

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

Высоцкий А.Э., кандидат ветеринарных наук, доцент
Лысенко А.П., доктор ветеринарных наук, профессор
Кучвальский М.В., научный сотрудник
Красникова Е.Л., научный сотрудник
Прокопенкова Т.М., научный сотрудник

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

МИКОБАКТЕРИИ ТУБЕРКУЛЕЗА ПОСЛЕ ЛЕТАЛЬНОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ ДЕЗИНФЕКТАНТОВ МОГУТ ВОССТАНАВЛИВАТЬ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТЬ В ВИДЕ МИКОБАКТЕРИЙ С ДЕФЕКТНОЙ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКОЙ

Резюме

Mycobacterium bovis № 8, инактивированный дезинфектантами, после инкубации в стимуляторе роста и посева на среду ВКГ восстанавливал жизнеспособность в виде форм с дефектной клеточной стенкой (cell wall deficient-CWD), способных после введения *per os* персистировать в организме мышей.

Восстановившие жизнеспособность CWD *M. bovis* из 5 случаев в 2 оказались резистентными к «своей» композиции и в 3 – к «чужой». При повторных контактах у них быстро формировалась резистентность и к другим дезинфектантам. Предполагается, что процесс восстановления жизнеспособности и размножения CWD форм микобактерий можно замедлить ротацией дезинфектантов.

Антигенный состав у восстановивших жизнеспособность CWD форм не отличался от состава CWD изолятов из культуры Т-лимфоцитов человека, больного Т-лимфобластной лейкемией (Jurkat) и из клеток почки эмбриона овцы, инфицированных вирусом бычьего лейкоза (FLK-BLV). Предполагено, что восстановившие жизнеспособность микобактерии, попадающие в организм из внешней среды могут быть фактором риска возникновения опухолей.

Summary

Mycobacterium bovis № 8 inactivated by disinfectants after an incubation in a growth stimulant and seed on the VKG nutrition medium restored viability as cell wall deficient mycobacteria CWD), capable after inoculation *per os* to persistence in an organism of mice.

CWD *M. bovis* which restored viability from 5 cases, in 2 were resistant to «the» composition and in 3 – to «others». At repeated contacts they quickly formed resistance and to other disinfectants. It is believed that the process of restoring the viability and reproduction of CWD forms of mycobacteria can be slowed by the rotation of disinfectants.

The antigenic structure at the CWD forms which restored viability did not differ from CWD isolates from the T lymphocytes of the person sick with T-lympho-blastoid leukemia (Jurkat) and from the fetal lamb kidney cells infected with the Bovine Leukemic Virus (FLK-BLV). It is assumed that CWD MBT getting to an organism from external environment can be risk factor of cancerogenesis.

Поступила в редакцию 24.09.2019 г.

ВВЕДЕНИЕ

Больные туберкулезом люди и животные выделяют микобактерии туберкулеза (МБТ), сохраняющие жизнеспособность во внешней среде до 7 лет [1, 2]. В связи с этим дезинфекция – ключевая мера в борьбе с инфекцией. Так как у МБТ мощная липидная клеточная стенка, придающая им устойчивость к химическим веществам [1], для дезинфекции используют специальные композиции и режимы их применения [2].

Микобактерицидный эффект оцени-

вают с помощью биопробы и бактериологического посева [2]. Вместе с тем потеря патогенности МБТ и способности роста на питательных средах после контакта с дезинфектантом – скорее всего, не критерий их полной гибели. Установлено, что МБТ образуют, в частности при повышении температуры, защитные спороподобные формы [3, 4], выдерживающие автоклавирование [5, 6, 7, 8]. В специальных стимуляторах роста и на соответствующих питательных средах они восстанавливают жиз-

неспособность в виде некислоустойчивых (НКУ) МБТ с дефектной клеточной стенкой (cell wall deficient – CWD) [5, 6, 7, 8]. Скорее всего, это не частный эффект *in vitro*, а универсальный защитный механизм при любых стрессах, в том числе при действии дезинфектантов.

До сих пор неизвестно, что происходит с МБТ после контакта с дезинфектантами во внешней среде. Возможно, и при химическом стрессе МБТ образуют защитные формы, которые под действием неопределенных стимулирующих факторов могут восстановить жизнеспособность в виде CWD МБТ и размножаться во внешней среде, так как могут расти в широком температурном диапазоне и на простых питательных субстратах [5, 6, 9]. Вероятно, и типичные КУ МБТ во внешней среде под действием трансформирующих факторов (феномен «голодания» [10, 11]) также могут превращаться в CWD формы. Еще в конце XIX века J. Feffer выдвинул гипотезу о том, что типичные МБТ – лишь незначительная часть популяции, а их большая часть существует во внешней среде в виде НКУ (CWD) форм [12, 13]. Гипотеза не подтверждена, но и не опровергнута, особенности существования МБТ во внешней среде, в том числе после контакта с дезинфектантами, пока неизвестны.

Цель исследований – изучение способности МБТ образовывать защитные формы под действием дезинфектантов и свойств культур, в виде которых они восстанавливают жизнеспособность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штамм *Mycobacterium bovis* 8 выращивали на среде Левенштейна-Йенсена (Л-И), бактериальную массу (4,5 мг/мл) гомогенизировали в воде. Суспензии разливали в 2 ряда пробирок: I ряд – для оценки действия дезинфектантов на МБТ, II – для изучения восстановления жизнеспособности МБТ после контакта с дезинфектантами. В пробирки добавляли равный объем дезинфектантов (таблица 1) с удвоенной концентрацией. Контролем служила смесь суспензии МБТ с водой (1:1). Смеси гомо-

генизировали и выдерживали 60 мин при температуре 22 °С. Бактериальную массу отмывали водой (14000 об/мин, однократно). К отмытому осадку I ряда пробирок добавляли 0,9 % раствора хлорида натрия, в пробирки II ряда вносили стимулятор роста ВКГ (патент Украины № 43467). Суспензии из I ряда пробирок высевали на среду Л-И (по 0,3 мл на пробирку). Пробирки II ряда инкубировали 24 ч при 37 °С, суспензии высевали по 0,3 мл на пробирки со средой ВКГ (патент Украины № 43467).

Посевы инкубировали при температуре 37 °С. Через 10 суток проводили I «слепой» пересев, который повторяли 3 раза с интервалом в 24 ч. При получении видимого роста колоний изоляты культивировали на питательной среде MucCel DW (Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселеского).

Мазки изолятов окрашивали по Kinyoun и дифференцирующим иммунопероксидазным методом (ДИП) с использованием аффинно-очищенных антител к *M. bovis* [14]. Микроскопию проводили на Olympus B51X, 10×100.

Изоляты идентифицировали в полимеразной цепной реакции (ПЦР). Бактериальную массу в лизирующем буфере (0,4 мг/мл) прогревали 5 мин при температуре 95 °С. ДНК выделяли на колонках с сорбентом (ИБОХ НАНБ). Амплификацию проводили на C1000TM ThermoCycler (BioRad) с праймерами 16S RNA *Mycobacteria*, MPB 70, MPB 64 («Праймтех»). Электрофорез амплификатов проводили в 2%-ном агарозе, результаты учитывали на Molecular Imager GelDocTM XR+ (BioRad). Кроме того, ДНК изолятов исследовали в ПЦР в реальном времени с праймерами IS 6110.

Антигенный состав изолятов, дезинтегрированных на Bandelin Sonopuls 2400, изучали в реакции иммунодиффузии (РИД) с использованием кроличьих антитысывороток к соникатам CWD *M. bovis* 8 и к CWD МБТ, выделенных из фильтрата (0,22 µm) культуральной жидкости клеток почки эмбриона овцы, инфицированных вирусом бычьего лейкоза (FLK-BLV) се-

рии «НС» [15, 16]. Для сравнения использовали соникаты CWD МБТ из лимфатического узла коровы, больной туберкулезом, CWD *M. bovis* 8, CWD МБТ из культуры Т-лимфоцитов человека, больного Т-лимфобластной лейкемией «Jurkat», CWD МБТ из культуральной жидкости FLK-BLV серии 30 [15].

Чувствительность изолятов к дезинфектантам определяли в диффузионном тесте. Чашки Петри с питательной средой МусСел DW засеивали изолятами. В слое среды вырезали лунки, в которые вносили по 85 мкл дезинфицирующих композиций, указанных в таблице 1, но в концентрации 1,5 %. Через 24 ч культивирования при температуре 37 °С учитывали размеры зон задержки роста. Для последующего пассажа делали посев с границ зон задержки роста каждой композицией. Контролем служил изолят CWD МБТ «D» из крови человека, больного саркомой.

Патогенность изолята CWD МБТ № 2 «Глутаровый альдегид» определяли на белых мышах массой 25–30 г. Суспензию культуры (0,5 мг/мл) вводили 5 животным *per os* по 0,5 мл (по 0,25 мг). Из легких, печени, селезенки павших животных был приготовлен гомогенат, который подкожно ввели 2 белым мышам. Мазки-отпечатки из органов павших животных и мест инъекций окрашивали по Kinyoun и ДИП методом [14]. Гомогенаты органов деконтаминиро-

вали 6%-ной щавелевой кислотой и после 24 ч инкубации в стимуляторе роста ВКГ высевали на среду МусСел DW.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Установлено, что 3%-ный щелочной раствор формальдегида и композиция на основе глутарового альдегида полностью инактивировали МБТ. Достаточно эффективно действовали композиции на основе ПГМГ и ЧАС, подавляя 98–98,9 % клеток МБТ. Слабее действовала композиция органических кислот и ЧАС, после контакта с которой выжило около 7 % клеток МБТ (таблица 1).

Посев на среду ВКГ обработанных дезинфектантами МБТ, инкубированных в стимуляторе роста, видимого роста не дал, но с помощью «слепых» пересевов во всех случаях удалось получить рост визуально заметных колоний. Раньше всех, в I «слепом» пересеве, появился рост колоний в посеве МБТ после обработки композицией на основе ПГМГ (изолят CWD МБТ «ПГМГ 3¹»). Далее, III «слепой» пересев дал рост изолята CWD МБТ № 4 «ЧАС». На сутки позже, но во II слепом пересеве обнаружен рост изолятов CWD МБТ № 5 «ЧАС + органические кислоты» и № 2 «Глутаровый альдегид». Самым последним, после 18 суток инкубирования, в I «слепом» пересеве получен рост колоний CWD МБТ № 1 «Формальдегид».

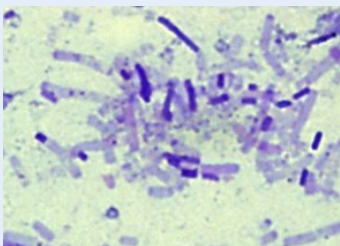
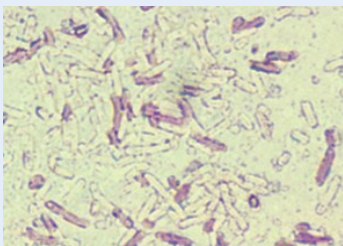
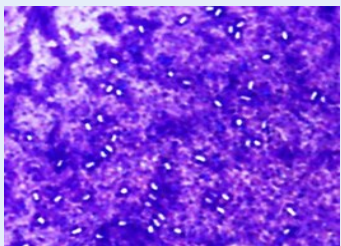
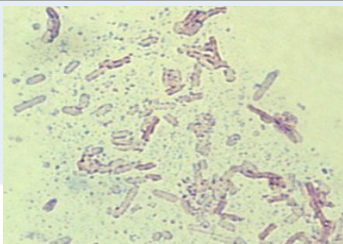
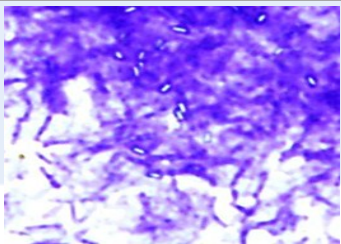
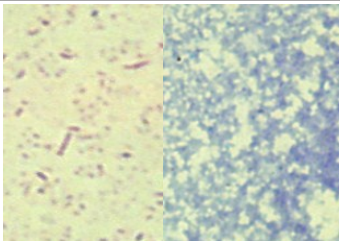
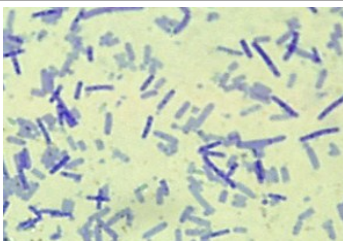
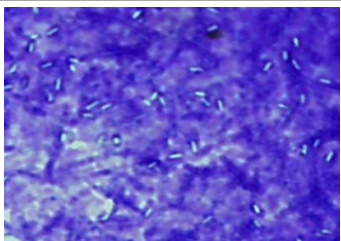
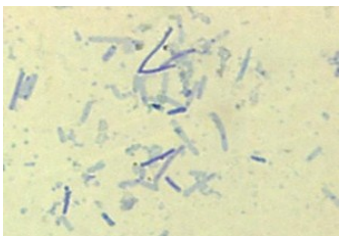
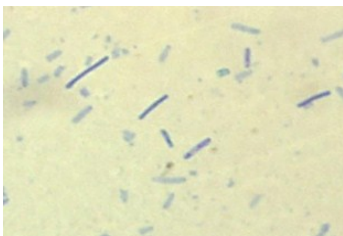
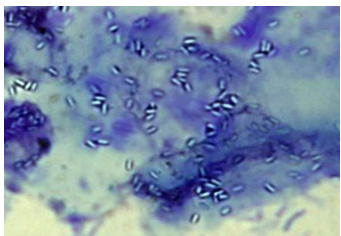
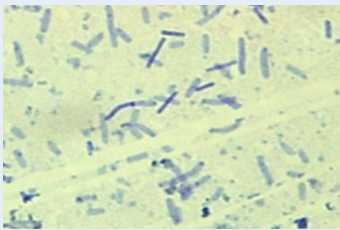
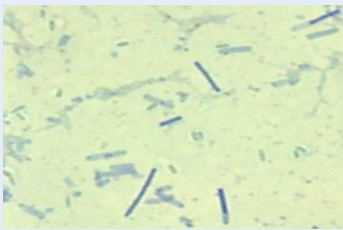
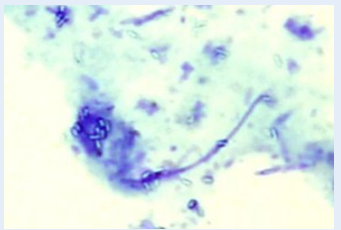
Таблица 1. – Композиции дезинфицирующих веществ и их действие на *M. bovis* (число колониеобразующих единиц на 1 пробирку среды Л-И через 3 недели культивирования)

№ п/п	Концентрация композиции в суспензии, активно действующее вещество (АДВ)	КОЕ /0,3 мл на среде Л-И	% эффективности
1	3 % формальдегид в 3 % растворе гидроксида натрия	0	100
2	2 % глутаровый альдегид	0	100
3	2 % полигексаметиленгуанидин (ПГМГ)	18	98
4	2 % ЧАС (октилдецилдиметил аммония хлорид, диоктилдиметил аммония хлорид, дидецилдиметил аммония хлорид, алкилдиметилбензалкония хлорид)	9,5	98,9
5	2 % ЧАС (бензалконий хлорид, муравьиная и бензойная кислота, бензолтриазол)	65,5	92,7
	Контроль (вода)	900	0

Изоляты (таблица 2) представляли собой типичные для CWD МБТ полиморфные некислотоустойчивые (НКУ) палочковидные формы с примесью коккоидов, а также «пустых» неокрашивавшихся спороподобных форм (таблица 2, III колонка). Исключение составил изолят «ПГМГ 3¹»,

росший в виде частично кислотоустойчивого (ЧКУ) и НКУ детрита с единичными ЧКУ палочками (таблица 2а). Кроме того, в изолятах № 1 «Формальдегид» и № 2 «Глутаровый альдегид» присутствовала примесь ЧКУ и неокрашенных палочек (таблица 2).

Таблица 2. – Морфология культур, выросших после воздействия дезинфектантов на *M. bovis* (рост в I пересеве)

Изолят CWD МБТ № 1 «Формальдегид»		
		
Изолят CWD МБТ № 2 «Глутаровый альдегид»		
		
Изоляты CWD МБТ «ПГМГ 31» (a) и «ПГМГ 32» (b, c)		
a 	b 	c 
Изолят CWD МБТ № 4 «ЧАС»		
		
Изолят CWD МБТ № 5 «ЧАС + органические кислоты»		
		

Изоляты при ДИП окраске реагировали с антителами к *M. bovis*, специфически окрашиваясь в коричневый цвет (рисунок 7) и по результатам ПЦР (рисунок 1, таблица 3) могли быть отнесены к МБТ. С учетом их НКУ и полиморфизма это были CWD формы *M. bovis*. Они имели практически идентичный антигенный состав с экспе-

риментально полученным штаммом CWD *M. bovis* 8, изолятами CWD МБТ из лимфатического узла коровы, больной туберкулезом, из культуры Т-лимфоцитов человека, больного Т-лимфобластной лейкемией, из культуральной жидкости клеток почки эмбриона овцы, инфицированных вирусом бычьего лейкоза (FLK-BLV) (рисунок 2).

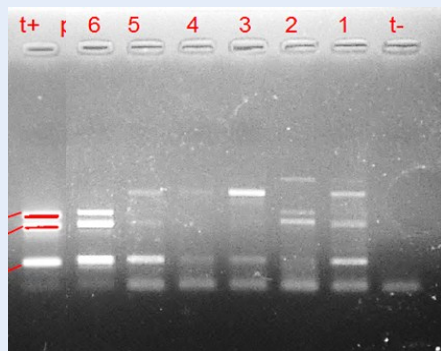


Рисунок 1. – Детекция продуктов амплификации ДНК изолятов с праймерами 16s RNA, MPB 70, MPB 64 (сверху-вниз):
1 – CWD МБТ № 4 «ЧАС»; **2 – CWD МБТ № 3¹ «ПГМГ 3¹»;** **3 – CWD МБТ «ПГМГ 3²»;**
4 – CWD МБТ № 1 «Формальдегид»;
5 – CWD МБТ № 5 «ЧАС + органические кислоты»; **6 – CWD МБТ № 2 «Глутаровый альдегид»**

Таблица 3. – Результаты идентификации в ПЦР культур, выделенных после летального воздействия дезинфектантов

№	Изоляты	16s RNA	MPB70	MPB64	Ct real time IS6110
1	CWD МБТ «Формальдегид»	±	+	+	не иссл.
2	CWD МБТ «Глутаровый альдегид»	+	+	+	30.15
3 ¹	CWD МБТ «ПГМГ 3 ¹ »	+	+	+	32.38
3 ²	CWD МБТ «ПГМГ 3 ² »	±	-	+	33.37
4	CWD МБТ «ЧАС»	±	-	+	29.64
5	CWD МБТ «ЧАС + органические к-ты»	±	+	+	30.18
К+		+	+	+	23.70
К-		-	-	-	N/A

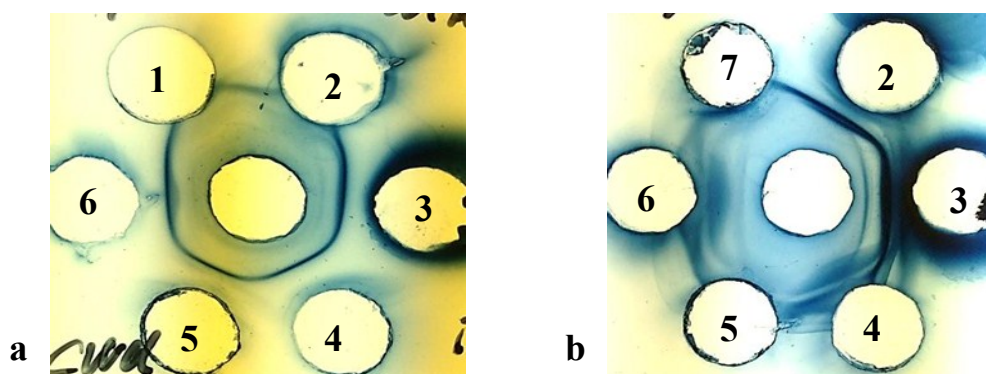


Рисунок 2. – РИД антисывороток (в центре): а – к CWD *M. bovis* 8; б – к изоляту CWD МБТ «НС» из культуральной жидкости FLK-BLV, профильтрованной через фильтр 0,22 μm.

В периферических лунках соникаты: 1 – CWD МБТ из лимфатического узла коровы, больной туберкулезом; 2 – CWD МБТ № 2 «Глутаровый альдегид»; 3 – № 5 «ЧАС + органические кислоты»; 4 – CWD МБТ «ПГМГ 3²»; 5 – CWD *M. bovis* 8; 6 – изолят CWD МБТ из культуры Т-лимфоцитов человека, больного Т-лимфобластной лейкемией «Jurkat». б – аналогичное положение лунок с соникатами; 7 – CWD МБТ из культуральной жидкости FLK-BLV серии «НС»

В таблице 4 и на рисунках 3–5 представлены результаты определения действия дезинфектантов на восстановившие жизнеспособность CWD МБТ. Судя по размерам зон задержки роста в I пассаже, они оказались на 35–50 % устойчивее, чем контрольный изолят CWD МБТ «D» из крови человека, больного саркомой, не контактировавший с дезинфектантами. Более того, оказались резистентными:

- CWD МБТ № 2 «Глутаровый аль-

дегид» – к «своей» композиции и к «ПГМГ» (таблица 4, рисунок 3),

- CWD МБТ «ПГМГ 3²» – к «своей» композиции (таблица 4),

- CWD МБТ «ЧАС» – к композиции «ПГМГ».

Даже если некоторые композиции давали относительно большие зоны задержки роста, устойчивость изолятов к ним заметно повысилась уже после первого контакта (таблица 4).

Таблица 4. – Действие дезинфицирующих веществ в диффузионном тесте на CWD МБТ, восстановившие жизнеспособность после обработки дезинфектантами (зоны задержки роста в мм)

Композиции	I пассаж	II пассаж	III пассаж
Изолят CWD МБТ № 2 «Глутаровый альдегид»			
1,5 % «Глутаровый альдегид»	0	-	-
1,5 % «ПГМГ»	0	-	-
1,5 % «ЧАС»	38	31	33
1,5 % «ЧАС + органические кислоты»	33	27	28
Изолят CWD МБТ «ПГМГ 3 ² »			
1,5 % «Глутаровый альдегид»	23	23	23
1,5 % «ПГМГ»	16	15	15
1,5 % «ЧАС»	27	23	23
1,5 % «ЧАС + органические кислоты»	19	20	20
Изолят CWD МБТ № 4 «ЧАС»			
1,5 % «Глутаровый альдегид»	19	15	-
1,5 % «ПГМГ»	0	0	-
1,5 % «ЧАС»	28	20	19
1,5 % «ЧАС + органические кислоты»	18	13	14
Изолят CWD МБТ № 5 «ЧАС + органические кислоты»			
1,5 % «Глутаровый альдегид»	21	15	-
1,5 % «ПГМГ»	10	0	-
1,5 % «ЧАС»	28	18,5	18
1,5 % «ЧАС + органические кислоты»	20	15	11
Изолят «D» (контроль)			
1,5 % «Глутаровый альдегид»	28	25	20
1,5 % «ПГМГ»	24	13	12
1,5 % «ЧАС»	43	40	39
1,5 % «ЧАС + органические кислоты»	36	32	25

В опыте на белых мышах была проверена патогенность изолята CWD МБТ № 2 «Глутаровый альдегид» введением per os 0,25 мг бактериальной массы. В первые двое суток из 5 зараженных мышей погибло 3. У мышей отмечались воспалительные изменения в легких, у двух животных на легочной и костальной плевре был светлый налет. У одной мыши отмечено заметное увеличение селезенки. В легких, печени и

селезенке (рисунок 6) были обнаружены специфически окрашенные палочковидные и кокковидные формы с характерной для CWD МБТ морфологией [15]. Налет на плевре практически полностью состоял из клеток CWD МБТ (рисунок 6а). Обнаруженные изменения и результаты микроскопии указывали на высокую вероятность гибели животных от сепсиса.

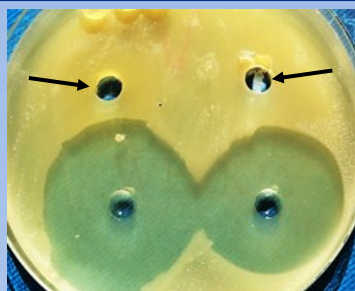


Рисунок 3. – Действие композиций на основе глутарового альдегида, ПГМГ (верхние лунки слева-направо) «ЧАС» и «ЧАС + органические кислоты» (нижние лунки) на изолят CWD МБТ № 2 «Глутаровый альдегид».

Стрелки – отсутствие зон задержки роста композициями на основе глутарового альдегида и ПГМГ



Рисунок 4. – Действие композиций на основе глутарового альдегида и ПГМГ (слева-направо) на изолят CWD МБТ № 4 «ЧАС». Стрелка – отсутствие зоны задержки роста композицией на основе ПГМГ

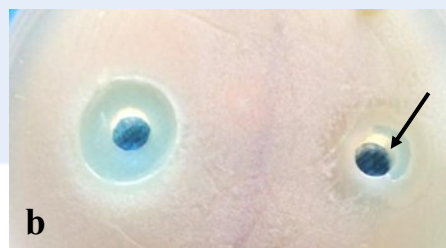
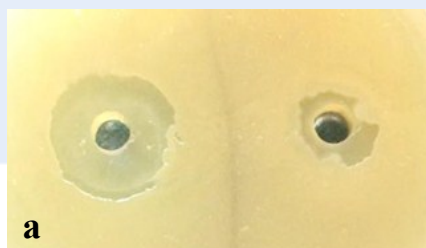


Рисунок 5. – Действие композиций на основе глутарового альдегида и ПГМГ на изолят CWD МБТ № 5 «ЧАС + органические кислоты» в I (а) и II пассаже (b). Стрелка – отсутствие зоны задержки роста композицией на основе ПГМГ во II пассаже

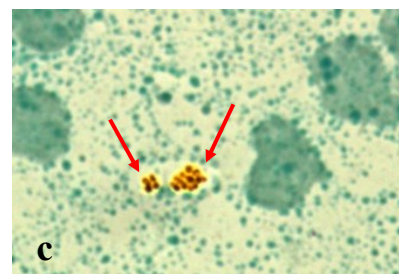
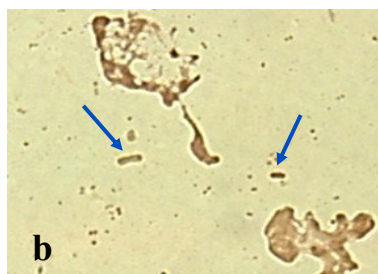
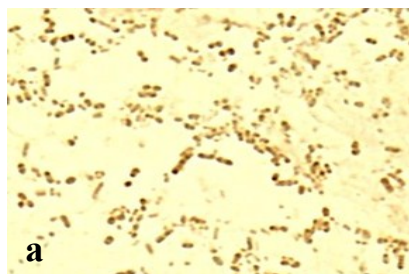


Рисунок 6. – Мазки-отпечатки тканей мышей, павших после заражения CWD МБТ № 2 «Глутаровый альдегид»: а – налет на легких и плевре (исключительно CWD МБТ); б – легкие; с – селезенка; д – печень

Явления сепсиса с интенсивным размножением CWD МБТ в тканях зараженных мышей подтвердили и результаты введения 2 мышам гомогената органов павших животных. Обе пали в течение 2 суток. В

месте инъекции обнаруживалась гноеподобная масса с большим количеством специфически окрашенных клеток с характерной морфологией штамма, использованного для заражения (рисунки 7, 8).

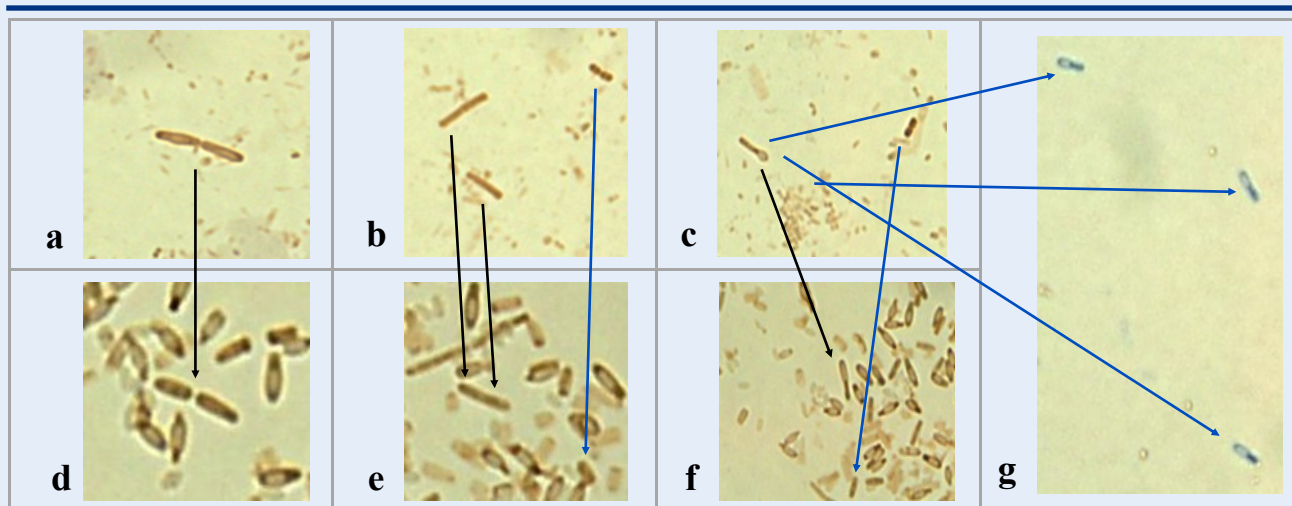


Рисунок 7. – Место инъекции гомогената органов мышей, зараженных per os CWD MBT № 2 «Глутаровый альдегид» (a, b, c), культура CWD MBT № 2 «Глутаровый альдегид», использованная для заражения (d, e, f), культура, выделенная от мыши, павшей после введения гомогената внутренних органов мышей, зараженных per os CWD MBT № 2 «Глутаровый альдегид»

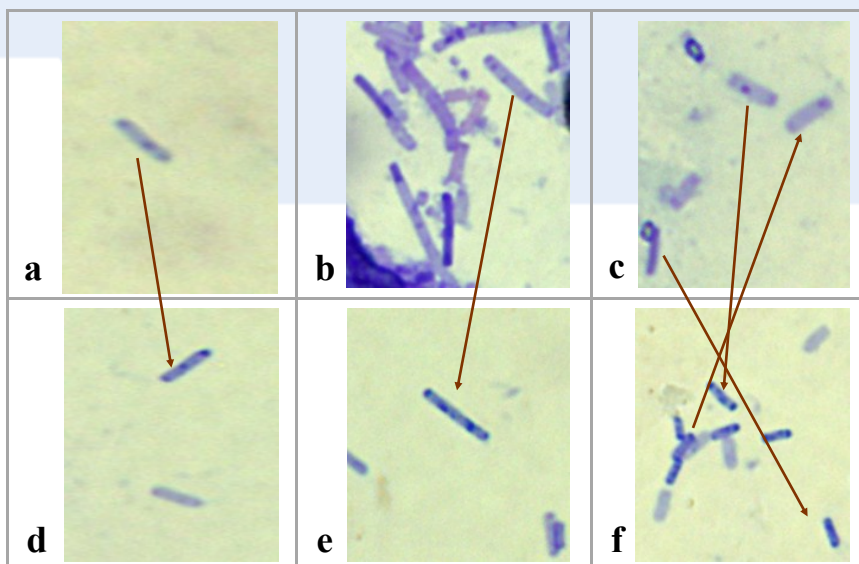


Рисунок 8. – Одинаковые формы в культуре CWD MBT № 2 «Глутаровый альдегид» (a, b, c) и в изоляте от мыши, павшей после введения гомогената внутренних органов мышей, зараженных per os CWD MBT № 2 «Глутаровый альдегид» (d, e, f)

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Посев на среду Л-И показал, что щелочной раствор формальдегида и композиция на основе глутарового альдегида полностью инактивировали МБТ. Дезинфектанты с ПГМГ и ЧАС подавляли 98–98,9 % клеток, а композиция «ЧАС + органические кислоты» с меньшим спектром ЧАС инактивировала 92,7 % клеток МБТ. Тем не менее, после инкубации «убитых» МБТ в стимуляторе роста и посева на питательную среду ВКГ во всех случаях удалось получить восстановление жизнеспособности в виде CWD МБТ. То есть при летальном

контакте с дезинфектантами, как и при термическом стрессе [6, 7, 8], МБТ образовывали защитные формы. В этом процессе можно предполагать участие белков теплового шока (hsp 65, hsp 70), способствующих сохранению жизнеспособности МБТ в макрофагах в условиях гипоксии, голодания, действия ферментов и окислителей [18, 19].

В восстановлении жизнеспособности, на наш взгляд, основную роль играют стимуляторы роста (ВКГ, МусСел DW). Предполагается, что они активизируют поступление в защитные формы водных раство-

ров, стимулируют Са-зависимые ферменты [5] и, возможно, синтез ростовых факторов, ускоряющих, даже в субпикомолярных концентрациях, рост микобактерий [20]. Появлению колоний также способствовали «слепые» пересевы, использующиеся при выделении CWD МБТ [11, 17], при которых, вероятно, переносятся ростовые факторы, обеспечивается контакт и взаимодействие клеток.

МБТ восстанавливали жизнеспособность в виде полиморфных НКУ форм с типичной для CWD МБТ морфологией [16]. То, что полученные культуры не были результатом контаминации, подтверждало наличие общих антигенов с *M. bovis* и специфичные для вида участки ДНК.

Можно предполагать, что установленное *in vitro* явление из-за природной целесообразности может происходить и во внешней среде, где есть водные растворы и условия «голодания». Более того, восстановившие жизнеспособность CWD МБТ, скорее всего, способны в ней размножаться, так как *in vitro* они растут при температуре ниже 37 °C и на простых питательных субстратах [7, 9].

Восстановившие жизнеспособность CWD МБТ при введении *per os* приживались и персистировали в организме мышей. То есть, проникая с пищей, водой, аэрозолями, они могут инфицировать людей и сельскохозяйственных животных. Маловероятно, что CWD МБТ способны быстро трансформироваться в типичные патогенные МБТ. Даже частичная реверсия при целенаправленных попытках индукции происходит крайне редко [7, 9, 17, 21]. В частности, реверсию клинического изолята L-формы МБТ удалось получить только после 13 пассажей на морских свинках [27]. Важнее то, что существует определенная связь персистенции CWD МБТ с канцерогенезом [9, 15, 16, 23, 24, 25, 26]. Результаты изучения антигенного состава полученных культур в известной степени это подтверждают. Известно, что CWD МБТ разного происхождения могут отличаться по антигенному составу [21, 22], но у восстановивших жизнеспособность культур он

был практически идентичным и не отличался от антигенного состава изолятов CWD МБТ из культуры Т-лимфоцитов человека, больного Т-лимфобластной лейкемией (Jurkat) и из клеток почки эмбриона овцы, инфицированных вирусом бычьего лейкоза (FLK-BLV) [15, 16]. Нельзя исключить, что CWD МБТ, поступающие в организм из внешней среды, могут быть фактором риска возникновения опухолей [26].

Восстановившие жизнеспособность CWD МБТ отличались не только повышенной устойчивостью, но и полной резистентностью к определенным дезинфектантам. В частности, рост CWD МБТ № 2 «Глутаровый альдегид» не подавляла «своя» дезинфицирующая композиция. Вероятно, МБТ каким-то образом кодировали информацию о летальном агенте, а, восстанавливаясь, экспрессировали факторы защиты белков и ДНК. Так как штамм CWD МБТ № 2 «Глутаровый альдегид» оказался резистентным и к ПГМГ, разрушающим цитоплазматические мембраны за счет электростатического взаимодействия с кислыми фосфолипидами [28], можно предположить, что в каких-то генах МБТ кодируется информация о факторах защиты, а восстановившиеся клетки экспрессируют функционирование защитных механизмов. Вероятно, механизм защиты мог становиться универсальным, так как при повторных контактах изолятов с дезинфектантами, оказывавших ингибирующее действие, резистентность появлялась уже после 1–2 контактов.

Безусловно, существование МБТ во внешней среде и образование защитных форм при стрессах нуждаются в дальнейшем изучении, но уже сейчас ясно, что дезинфекция борется с формой МБТ, вызывающей туберкулез, но не исключает проблему восстановления их жизнеспособности и возможных эффектов, вызываемых восстановившими жизнеспособность CWD МБТ. Если процесс восстановления жизнеспособности МБТ невозможно предотвратить, замедлить образование CWD МБТ можно ротацией дезинфектантов с разными АДВ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Модель, Л.М. Биология и биохимия туберкулезных микобактерий / Л.М. Модель. – М., 1952. – 247 с.
2. Колычев, Н.М. Методы индикации и обезвреживания микобактерий туберкулеза на объектах внешней среды: дис. д-ра ... ветеринар. наук / Н.М. Колычев. – Омск, 1983. – 436 с.
3. Sporulation in mycobacteria / J. Ghosh [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009, 106 (26):10781-10786.
4. Identification and Characterization of a Spore-Like Morphotype in Chronically Starved *Mycobacterium avium* Subsp / E. Lamont [et al.] // *Paratuberculosis Cultures*. PLoS. – 2012. – 7(1).
5. Власенко, В.В. Туберкулез в фокусе проблем современности / В.В. Власенко. – Винница: Наука, 1998. – 350 с.
6. Изучение термической устойчивости микобактерий туберкулеза / А.П. Лысенко [и др.] // *Проблемы туберкулеза и болезней легких*. – 2007. – № 2. – С. 42–46.
7. 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. – № 1-2. – P. 55–73.
8. Лысенко, А.П. Микобактерии туберкулеза при термическом воздействии образуют защитные формы, проходящие через ультрафильтры и восстанавливающие жизнеспособность в виде CWD форм / А.П. Лысенко, М.В. Кучвальский, В.В. Власенко // *Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария*. – 2019 – № 1. – С. 33–45.
9. Mattman, L. Cell Wall Deficient Forms – Stealth Pathogens. CRC Press Boca Raton 3rd ed., 2001. – 416 p.
10. Nyka, W. Studies on the Effect of Starvation on Mycobacteria / W. Nyka. // *Infection and Immunity*. – 1974. – Vol. 9. – № 5. – P. 843–850.
11. Slavchev, G. Stress-induced L-forms *Mycobacterium bovis*: a challenge to survivability / G. Slavchev, L. Michailova, N. Marcova // *New Microbiologica* 2013; 36: 157–166.
12. Ferrán, J. Note relative aux aptitudes saprophytes du bacilli de la tuberculose, a ses affinités avec le bacille du typhus et le coli-bacille et aux propriétés immunisantes et thérapeutiques que possède ce bacilli converti en saprophyte. *Comptes rendus de l'academia de sciences de Paris. Séance du 11 octobre 1897. Tome 125*. – P. 515–518.
13. Ferrán, J. Evolucion de la tuberculosis. Zaragosa, Clinica Moderna, Enero, 1903.
14. Выявление микобактерий туберкулеза в тканях с помощью дифференцирующей иммунопероксидазной окраски / А.П. Лысенко [и др.]. // *Туберкулез и болезни легких*. – 2014, № 10. – С. 55–58.
15. Further evidence for Cancer as Cell-wall-deficient Mycobacterial Disease / A.P. Lysenko [et al.] // *Journal of Molecular Pathological Epidemiology*. – 2016. – Vol. 1. – № 1:8. – P. 1–12.
16. Вирус бычьего лейкоза – вирусоподобная форма микобактерий туберкулеза? / А.П. Лысенко [и др.] // *Экология и животный мир*. – 2019. – № 1. – С. 15–25.
17. Markova, N. Unique biological properties of *Mycobacterium tuberculosis* L-form variants: impact for survival under stress / N. Markova, G. Slavchev, L. Michailova // *International Microbiology*, 2012; 15:61–68.
18. On the killing of mycobacteria by macrophages / L. Jordao [et al.] // *Cell Microbiol*. – 2008. – 10. – P. 529–548.
19. Richter K., Haslbeck M., Buchner J. The heat shock response: life on the verge of death. *Mol Cell*. – 2010. – 40. – P. 253–266.
20. A family of autocrine growth factors in *Mycobacterium tuberculosis* / G. Mukamolova [et al.] // *Molecular Microbiology* 2002; 46 (3): 623–35.
21. Diller, I. Three similar strains of pleomorphic acid-fast organisms isolated from rat and mouse tissues and from human blood. *Am. Rev. Resp. Dis.*, 1962 Dec; 86:932-935.
22. Особенности антигенного состава измененных форм микобактерий туберкулеза / А.П. Лысенко [и др.] // *Проблемы туберкулеза и болезней легких*. – 2010. – № 10. – С. 54–58.
23. Guliang, H., Tefu, L. *Mycobacterium tuberculosis* L-forms. *Microbial Ecology in Health and Disease* 1999; 10: 129-133.
24. Tian Yan-sheng, Cui Xing-kun, Zhang Wei, et al. Detection of *Mycobacterium tuberculosis* L forms and MPB 64 gene in breast cancer tissues. *J. of Practical Medicine*; 2013-15.
25. Yansheng Tian, Tong Hao, Bin Cao et al. Clinical End-Points Associated with *Mycobacterium tuberculosis* and Lung Cancer: Implications into Host-Pathogen Interaction and Coevolution. *Bio Med Research Intern*. Vol. 2015.
26. Broxmeyer, L. Cancer and the Science of Denial. *J. Tumor Med Prev* 2017. – Vol. 1. – Issue 3. – P. 1–25.
27. Земскова, З.С. Скрыто протекающая туберкулезная инфекция / З.С. Земскова, И.Р. Дорожкова. – М.: Медицина, 1984. – 222 с.
28. Maris, P. Modes of action of disinfectants. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 1995,14.