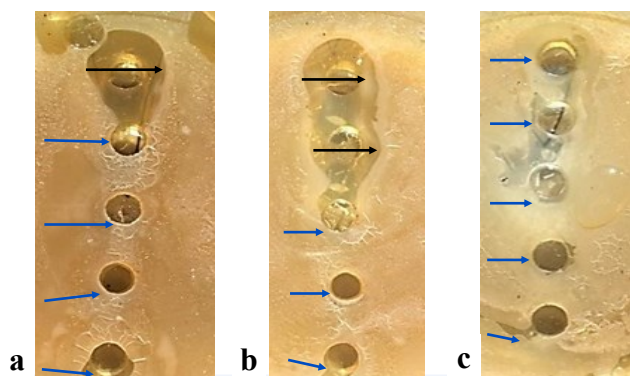
Рисунок 11 – Отпечатки селезенки и печени морской свинки, зараженной изолятом из чашки № 2

НКУ МБТ, выделенные из контаминированной почвы, отличались повышенной устойчивостью к дезинфектантам. В диффузионном тесте дезинфектант № 1 (ГА+ПАВ) в концентрациях 0,063–0,5 %, а № 2 (ГА+ЧАС) 0,063–0,25 % совсем не подавляли их рост, а в 1%-ной концентрации оказывали лишь слабое действие, образуя зоны задержки в 12–13 мм (таблица 3, ри-

сунк 12). Дезинфектант № 3 на основе ПГМГ вообще не действовал на изоляты из почвы (таблица 3, рисунок 12). При этом НКУ CWD МБТ, никогда не контактировавшие с дезинфектантами, в частности «D» – из крови человека с онкологическим заболеванием, инактивировались дезинфектантами, использовавшимися в опыте, уже в концентрации 0,063 % (таблица 3).

Таблица 3 – Диаметры зон задержки роста (в мм) в диффузионном тесте изолята из почвы № 3/2 (числитель) и НКУ CWD МБТ «D» (знаменатель) дезинфектантами на основе ГА и ПГМГ

Концентрация	№ 1 ГА+ПАВ	№ 2 ГА+ЧАС	№ 3 ПГМГ
1 %	12/26	13	0/25
0,5 %	0/22	11	0/23
0,25 %	0/19	0	0/19
0,125 %	0/12	0	0/11
0,063 %	0/11	0	0/10



Композиции: а – ГА+ПАВ; б – ГА+ЧАС; с – ПГМГ (черные стрелки – зоны задержки роста, синие – отсутствие зон задержки)

Рисунок 12 – Зоны задержки роста изолята из чашки № 3 разведениями дезинфектантов в концентрациях 0,063–1,0 %

Изоляты НКУ (CWD) МБТ из контаминированной почвы, как и экспериментально полученный штамм НКУ CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv, отличались резистентностью к пенициллинам, аминогликозидам и

цефалоспорином, при этом резистентность к антибиотикам, которые первоначально оказывали действие на изоляты (неомицин, тетрациклин, линезолид), появлялась уже после 2 контактов с ними (таблица 4).

Таблица 4 – Чувствительности к антибиотикам изолята № 3 из контаминированной почвы, НКУ CWD *M. tub.* H₃₇Rv (зоны задержки роста в мм) в диффузионном тесте

Изоляты	Пенициллин	Ампициллин	Стрептомицин	Канамицин	Неомицин	Азигромидин	Тетрациклин	Левифлоксацин	ипрофлоксацин	Офлоксацин	Цефалотин	Линезолид
№ 3	0	13	14	16	19/18/15 ^x	27	29/22/12	36	37	27	0	31/26/16 ^x
НКУ CWD <i>M. tub.</i> H ₃₇ Rv	0	20	20	20	22	22	23	37	35	26	12	29

Примечание – красным цветом обозначена зона меньше 19 мм, указывающая на резистентность к антибиотику; ^xизменения размеров зон при повторных контактах с антибиотиком

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ранее было установлено, что МБТ, инактивированные дезинфектантами, могут восстанавливать жизнеспособность *in vitro* в виде НКУ CWD форм после инкубации в стимуляторе роста и посева на специальную питательную среду [10].

Для оценки практической значимости феномена необходимо было выяснить, может ли подобное происходить во внешней среде после эффективной дезинфекции. Установлено, что инактивированные КУ МБТ визуально обнаруживаются в почве как минимум в течение 15 месяцев, но их количество уменьшается. Это связано не только с деградацией клеток, но и с постепенным восстановлением жизнеспособности в увлажненной почве и превращением в НКУ CWD формы. Это подтверждается появлением клеток, специфически окрашивавшихся ДИП методом, благодаря связыванию антител к *M. bovis*.

К 21-му месяцу визуально заметные формы МБТ исчезают. Скорее всего, это связано с тем, что использованная стерильная почва была бедна питательными веществами, а «голодание» стимулирует образование спороподобных «защитных» форм МБТ, которые из-за малого размера и снижения способности связывать красители становятся малозаметными [15, 16, 17]. Тем не менее, на всех этапах опыта из контаминированной почвы удается выделить НКУ CWD МБТ. Важным результатом было получение роста НКУ CWD МБТ при посеве

суспензии почвы на среду MucCel DW без предварительной инкубации в стимуляторе роста. То есть сохраняющиеся в почве защитные формы МБТ при увлажнении и повышении концентрации питательных веществ трансформировались в способные к размножению НКУ CWD МБТ. Следовательно, этот процесс может происходить не только *in vitro*, но и в естественных условиях.

Известно, что в почве много микроорганизмов, выделяющих антибиотики для подавления конкурентов. Интересно, что изоляты НКУ CWD МБТ были резистентны к большинству природных антибиотиков, также у них быстро развивалась резистентность к ним, что облегчало их существование в окружении других почвенных микроорганизмов.

Полученные результаты расширяют представления о биологии и адаптивных возможностях МБТ. Практическое значение феномена нуждается в дальнейшем изучении, но уже понятно, что даже при эффективной противотуберкулезной дезинфекции попадающие в почву инактивированные МБТ могут стать не только резервуаром, но и источником инфекции. Вопрос состоит в том, способны ли измененные МБТ или их «защитные» формы, происходящие из инактивированного возбудителя, при попадании в организм вызывать туберкулез или какие-то другие эффекты? Ранее было установлено, что НКУ CWD МБТ, образовавшиеся из химически инактивированных клеток, при попадании *per*

ос приживаются и персистируют в организме мышей [10]. То есть, проникая с пищей, водой, аэрозолями, они могут инфицировать животных и людей, но при этом вряд ли способны быстро трансформироваться в типичные патогенные МБТ. В условиях эксперимента реверсию клинического изолята L-формы МБТ удалось получить только после 13 пассажей на морских свинках

[1]. Вместе с тем полученные результаты показали, что изоляты НКУ CWD МБТ из контаминированной почвы вызывали у морских свинок слабую чувствительность к туберкулину. Тем не менее нельзя исключать, что, имея целый ряд общих антигенов с типичным *M. bovis*, они могут быть причиной возникновения реакций на туберкулин у крупного рогатого скота.

СПИСОК ЦИТИРОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Ferran, J. Note relative aux aptitudes saprophytes du bacilli de la tuberculose, a ses affinites avec le bacille du typhus et le coli-bacille et aux proprietes immunisantes et therapeutiques que possede ce bacille converti en saprophyte / J. Ferran // Comptes rendus de la l academie de sciences de Paris. – 1897. – Vol. 125. – P. 515–518.
2. Ferran, J. La nueva bacteriologia de la tuberculosis: Congreso de la Tuberculosis / J. Ferran. – Valencia : Litografia de Jose Ortega, 1912. – 51 p.
3. Ferran, J. Errores doctrinales concernientes a la tuberculosis y a su bacilo: rectificación de estos errores: nuevas orientaciones conducentes a la solución del problema de la profilaxis y de la terapéutica específicas de esta enfermedad. / J. Ferran. – Segunda edicion. – Valencia : Imprenta y Encuadernacion de V. Tordesillas, 1910. – 56 p.
4. Модель, Л. М. Идеи Феррана об этиологии, патогенезе и профилактике туберкулеза / Л. М. Модель // Иммунобиология, клиника и профилактика туберкулеза у детей / ред. А. А. Кисель, В. Н. Иванов. – Л. : Практическая медицина, 1926. – С. 37–43.
5. A Study of the Persistence of *Mycobacterium bovis* in the Environment under Natural Weather Conditions in Michigan, USA / A. E. Fine [et al.] // Veterinary Medicine International. – 2011. – Vol. 2011. – P. 1–12.
6. Колычев, Н. М. Методы индикации и обезвреживания микобактерий туберкулеза на объектах внешней среды : дис. ... д-ра ветеринар. наук : 16.00.03 / Н. М. Колычев. – Омск, 1983. – 436 с.
7. Maris, P. Modes of action of disinfectants / P. Maris // Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics). – 1995. – Vol. 14, № 1. – P. 47–55.
8. Sweany, H. C. Mutation forms of the tubercle bacillus / H. C. Sweany // JAMA. – 1926. – Vol. 87, № 15. – P. 1206–1211.
9. Секин, Е. Ю. L-трансформация микобактерий, свойства и способы культивирования L-форм: дис. ... канд. ветеринарных наук : 16.00.03 / Е. Ю. Секин. – Омск, 2006. – 133 с.
10. Микобактерии туберкулеза после летального воздействия дезинфектантов могут восстанавливать жизнеспособность в виде микобактерий с дефектной клеточной стенкой / А. Э. Высоцкий [и др.] // Эпизоотология Иммунобиология Фармакология Санитария. – 2019. – № 2. – С. 26–35.
11. The tuberculin skin test: How safe is safe? – the tuberculins contain unknown forms capable of reverting to cell-wall-deficient mycobacteria / A. P. Lysenko [et al.] // Clinical and Experimental Medical Sciences. – 2014. – Vol. 2. – P. 55–73.
12. 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. – Ростов н/Д : РостГМУ, 2014. – С. 176–198.
13. Выявление микобактерий туберкулеза в тканях с помощью дифференцирующей иммунопероксидазной окраски / А. П. Лысенко [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2014. – № 10. – С. 55–58.
14. Вирус бычьего лейкоза – вирусоподобная форма микобактерий туберкулеза? / А. П. Лысенко [и др.] // Экология и животный мир. – 2019. – № 1. – С. 15–24.
15. Nyka, W. Studies on the Effect of Starvation on *Mycobacteria* / W. Nyka // Infection and Immunity. – 1974. – Vol. 9, № 5. – P. 843–850.
16. Sporulation in mycobacteria / J. Ghosh [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2009. – Vol. 106, № 26. – P. 10781–10786.
17. Identification and Characterization of a Spore-Like Morphotype in Chronically Starved *Mycobacterium avium* Subsp. *Paratuberculosis* Cultures / E. A. Lamont [et al.] // PLoS ONE. – 2012. – Vol. 7, № 1. – P. e30648.