

Лысенко А.П., доктор ветеринарных наук, профессор¹

Кучвальский М.В., младший научный сотрудник¹

Притыченко А.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент¹

Красникова Е.Л., научный сотрудник¹

Аникиевич Н.Ю., студент²

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

²Белорусский государственный университет, г. Минск

КОНТАМИНАЦИЯ ЭМБРИОНАЛЬНЫХ БЫЧЬИХ СЫВОРОТОК ТРАНСФОРМИРОВАННЫМИ МИКОБАКТЕРИЯМИ ТУБЕРКУЛЕЗА

Резюме

В коммерческих сериях эмбриональных сывороток (FBS) обнаружен геном микобактерий туберкулеза (МБТ) и выделены МБТ с дефектной клеточной стенкой (*cell wall deficient – CWD*), что явно связано с широким распространением латентной туберкулезной инфекции, не выявляемой туберкулином и традиционными бактериологическими методами. Серьезность проблемы такой контаминации подтверждена выделением CWD МБТ из живых и инактивированных вирус-вакцин, которые получались с применением FBS. Изолятами из FBS и вакцин демонстрировали присущие CWD МБТ адаптивные свойства, выдерживали экстремальное нагревание и действие химических веществ.

Указано на необходимость контроля FBS на присутствие генома МБТ и путем посева на специальную питательную среду после инкубации в стимуляторе роста, так как контаминированные вакцины могут повышать риск онкологических процессов, а у крупного рогатого скота в определенных случаях – индуцировать реакции на туберкулин.

Ключевые слова: латентный туберкулез, дефектная клеточная стенка, эмбриональные бычье сыворотки.

Summary

In commercial lots of fetal bovine serum (FBS), the tuberculosis mycobacteria (MTB) genome was detected and with cell wall deficient (CWD) MTB were isolated. It is clearly associated with the widespread latent tuberculosis infection that is not detected by tuberculin test and traditional bacteriological methods. The seriousness of the problem of such contamination was confirmed by the isolation of CWD MTB from live and inactivated virus vaccines that were obtained using FBS. Isolates from FBS and vaccines demonstrated adaptive properties inherent in CWD MTB, withstood extreme heating and chemical action.

It is indicated that it is necessary to control FBS for the presence of the MTB genome and by inoculating on the special nutrient medium after incubation in the growth stimulant due to the risk of neoplastic processes increased by contaminated vaccines, and due to induced reactions to bovine tuberculin in certain cases.

Keywords: latent tuberculosis, deficient cell wall, fetal bovine sera.

Поступила в редакцию 13.12.2022 г.

ВВЕДЕНИЕ

Вирусы для приготовления вакцин выращивают на культурах клеток (КК). В состав культуральной питательной среды, как правило, включают фетальную бычью сыворотку (*fetal bovine serum – FBS*), содержащую необходимые факторы роста [1].

FBS также называют эмбриональной сывороткой, хотя чаще ее получают в поздний плодный период. В вирусологии используются также сыворотки крови молодых бычков (до 3 лет).

Как правило, партия FBS объединяет материал с разных ферм, и если в нее попадает сыворотка от инфицированного животного, вся партия может быть контаминирована. Для стерилизации FBS трехкратно фильтруют, используя на заключительном этапе фильтр с порами 100 нм. Дополнительно FBS может быть простериллизована гамма-облучением (до 25 кГр).

FBS проверяют на отсутствие целого ряда патогенов [2]. Вместе с тем, сообщается о контаминации FBS, в частности пе-

стивирусами [3, 4, 5]. Учитывая, что реализуемые на мировом рынке объемы FBS заметно превосходят официальные данные по ее заготовке, не исключается фальсификация продукта, например, путем добавления бычьего сывороточного альбумина, воды и ростовых факторов. Нередко FBS получают в странах с неблагоприятным инфекционным статусом стад-доноров, а реализуют как произведенную в благополучных регионах [5, 6]. Все это повышает риск возможной контаминации FBS, в особенности слабо изученными или трансформированными инфекционными агентами, а рекомендуемые методы контроля не всегда позволяют выявить контаминацию. В первую очередь это касается туберкулезной инфекции, которую рекомендуют исключать классическими методами без учета изменчивости микобактерий туберкулеза (МБТ) [2]. Сейчас уже достоверно известно, что МБТ могут образовывать фильтрующиеся вирусоподобные [7] и спороподобные формы [8], существовать в виде бактериальных полиморфных некислотоустойчивых (НКУ) форм (с дефектной клеточной стенкой – cell wall deficient – CWD) [9] и даже в виде ультрамелких термостабильных форм, способных проходить через ультрафильтры нанометрового диапазона [10]. Это выглядит необычно с позиций мономорфизма МБТ, но вполне адекватно с точки зрения происхождения МБТ, которые относятся к порядку *Actinomycetales*. Его представители могут развиваться стадийно, формируя ветвящийся мицелий, распадающийся на отдельные клетки, образуют гидрофобные, термоустойчивые споры, активизирующиеся при повышении влажности стимулирующей дыхание, актиномицеты синтезируют ферменты и имеют локусы в РНК и ДНК, определяющие образование ростовых трубок. Также характерным является образование скопление переплетенных нитевидных форм с колбовидными утолщениями на концах.

В XX веке, как и ранее, туберкулез крупного рогатого скота был широко распространен [11]. В основу борьбы с болезнью было положено выявление зараженных особей туберкулином и удаление их из стад. Критериями оздоровления считаются до сих пор отрицательные результа-

ты туберкулинизации в стаде, отсутствие видимых туберкулезных изменений в тканях при ветсанэкспертизе туш и отрицательные результаты бактериологического посева и биологической пробы [12, 13]. Однако даже по представлениям конца прошлого века это не гарантирует отсутствия в стаде животных, инфицированных МБТ. Чувствительность туберкулиновой пробы не достигает 100 % [14], а до 5 % зараженных животных вообще могут быть анергичны к туберкулину [15]. Более того, постоянное проведение противотуберкулезных мероприятий приводит к санации среды обитания животных и снижению риска попадания в организм больших доз вирулентного возбудителя, а проникающие единичные МБТ переводятся иммунной системой в дормантное состояние, в L-, CWD-формы, предотвращая развитие макроскопических туберкулезных изменений и клинического проявления болезни [16, 17]. Такая латентная инфекция может незаметно протекать пожизненно, так L-(CWD) формы практически не индуцируют гиперчувствительность замедленного типа (ГЗТ) к стандартному туберкулину [18, 19, 20], и инфицированные животные могут длительно оставаться не выявленными. Показателем того, что скрытая туберкулезная инфекция может быть в стадах стран, которые давно считаются свободными от туберкулеза крупного рогатого скота, может быть и факт обнаружения ДНК *M. bovis* в ультрапастеризованных молочных продуктах из этих стран [21, 22].

Целью работы являлось исследование фетальных бычьих сывороток, живых и инактивированных вирусных вакцин с использованием полимеразной цепной реакции и методов выявления трансформированных микобактерий туберкулеза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали случайным образом отобранные:

- 4 длительно хранившиеся при минус 20 °С FBS ГУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии» серий №№ 51 (изг. 05/2001), 030301/к 847 (до 03. 2002), с 268 к205 (до 12.93), BN (до 12.94);

- «нормальную» сыворотку крупного рогатого скота (серия NBS);

- 3 серии FBS для выращивания КК – № 1 «Bioclot» (Бразилия) с. 2177 (до 06/2019), № 2 «Gibco» (Бразилия) с. 2260087, (до 08/2025), № 3 Bioclot 1 с. 20100117 (до 10 2022 г.);

- 1 серию «живой» вакцины «С»,

- 3 серии вакцины «SVC» (1 - до 2023/04/11, 2 – до /2023/08/07, 3 – до 2023/08/05), инактивированной β-пропиолактоном (вакцины получены на культурах клеток, выращенных с добавлением FBS).

Для посева FBS отбирали одноразовыми шприцами и смешивали (1:2) со стимулятором роста MycCel DW [23]. FBS № 1 «Bioclot» и № 2 «Gibco» дополнительно фильтровали через Millex GP 0.22 μm, фильтрат смешивали (1:2) со стимулятором роста MycCel DW.

При посеве вакцин использовали флаконы, из которых с соблюдением стерильности было отобрано содержимое для проведения вакцинации. Из 5 флаконов каждой серии вакцины, а также с 5 пустых стерильных флаконов (контроль) были сделаны смывы (1,3–1,4 мл) стимулятором роста ВКГ [24]. Смеси сывороток и смывы с флаконов со стимулятором роста 48 ч инкубировали при 37 °C и высевали на среду MycCel DW [23] (по 300 мкл на 3 пробирки). Посевы инкубировали при 3 °C. При отсут-

ствии роста делали «слепые» пересевы на среде MycCel DW.

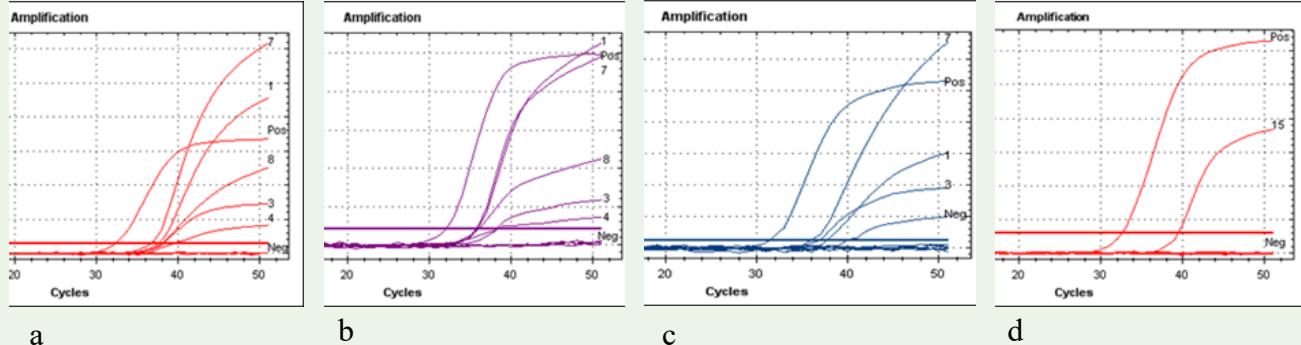
Мазки изолятов окрашивали по Kinyoun, в отдельных случаях – дополнительно дифференцирующим иммунопероксидазным методом (ДИП) [25]. Микроскопию проводили на Olimpus B51X, 10x100.

ДНК из сывороток и изолятов выделяли с помощью «РИБО-преп» (Am plisens, РФ). ПЦР проводили с использованием набора «Амплитуб» (Синтол, РФ) на Bio-Rad Real-Time CFX96.

Антителный состав соникатов изолятов изучали в реакции иммунодиффузии (РИД), в ракетном иммуноэлектрофорезе [Axelsen et al, 1977], а также в электрофорезе в 10 или 12 % ПААГ-ДСН (Laemmli 1970) с последующим иммуноблоттингом. В работе использовали антисыворотки к соникатам *M. tuberculosis* H₃₇Rv, *M. bovis* 8 и изолятам, идентифицированным как CWD МБТ.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ПЦР-RT ДНК из 8 сывороток в 6 случаях дала реакцию с праймерами для комплекса *tuberculosis-bovis* и собственно *M. bovis* (рисунок 1 а, б, д). Неожиданным было то, что ДНК 3 позитивных проб реагировала еще с праймерами для *M. tuberculosis* (рисунок 1 с, таблица 1).



а – для комплекса *tuberculosis-bovis*, б, д – *M. bovis*; в – *M. tuberculosis*.

Амплификаты сывороток: 1 – FBS № 1; 2 – FBS № 2; 3 – FBS 030;

4 – FBS 51; 5 – NBS; 6 – FBS 268; 7 – FBS BN; 15 – FBS № 3

Рисунок 1. – ПЦР-РТ с праймерами

5 исследованных проб FBS и NBS дали рост на среде MycCel DW (таблица 1) полиморфных палочковидных форм и коккоидов с КУ элементами (рисунок 2). Серии FBS (BN, 51, 030) и NBS дали рост в I, FBS № 2/0.22 – в III, а FBS №1 – в V «сле-

пом» пересеве. В изолятах присутствовали клетки с характерной для CWD МБТ морфологией [23], в том числе с кислотоустойчивыми (КУ) фрагментами красного цвета (рисунок 2). В изоляте из FBS № 2/0.22 наряду с нитевидными и палочковидными

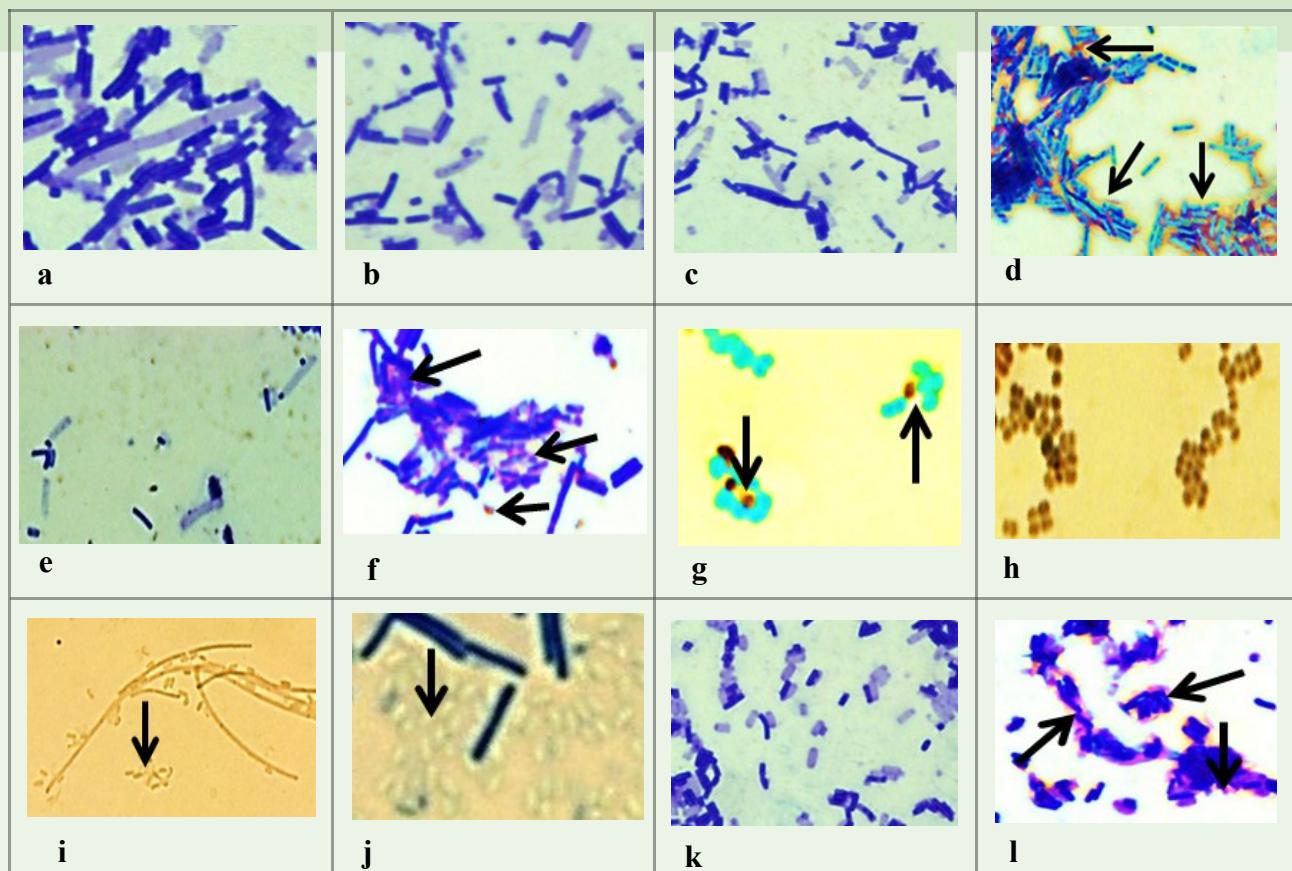
формами присутствовали «пустые» спороподобные формы, образуемые CWD МБТ в неблагоприятных условиях (рисунок 2 i, j, стрелки). Как палочковидные формы, так и коккоиды (рисунок 2 g) содержали общие антигены с типичными МБТ и при ДИП-

окраске с Ig к *M. bovis* специфически окрашивались в коричневый цвет (рисунок 2).

Посев «живой» вирус-вакцины «С» во II «слепом» пересеве дал рост нитевидных и полиморфных палочковидных НКУ форм (рисунок 3).

Таблица 1. – Результаты исследования сывороток

Сыворотки	ПЦР с ДНК из сыворотки, С (т)	Результат посева
FBS 51	37, <i>M. bovis</i>	CWD МБТ
FBS 030	37–38, <i>M. bovis</i> , <i>M. tuberculosis</i>	CWD МБТ
FBS BN	36, <i>M. bovis</i> , <i>M. tuberculosis</i>	CWD МБТ
FBS № 1	37, <i>M. bovis</i> , <i>M. tuberculosis</i>	CWD МБТ
FBS № 3	38 <i>M. bovis</i>	не исследовали
FBS 268	отр.	не исследовали
FBS № 2	отр.	CWD МБТ
NBS	отр.	CWD МБТ



Рост изолятов: а, б –FBS 51 во 2 «слепом» пересеве;
с, д – FBS 030 в 1 «слепом» пересеве; е, ф – FBS BN в 1 «слепом» пересеве;
г, х – FBS № 1 в 5 «слепом» пересеве; и, ж – FBS № 2/0.22; к, л – NBS.
Стрелками обозначены КУ фрагменты и защитные формы. х, и – ДИП-окраска

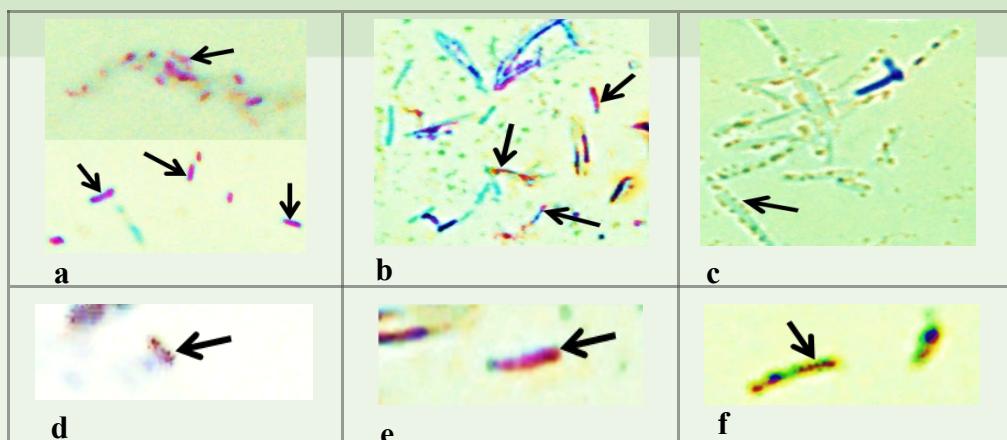
Рисунок 2. – Плеоморфизм изолятов из эмбриональных сывороток



Рисунок 3. – Рост «живой» вирус-вакцины «С» во II «слепом» пересеве

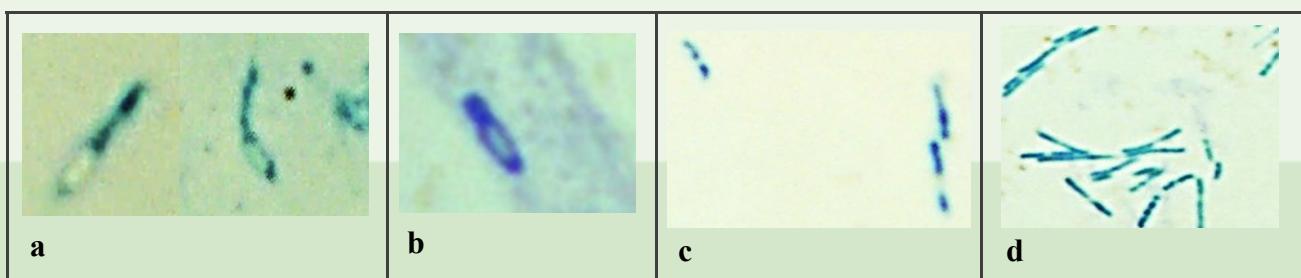
При появлении признаков роста в посевах SVC в мазках обнаруживали кластеры частично кислотоустойчивой (ЧКУ) зернистости (рисунок 4а), слабоокрашенные палочковидные формы (рисунок 4 с), а также палочковидные формы с КУ (красного цвета) фрагментами (рисунок 4 а, б, д, е, ф). В первичном росте посевов вакцины SVC и в пересевах присутствовали и «пустые» клетки с характерной морфологией (рисунок 5 а, б). Вероятно, они образовывали палочковидные формы, в том числе достаточно длинные, с продольными «вставками» и зернами (рисунок 5 с, д), которые превалировали в дальнейших

пересевах. При длительном культивировании изолятов (Is SVC) в мазках появлялись «пустые» клетки и веретеноподобные клетки с КУ зернами (рисунок 6 а), которые после пересева давали рост полиморфных палочек (рисунок 6 б). Заметное накопление бактериальной массы изолята IsSVC1 началось через 2 суток, а у IsSVC2 и IsSVC3 – через 24 ч. В посевах вакцины SVC1 и SVC2 через 1–3 дня стал заметен тонкий «газон». Последующие пересевы дали интенсивный рост колоний. Для получения роста SVC3 потребовалось 6 «слепых» пересевов (рисунок 6 с). В посевах контрольного смыча с флаконов роста не было.



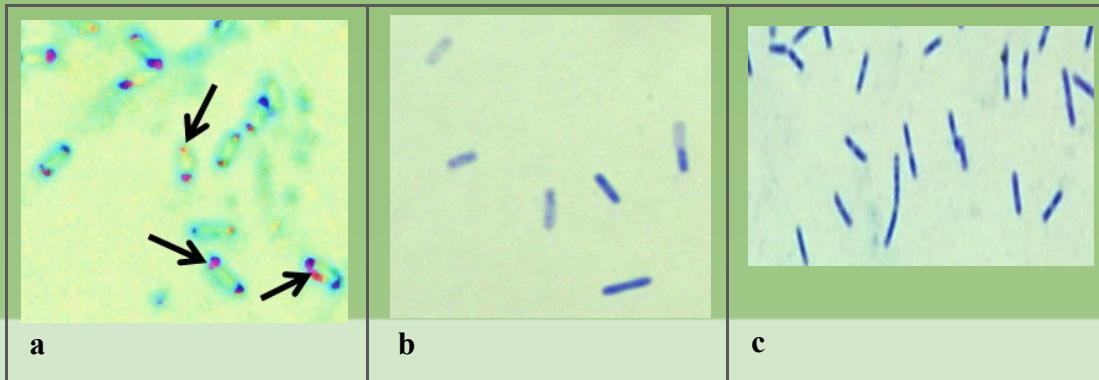
a, d - SVC1; b, e, c – SVC2, f – SVC3. Стрелками обозначены КУ зерна и палочковидные формы с КУ фрагментами

Рисунок 4. – Начало роста изолятов из серий вакцин «SVC»



«Пустые» клетки, образующие палочковидные формы: а – SVC1, б – SVC3; палочковидные формы со «вставками» и зернами: с – SVC1, д – SVC3

Рисунок 5. – Первичный рост посевов вакцин «SVC»

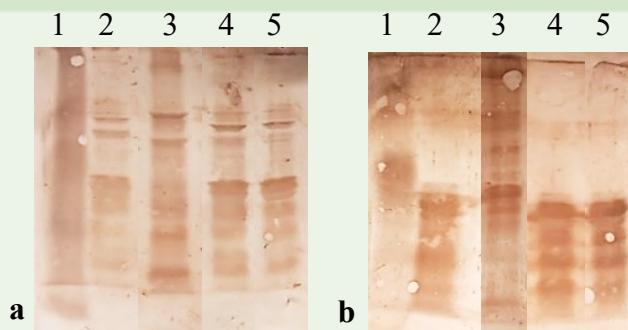


a, b – Is SVC1, c – Is SVC3. a – рост IsSVC1 без пересева, «пустые» клетки с КУ зернами (стрелки), b – рост после пересева, c – рост в б «слепом» пересеве

Рисунок 6. – Рост изолятов из вакцин «SVC»

То, что IsSVC имели родство с МБТ, было заметно в иммуноблоттинге, где у Is SVC антисывороткой к *M. Tuberculosis* H₃₇Rv выявлялось до 23–27 полипептидных антигенов, хотя их спектр нес-

колько отличался от CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv и изолятов CWD МБТ из мокроты людей с латентной инфекцией, которые были почти идентичны CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv (рисунок 7 а, б).



1 – *M. tuberculosis* H₃₇Rv; 2 – CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv; 3 – IsSVC1;
4, 5 – CWD МБТ «Shum Nalk» и «Lil 0.22 μ m».
а – а/с к *M. tuberculosis* H₃₇Rv, б – к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv

Рисунок 7. – ЭФ в 12 % ПААГ-ДСН и иммуноблоттинг

Принадлежность IsSVC к CWD МБТ подтверждало и то, что им были присущи уникальные адаптивные свойства МБТ [10]. После прогревания при 98 °C и обработки 3%-ной щавелевой кислотой большинство клеток IsSVC трансформировались в «пустые» «защитные» формы (рисунок 8), но после инкубации в стимуляторе роста и посева на среду MycoCel DW они давали рост характерных для CWD МБТ палочковидных форм (рисунок 8). Их принадлежность к комплексу *tuberculosis-bovis* подтверждалась в ПЦР-RT (таблица 2), при этом выросшие IsSVC (имеют окончания типа «номер серии / режим инактивации»: 1/98°, 2/98°, 1/oxal, 2/oxal) принципиально

не отличались по полипептидному и антигенному составу.

Особый интерес представляло сравнение изолятов из FBS и вирус-вакцин. Изолят из FBS, так же как и из вакцин, при экстремальных воздействиях образовывали «защитные» формы и меняли морфологию, что сопровождалось существенным снижением возможности получить их ДНК и идентифицировать в ПЦР (таблица 3, рисунок 9). Только помещение клеток в воду или в лизирующий буфер вызывало изменение их морфологии и появление КУ фрагментов у клеток (рисунок 9). Замораживание приводило к потере способности воспринимать окраску и появлению «за-

щитных» форм. IsFBS после размораживания и прогревания восстанавливали морфологию, хотя и отличавшуюся от первоначальной. После нагревания клеток в лизирующем буфере без предварительного

замораживания в мазках были единичные неокрашивающиеся палочки с КУ элементами, но при этом количество ДНК в суспензии достигало 235 нг/мл, что позволяло проводить идентификацию в ПЦР.

Режим инактивации	Исходная морфология		Рост через 48 часов	
	SVC1	SVC2	SVC1	SVC2
98 °C				
3% C ₂ H ₂ O ₄				

Рисунок 8. – IsSVC1 и IsSVC2 после прогревания (98 °C) и воздействия щавелевой кислоты, рост обработанных суспензий на среде MycCel DW

Таблица 2. – ПЦР-RT IS6110 с ДНК изолятов

Изоляты	C (t)
Положительный контроль	29,90
IsSVC 1/98°	37,87
IsSVVC 2/oxal	38,59
К-	не обнаружено

Родство изолятов из FBS и вирус-вакцин подтверждалось близким антигенным составом (рисунок 10, слияние преци-

питатов в РИД), хотя концентрация индивидуальных антигенов несколько различалась (рисунок 11).

Таблица 3. – Экстракция ДНК из IsFBS при замораживании и прогревании (концентрация ДНК, нг/мл)

Изоляты	Замораживание и прогревание в воде	Прогревание в воде	Замораживание и прогревание в лизирующем буфере	В лизирующем буфере после прогревания
Is FBS1	0	0	12	268
Is FBS2 022	14,5	191	61	235

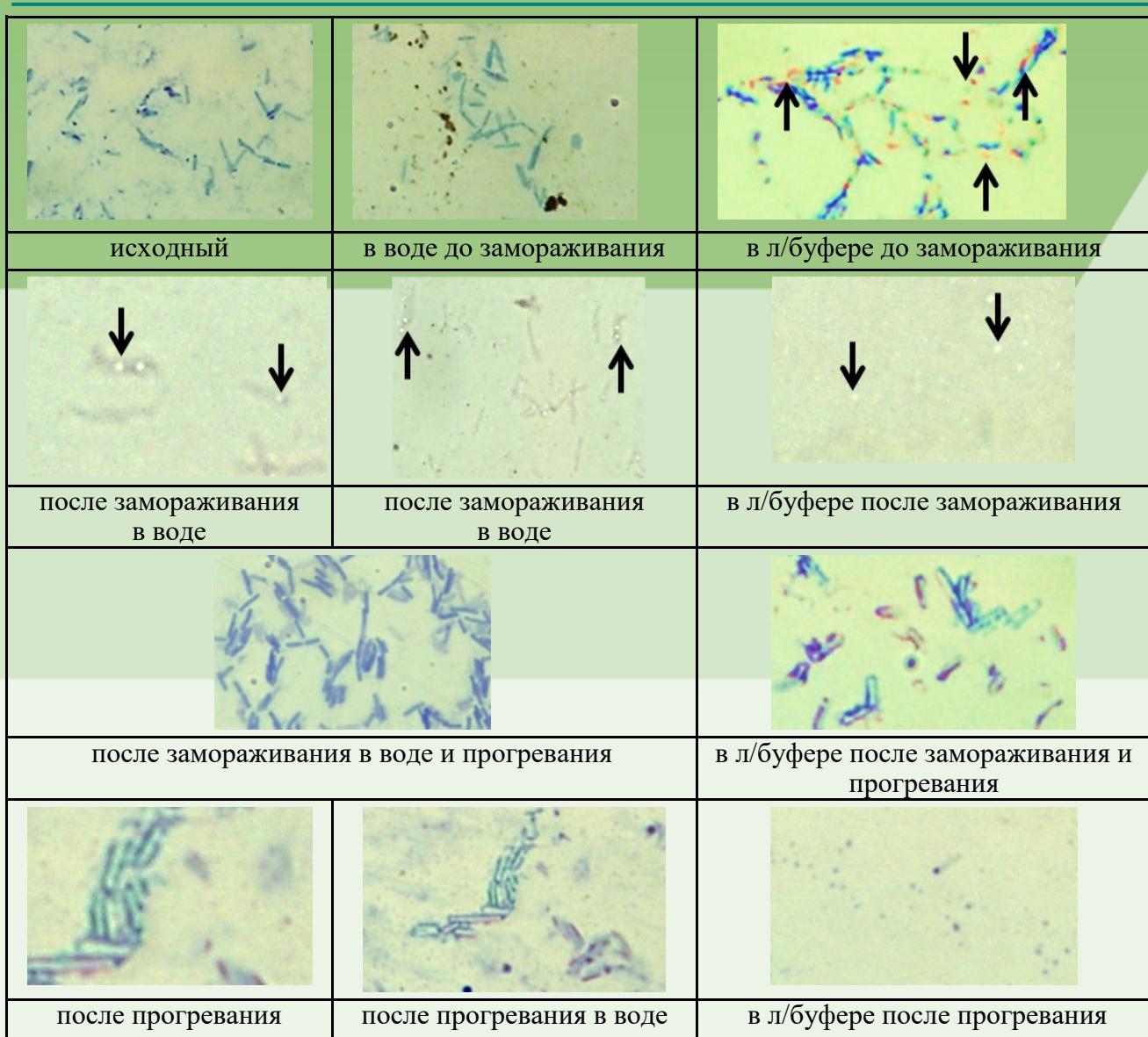
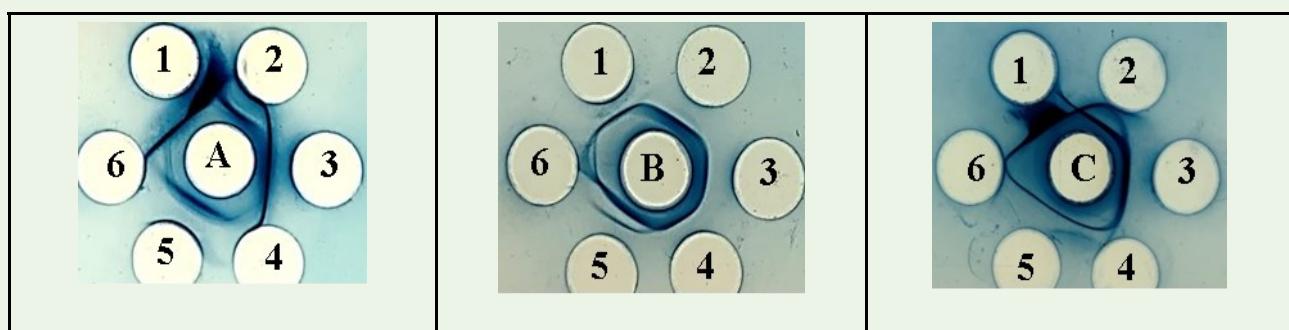
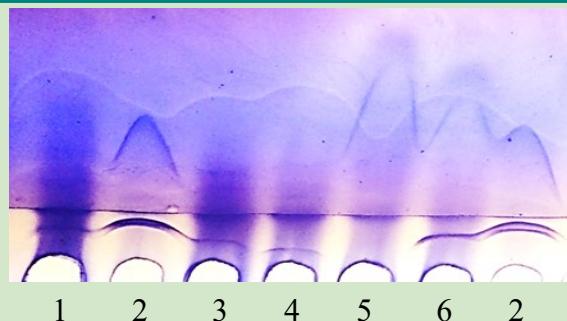


Рисунок 9. – Изменение морфологии IsFBS2 при замораживании и прогревании в воде и лизирующем буфере (л/буфере)



В центре антисыворотки: А – к CWD МБТ «Br 2»; В – к CWD МБТ «Is FLK-BLV HC»; С – к CWD МБТ «Is Hela 3 kDa»; по периферии соникаты: 1 – Is FBS 0.22; 2 – Is Sino 2/oxal; 3 – Is SpV; 4 – Is FBS c. 30; 5 – Is FBS 50; 6 – Is NBS

Рисунок 10. – Иммунохимическое родство изолятов из FBS и вирус-вакцин



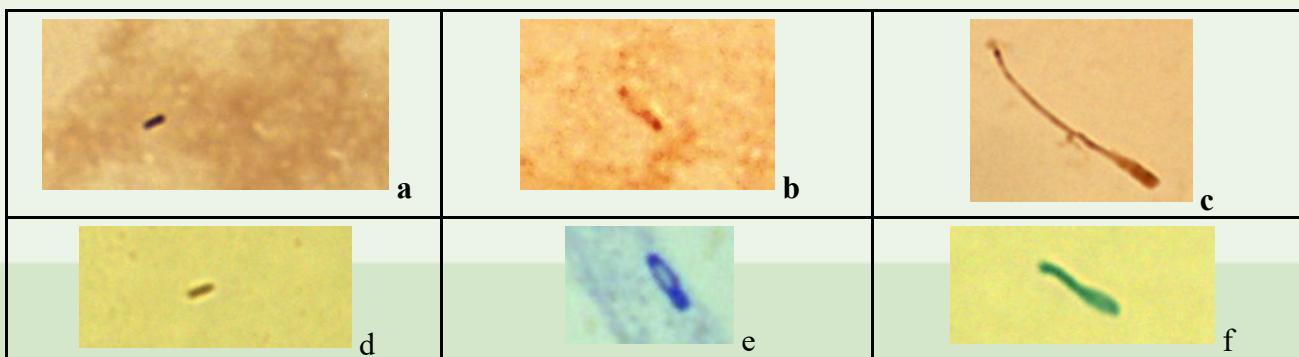
1 – IsFBS 51; 2 – IsFBS№2/ 0.22; 3 – IsSVC 1/98⁰; 4 – IsSVC 2/98⁰;
5 – IsSVC3 3; 6 – IsC. В агарозе а/с к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv (58 мкл/см³)

Рисунок 11. – РИЭФ соникаторов

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Неожиданным оказалось обнаружение генома МБТ в большинстве исследованных эмбриональных сывороток (FBS), причем полученных не только в конце 90-х годов прошлого века во время сложной эпизоотической ситуации, но и в настоящее время, причем ведущими мировыми производителями. Более того, с помощью специального стимулятора роста и питательной среды из FBS удалось выделить CWD МБТ. Вряд ли FBS получали от явно больных животных, скорее, причина заключается в широком распространении латентной туберкулезной инфекции, не выявляемой туберкулином и традиционными бактериологическими методами [26]. Так как FBS подвергают стерилизующей фильтрации, через фильтр (0,1 мкм) могла пройти ДНК и вирусоподобные формы МБТ [27], которые могли восстанавливаться в бактериальные CWD-формы даже при хранении и использовании сывороток. В мазках FBS3 Bioclot #20100117, окрашенных ДИП-методом с использованием

ем антител к *M. bovis*, были обнаружены характерные клетки и антигены CWD МБТ (рисунок 12). То есть вирусоподобные формы МБТ прошли через стерилизующие фильтры и начали восстанавливаться в бактериальные формы во время транспортировки и хранения препарата при 3–8 °С, используя FBS как питательную среду. Вероятно, такой процесс в условиях выращивания культур клеток мог идти интенсивнее, вплоть до образования КУ форм [28]. Не удивительно, что CWD МБТ удалось выделить не только из «живой» вирус-вакцины, но и из вакцин, инактивированных β-пропионлактоном. Изоляты, в том числе и из FBS, демонстрировали присущие CWD МБТ адаптивные свойства, выдерживая экстремальное нагревание и действие химических веществ. При этом замечено, что в определенных случаях было трудно обнаружить ДНК CWD МБТ из-за образования «защитных» форм, что могло приводить к получению отрицательных результатов ПЦР.



a, b, c – FBS3 Bioclot #20100117; f – CWD *M. bovis* BCG и выделенные
d, e – из вакцины SVC3; a, b, c, d – ДИП-окраска, e, f – Kinyoun

Рисунок 12. – Похожие формы клеток различных изолятов CWD МБТ

Изоляты из вакцин и эмбриональных сывороток были похожи по антигенному составу, хотя и не всегда идентичны. Их происхождение еще вызывает вопросы, в особенности в связи с тем, что в некоторых сериях FBS и в изолятах одновременно обнаруживали геном *M. bovis* и *M. tuberculosis*.

В целом полученные результаты указывают на необходимость контроля эмбриональных сывороток на присутствие генома методом ПЦР и фильтрующихся форм МБТ путем посева на специальную питательную среду после инкубации в стимуляторе роста. Это связано с тем, что «защитные» фильтрующиеся формы МБТ явно восстанавливают жизнеспособность в условиях культивирования культур клеток в бактериальные CWD-формы, которые

могут попадать в вакцины, и в свою очередь при возникновении неблагоприятных условий (инактивация химическими веществами) циклически снова трансформироваться в «защитные» фильтрующиеся формы. Попадание таких форм в организм сразу не вызывает явных патологических процессов, но их длительная персистенция вполне вероятно может индуцировать неопластические процессы [29].

Нельзя исключать, что вирусные вакцины для крупного рогатого скота, полученные с использованием контаминированной эмбриональной сыворотки, могут индуцировать у животных латентную туберкулезную инфекцию, в определенных случаях с развитием реакций на туберкулины.

ЛИТЕРАТУРА

1. Gstraunthaler, G. A plea to reduce or replace fetal bovine serum in cell culture media / G. Gstraunthaler, T. Lindl, J. van der Valk // Cytotechnology. – 2013. – Vol. 65, № 5. – P. 791–793.
2. Tests for Extraneous Agents in Viral Vaccines for Human Use // European Pharmacopoeia 10.6. – The European Directorate for the Quality of Medicines & HealthCare. – Brussels, 2020. – 2.6.16. – P. 4579.
3. Genetic diversity of bovine viral diarrhea viruses in commercial bovine serum batches of Chinese origin / S.-Q. Zhang [et al.] // Infection, Genetics and Evolution. – 2014. – Vol. 27. – P. 230–233.
4. Detection and genetic identification of pestiviruses in Brazilian lots of fetal bovine serum collected from 2006 to 2014 / F. L. Monteiro [et al.] // Pesq. Vet. Bras. – 2018. – Vol. 38, № 3. – P. 387–392.
5. Глотов, А. Г. О контаминации импортируемой фетальной сыворотки крупного рогатого скота пестивирусами как факторе распространения вирусной диареи в условиях глобализации: мини-обзор / А. Г. Глотов, Т. И. Глотова, С. В. Котенева // Сельскохозяйственная биология. – 2018. – Т. 53, № 2. – С. 248–257.
6. The Impact of BVDV presence on fetal bovine serum used in the biotechnology industry. // Advances in medicine and biology / R. B. Flatschart [et al.] ; ed. L. V. Berhardt. – New York, 2016. – Vol. 95. – Ch. 4. – P. 75–95.
7. Markova, N. Unique biological properties of *Mycobacterium tuberculosis* L-form variants: impact for survival under stress / N. Markova, G. Slavchev, L. Michailova // International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology. – 2012. – Vol. 15, № 2. – P. 61–68.
8. Sporulation in mycobacteria / J. Ghosh [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2009. – Vol. 106, № 26. – P. 10781–10786.
9. 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. – P. 193–216.
10. 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. – Т. 1, № 1. – С. 33–45.
11. Frith, J. History of Tuberculosis. Part 1 – Phthisis, consumption and the White Plague / J. Frith // Journal of Military and Veteran's Health. – 2014. – Vol. 22, № 2. – P. 29–35.
12. Об утверждении санитарных и ветеринарно-санитарных правил по профилактике и ликвидации заболеваний, общих для человека и животных. Туберкулез : постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь и Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь, 26 марта 2010 г., № 31/21 (в ред. постановления Минздрава, Минсельхозпрода

от 15.12.2010 № 166/91) // Эталон-Беларусь [Электронный ресурс] / Нац. центр правовой информации Республики Беларусь. – Минск, 2010.

13. Ветеринарно-санитарные правила профилактики, диагностики и ликвидации туберкулеза животных : Постановление Министерства сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь 23.02.2018 № 32 // Эталон-Беларусь [Электронный ресурс] / Нац. центр правовой информации Республики Беларусь. – Минск, 2010.

14. Лысенко, А. П. Чувствительность и специфичность внутрикожной туберкулиновой и симультанной пробы при туберкулезной инфекции в стаде / А. П. Лысенко // Наше сельское хозяйство. – 2016. – № 6. – С. 2–6.

15. Выявление больного туберкулём крупного рогатого скота в состоянии анергии к туберкулину / А. Х. Найманов [и др.] // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2019. – № 1. – С. 17–21.

16. Кузин, А. И. Латентная туберкулезная инфекция и ее значение в эпизоотологии туберкулеза крупного рогатого скота : автореф. дис. ... д-ра ветеринар. наук / А. И. Кузин. – М., 1977. – 30 с.

17. Рубцова, И. Н. Формы персистирования микобактерий в организме животных / И. Н. Рубцова, В. С. Федосеев, Н. Г. Кириленко // Проблемы борьбы с болезнями жвачных животных в северных областях Казахстана: сб. науч. тр. – Целиноград. – 1986. – Т. 68. – С. 9–15.

18. Chandrasekhar, S. Studies on cell-wall deficient non-acid fast variants of *Mycobacterium tuberculosis* / S. Chandrasekhar, S. Ratnam // *Tubercle and Lung Disease*. – 1992. – Vol. 73. – № 5. – P. 273–279.

19. Mattman, L. H. Cell wall deficient forms: stealth pathogens / L. H. Mattman. – 3rd ed. – Boca Raton : CRC Press, 2001. – 416 p.

20. Сырым, Н. С. Аллерген из Л-форм микобактерий бычьего вида для диагностики скрытой формы туберкулеза : автореф. дис. ... канд. ветеринар. наук : 16.00.03 / Н. С. Сырым. – Алматы, 2004. – 19 с.

21. 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.

22. 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.

23. 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.

24. Власенко, В. В. Туберкулез в фокусе проблем современности / В. В. Власенко. – Винница : Наука, 1998. – 350 с.

25. Выявление микобактерий туберкулеза в тканях с помощью дифференцирующей иммуно-пероксидазной окраски / А. П. Лысенко [и др.] // Туберкулез и болезни легких. – 2014. – № 10. – С. 55–58.

26. Латентная туберкулезная инфекция у крупного рогатого скота / А. П. Лысенко [и др.] // Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария. – 2022. – № 1. – С. 11–22.

27. 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. – Т. 1, № 1. – С. 33–45.

28. Вирус бычьего лейкоза - вирусоподобная форма микобактерий туберкулеза? / А. П. Лысенко [и др.] // Экология и животный мир. – 2019. – № 1. – С. 15–24.

29. 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.