

Лысенко А.П., доктор ветеринарных наук, профессор¹

Кучвальский М.В., аспирант²

Якобсон Е.И., магистрант²

Красникова Е.Л., научный сотрудник¹

Притыченко А.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент¹

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

²Белорусский государственный университет, г. Минск

ОБНАРУЖЕНИЕ МАРКЕРОВ СКРЫТОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ В УЛЬТРАПАСТЕРИЗОВАННОМ МОЛОКЕ, ПРОИЗВЕДЕННОМ В РАЗНЫХ СТРАНАХ

Резюме

В ультрапастеризованном молоке из стран, не имеющих статуса свободных от туберкулеза крупного рогатого скота и имеющих его, обнаружен геном микобактерий туберкулеза (МБТ), и из всех проб молока выделены МБТ с дефектной клеточной стенкой (cell wall deficient – CWD), что указывает на скрытую туберкулезную инфекцию в стадах, поставляющих молоко на молокоперерабатывающие предприятия.

Установлено, что в молоке присутствовали ультрамелкие (менее 0,22 мкм) термостабильные защитные формы МБТ, способные восстанавливать жизнеспособность в виде CWD МБТ и, возможно, играющие роль в индукции онкогенеза и других патологических состояний.

Существующие критерии благополучия стад не позволяют обнаружить скрытую туберкулезную инфекцию, так как персистирующие CWD (L-) формы МБТ не вызывают развития макроскопических изменений и гиперчувствительности к туберкулину. Для выявления реальной ситуации в стадах необходимо использовать ПЦР, посев крови и молока с применением специальных стимуляторов роста и питательных сред.

Ключевые слова: туберкулез крупного рогатого скота, дефектная клеточная стенка, скрытый туберкулез.

Summary

The genome of tuberculosis mycobacterium (MTB) was detected in ultrapasteurized milk from countries that have and do not have free status from bovine tuberculosis. Also cell wall deficient (CWD) MTB were isolated from all milk samples, that indicates latent tuberculosis infection in herds supplying milk to dairy enterprises.

It was found that ultrasmall (less than 0.22 μm) thermally stable protective forms of MTB were present in milk. They can restore viability as CWD MBT and possibly play a role in the induction of oncogenesis and other pathological conditions.

The existing criteria determining the status of herds do not allow the detection of latent tuberculosis infection, since persistent CWD (L-) forms of MBT do not cause the development of macroscopic changes and hypersensitivity to tuberculin. To identify the real situation in the herds, it is necessary to use PCR and to inoculate special nutrient media with blood and milk mixed with mycobacterial growth stimulants.

Keywords: bovine tuberculosis, cell wall deficient mycobacteria, latent tuberculosis

Поступила в редакцию 15.07.2021 г.

ВВЕДЕНИЕ

Туберкулез крупного рогатого скота был широко распространен в странах с развитым скотоводством. Даже в середине XX века во Франции было инфицировано 8,2 % коров, в Италии – 25 %, в Испании – 12 %, в Англии – 18 % [1]. Реализация национальных программ борьбы с туберкулезом, в основе которых была проба с туберкулином и убой выявленных инфици-

цированных коров, позволила оздоровить ряд стран Европы. В 2005 г. Австрия, Бельгия, Германия, Дания, Люксембург, Нидерланды, Словакия, Чехия, Швеция, Франция, Финляндия имели статус стран, официально свободных от туберкулеза крупного рогатого скота.

Опасность туберкулеза состоит не только в том, что он снижает продуктивность крупного рогатого скота и может вы-

зывать гибель животных, но и в том, что инфицированные и больные коровы активно выделяют *Mycobacterium bovis* с молоком. До широкого внедрения в 20–30 годы XX века термического обеззараживания молока до 30 % случаев туберкулеза человека (в том числе смертности детей младше 5 лет) были связаны с заражением микобактериями туберкулеза бычьего вида (МБТ). В частности, в 1900 г. в США от туберкулеза умерло 148 000 человек, 50 000 из них были поражены *M. bovis* [2, 3]. В настоящее время молоко также остается важным фактором переноса МБТ. Сообщается о выделении *M. bovis* из сырого молока у коров неблагополучных стад в ряде стран Южной Америки, Африки и Азии [4, 5]. Безусловно, почти все молоко подвергается термическому обеззараживанию. Используются длительный (30 мин) – при 63–65 °С, кратковременный (15–20 с) – при 72–75 °С и моментальный – при 85–90 °С режимы пастеризации. В последнее время все чаще применяют ультрапастеризацию, при которой молоко на 1–2 секунды нагревают до 135–150 °С и сразу охлаждают до 4–5 °С, что позволяет увеличить срок хранения до 6 месяцев. Вместе с тем в последнее время установлено, что пастеризация не обеспечивает полной биологической безопасности молока. Жизнеспособные микобактерии, в частности *M. avium subspecies paratuberculosis* и их геном, были обнаружены в 10,3 % допущенных к реализации упаковок полуобезжиренного пастеризованного молока [6]. Естественно, возникает вопрос о том, насколько существующие критерии благополучия стад обеспечивают биологическую безопасность молочных продуктов. Установлено, что источником туберкулезной инфекции могут быть не только явно больные животные, но и реагирующие на туберкулин коровы из стад с неопределенным статусом по туберкулезу. Как правило, у них не обнаруживают туберкулезные изменения, а при рутинном бактериологическом исследовании патологического материала не выделяют МБТ. Однако использование полимеразной цепной реакции (ПЦР) и специ-

альных методов бактериологического посева показало, что в 75 % образцов молока от таких коров присутствует ДНК МБТ, и из них можно выделить некислоустойчивые (НКУ) МБТ с дефектной клеточной стенкой (cell wall deficient – CWD) – своеобразный бактериологическим маркер туберкулезной инфекции [7]. Более того, применение методов обнаружения генома МБТ показало, что статус стран и стад, официально признанных свободными от туберкулеза крупного рогатого скота, не гарантировал реальную ликвидацию туберкулезной инфекции. ДНК *M. bovis* была обнаружена в 5 % проб ультрапастеризованных молочных продуктов в супермаркетах Испании, из которых 89,9 % были произведены в Испании, 6,6 % – во Франции, 0,8 % – в Ирландии, 0,4 % – в Италии, 0,8 % – в Германии, 0,8 % – в Нидерландах, 0,8 % – в Швейцарии [8]. То есть критерии благополучия стад и статуса здоровья животных (отсутствие животных с явными признаками болезни и отрицательные результаты внутрикожной аллергической пробы с туберкулином) явно не учитывают возможность скрытой персистенции МБТ, в том числе в виде НКУ CWD-или L-форм [9, 10], которые, как правило, не вызывают гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к классическому туберкулину [11, 12]. Тем не менее, у таких инфицированных животных могут быть обнаружены специфические антитела, антигены МБТ и их комплексы, ДНК МБТ и даже ГЗТ, но к туберкулину из L-форм МБТ [9, 10, 12, 13]. Наряду с этими фактически индивидуальными показателями статуса здоровья, глобальным маркером скрытой туберкулезной инфекции и показателем биологической безопасности молока может стать исследование больших объемов сборного молока, полученного в определенных регионах, в том числе ультрапастеризованного в коммерческих упаковках, что особенно актуально в связи с экстремальной терморезистентностью МБТ [14].

Цель работы – обнаружение маркеров туберкулезной инфекции в ультрапастеризованном молоке, произведенном в

странах с разным статусом по туберкулезу крупного рогатого скота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали 5 упаковок ультрапастеризованного молока (коммерческие названия скрыты): «E3%Sw» (Швеция), «La» (Латвия), «JU», «SU», «DU» (Украина), а также пробу «Ne» сборного молока от коров благополучного региона, подвергнутую ультрапастеризации.

Пробы «E3%Sw», «La», «JU», «SU», «DU» в стерильных пробирках Эппендорфа прогрели 15 мин при температуре 99 °С на ThermoCycler Biosan, смешали 1:3 со стимулятором роста MucCel DW [10].

I часть пробы «Ne» («Ne-chg») смешали (1:2) со стимулятором роста MucCel DW (с 0,05 % хлоргексидина), II часть («Ne 0.22») профильтровали через стерилизующий фильтр Millex GP 0.22 µm, III часть («Ne 97/0.22») прогрели при температуре 97 °С 10 мин и профильтровали через фильтр Millex GP 0.22 µm. После этого части «Ne 0.22», «Ne 97/0.22» смешали со стимулятором роста MucCel DW (1:3) [10].

Все пробы со стимуляторами роста инкубировали 24 ч при температуре 37 °С и по 0,3 мл сеяли на пробирки с питательной средой MucCel DW [10].

Посевы инкубировали при температуре 37 °С. При отсутствии роста колоний через 1-2 дня делали «слепые» пересевы на среде MucCel DW.

Мазки изолятов окрашивали по Kinyoun, а также дифференцирующим иммунопероксидазным методом (ДИП), включавшим инактивацию эндогенной пероксидазы (3 % H₂O₂), окраску по Kinyoun, обработку конъюгатом пероксидазы с аффинно очищенными антителами к *M. bovis* и проявление субстратным раствором 3,3'-диаминобензидина с H₂O₂ [15].

ПЦР. Осадок молока после центрифугирования (3000 g), а также бактериальную массу изолятов (0,2–0,5 мг/мл) суспендировали в лизирующем буфере (ИБОХ НАНБ) и прогревали 5 мин при температуре 95 °С. ДНК выделяли на аффинных колонках (ИБОХ НАНБ) и исследовали с

праймерами *Mycobacteria* 16S RNA, MPB64, MPB70, а также IS6110 (в ПЦР в реальном времени – ПЦР-RT). Амплификацию проводили на C1000TM ThermoCycler (BioRad) и на CFX96™ Real-Time System (BioRad). Продукты амплификации детектировали в электрофорезе в 2%-ной агарозе (Sigma), результаты учитывали на Molecular Imager GelDoc™ XR + (BioRad).

Антигенный состав изолятов.

Изоляты выращивали на среде MucCel DW. Бактериальную массу отмывали центрифугированием в 1%-ном растворе фенола и дезинтегрировали на Bandelin Sonopuls 2400 (4 цикла по 5 мин). Антигенный состав соникатов изолятов изучали в реакции иммунодиффузии (РИД) в ракетном иммуноэлектрофорезе (РИЭФ) [16] и в непрямом иммуноферментном анализе (ИФА) с антисыворотками к *M. tuberculosis* H₃₇Rv и *M. bovis* 8 (типичные формы), CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv (получен экспериментально), к CWD МБТ FLK-BLV HC 022 [17, 18]. В качестве контроля использовали соникаты *M. tuberculosis* H₃₇Rv и *M. bovis* 8 (типичная форма), CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv и разных штаммов CWD *M. bovis* [18, 19], а также изоляты (Is CWD МБТ «Jurkat», Is «Jurkat II 0.22 100 kDa + 0.22») из линии перевиваемых Т-лимфоцитов (Jurkat) больного Т-лимфобластной лейкемией [20].

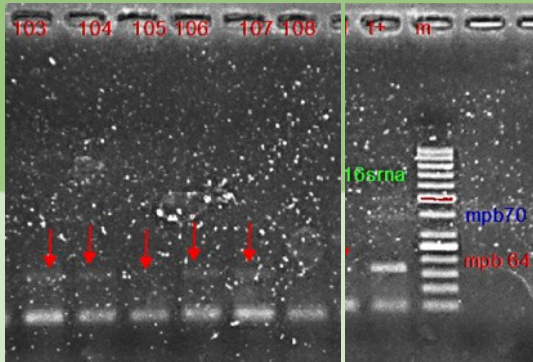
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

ДНК из проб молока «E3%Sw», «La», «JU», «SU», «DU» дала в ПЦР слабоположительный результат с праймерами MPB64 (рисунок 1, таблица 1). ДНК пробы «Ne» реагировала в ПЦР с праймерами MPB64 и в ПЦР-RT с праймерами IS6110 (рисунок 2, таблица 1).

Пробы молока «Ne» как после обработки хлоргексидином («Nech-g»), фильтрации через фильтр 0,22 µm («Ne 0.22»), так и после прогревания (97 °С) с последующей стерилизующей фильтрацией («Ne 97/0.22») во II «слепом» пересеве дали рост на среде MucCel DW. В мазках обнаружены клетки с типичным для CWD МБТ полиморфизмом, специфически окраши-

вавшиеся ДИП-методом с использованием антител к *M. bovis* в коричневый цвет (рисунок 3). ДНК изолятов реагировала в

ПЦР с праймерами МРВ64 и МРВ70 (рисунок 4, таблица 1).



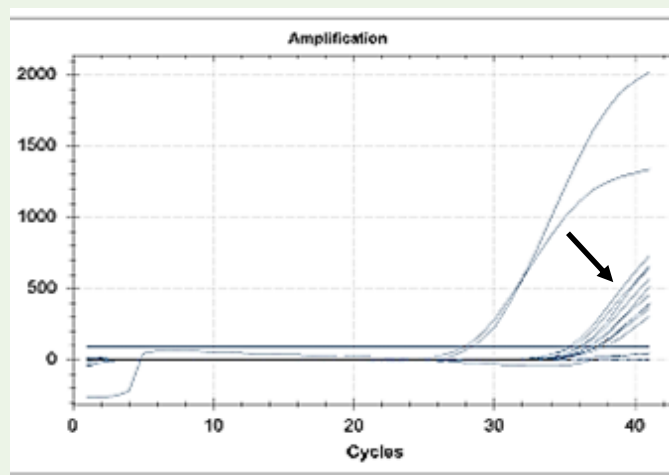
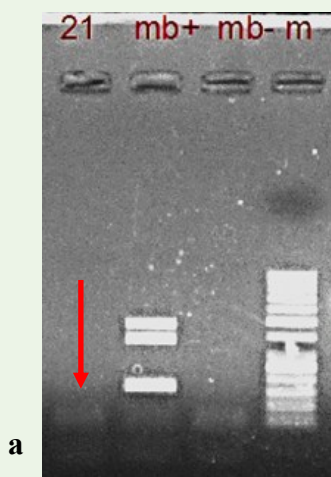
103 – «E3%Sw»; 104 – «La»; 105 – «JU»;
106 – «SU»; 107 – «DU»;
108 – отрицательный контроль;
t+ – положительный контроль; m – маркер
молекулярной массы. Красные стрелки –
амплификаты, полученные с праймерами МРВ64

Рисунок 1. – Электрофорез амплификатов ДНК из проб молока

Таблица 1. – Результаты исследования ультрапастеризованного молока

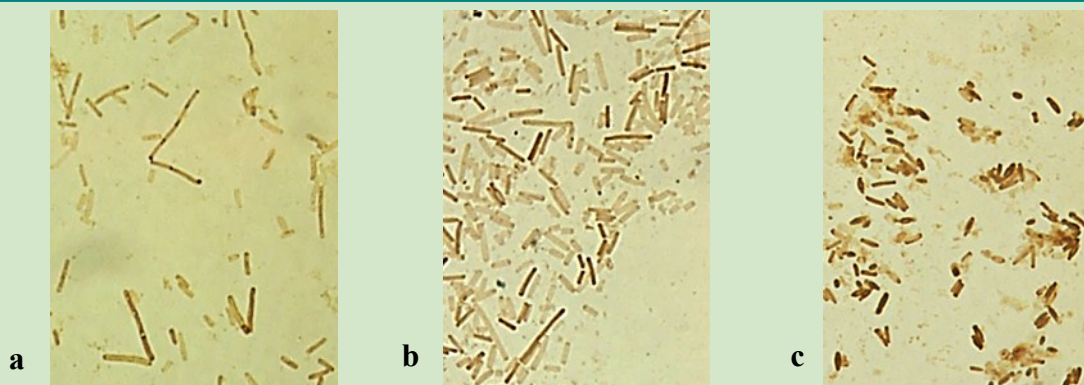
№ пробы	Пробы молока	ПЦР с ДНК из молока	Рост в исходном посеве	Рост в «слепом» пересеве	ПЦР + с ДНК изолята
103	«E3%Sw»	МРВ64+	–	II	IS6110 Cq 35.17
104	«La»	МРВ64+	на 2-й день		IS6110 Cq 34.17
105	«JU»	МРВ64+	–	III	IS6110 Cq 34.03
106	«SU»	МРВ64+	–	II	IS6110 Cq 34.13
107	«DU»	МРВ64+	–	II	IS6110 Cq 34.01 МРВ64±
21	«Ne»	МРВ64+, IS6110+	*	*	*
31	«Nech-g»	–	–	II	МРВ64+, МРВ70+
32	«Ne 0.22»	–	–	II	МРВ70+
33	«Ne 97/0.22»	–	–	III	МРВ64+

Примечание – *не исследовали



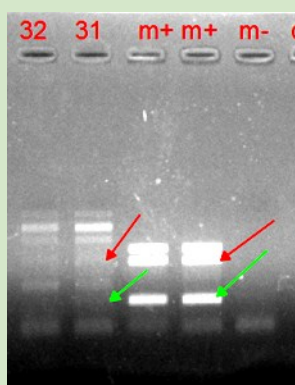
а – электрофорез амплификатов ДНК из пробы молока «Ne» (№ 21):
mb+ – положительный контроль; mb- – отрицательный контроль;
m – маркер молекулярной массы; стрелка – амплификат с праймерами МРВ64;
b – результат ПЦР-РТ с праймерами IS6110

Рисунок 2. – Идентификация ДНК из молока «Ne»



a – «Ne ch-g»; b – «Ne 0.22»; c – «Ne 97/0.22»; ДИП-окраска, 10×100

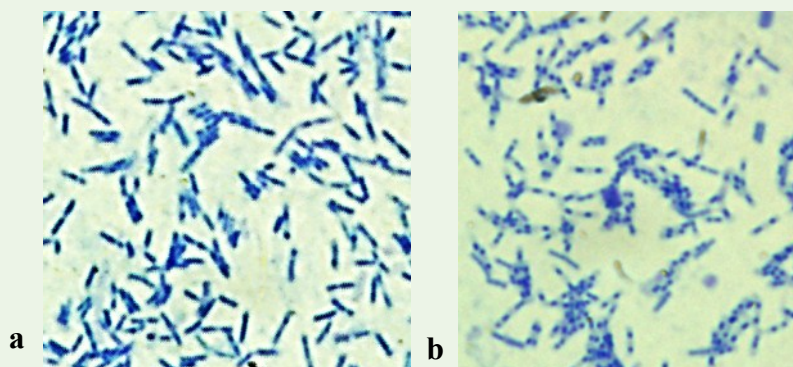
Рисунок 3. – Рост на среде MucCel DW проб молока



32 – «Ne 0.22» (MPB 70+ черная стрелка);
31 – «Ne ch-g» (MPB 70+ красная стрелка;
MPB 64+ зеленая стрелка); m+ – положительный
контроль; m- – отрицательный контроль

**Рисунок 4. – Амплификаты ДНК
изолятов из проб молока**

Пробы ультрапастеризованного молока «E3%Sw», «La», «JU», «SU», «DU» дали рост во II–IV «слепом» пересеве полиморфных НКУ форм, который появился через 3–20 дней (таблицы 1 и 2, рисунок 5).



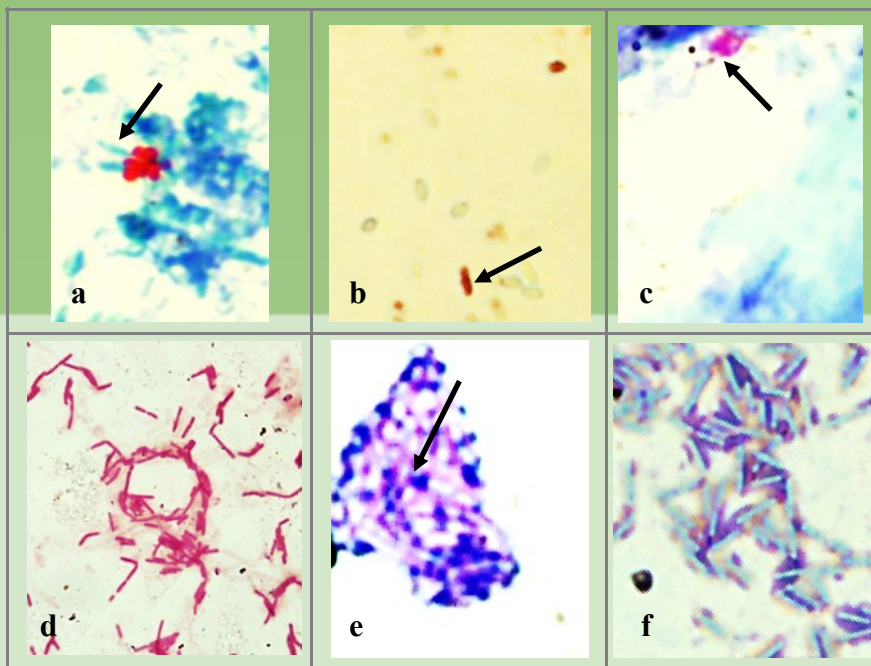
a – изоляты из молока «La»;
b – изоляты из молока «E3%Sw»;
Kinyoun, 10×100

**Рисунок 5. –
Некислотоустойчивые
формы**

На разных этапах культивирования в изолятах наряду с НКУ формами были обнаружены частично кислотоустойчивые (ЧКУ) красного цвета клетки (рисунок 6).

Кроме того, отмечалось характерное для CWD МБТ изменение морфологии клеток при пересевах, и в разных изолятах можно было обнаружить клетки одинаковой формы. Так, при длительном культивировании при температуре 37 °С без пересева почти все клетки становились «пусты-

ми», а среди них встречались единичные длинные нитевидные и толстые слабоокрашенные палочковидные формы (таблица 2). После пересева «пустые» и нитевидные клетки исчезали, в популяциях всех изолятов превалировали короткие палочковидные формы, которые в течение последующих суток трансформировались в характерные для CWD МБТ полиморфные палочковидные формы (таблица 2).

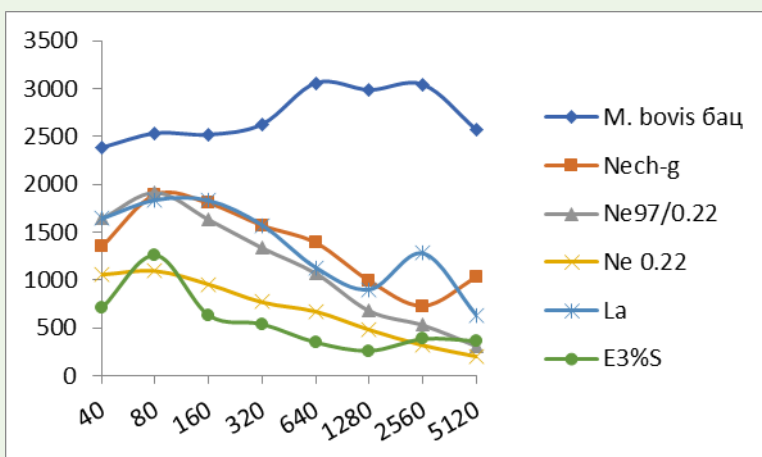


a – «Ne 0.22»;
 b – «La», c – «DU»;
 d и e – «Ne 97/0.22»;
 f – «E3%Sw»;
 Kinyoun, 10×100
**Рисунок 6. – Частично
 кислотоустойчивые
 клетки (стрелки)
 в посевах**

Соникаты изолятов из молока интенсивно реагировали в ИФА с антисывороткой к типичному штамму *M. bovis* 8, давая позитивные реакции даже при ее разведении 1:5120 (рисунок 7). В РИД с антисыворотками к *M. tuberculosis* H₃₇Rv и к *M. bovis* 8 они образовывали 2–4 плавно сливающихся преципитата (рисунок 8). Изоляты из молока имели практически одинаковый антигенный состав с экспериментально полученными CWD-формами *M. tuberculosis* H₃₇Rv и *M. bovis* 8. Так, в ИФА с антисывороткой к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv соникаты изолятов из молока реагировали так же интенсивно, как и гомологичный антисыворотке соникат CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv (таблица 3).

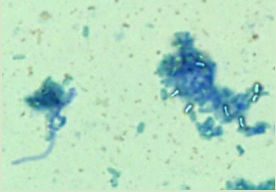
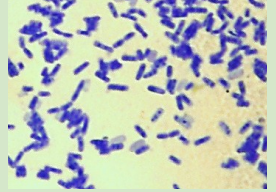


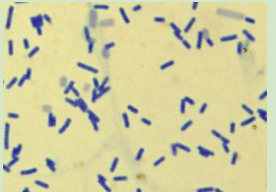

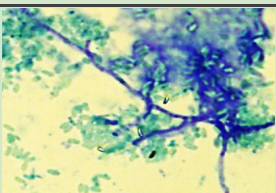
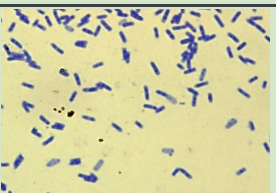
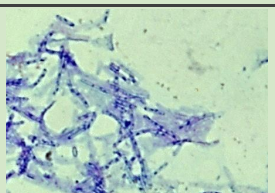
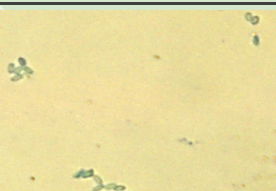
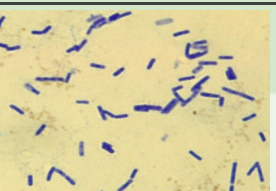
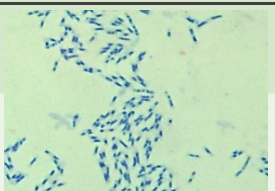
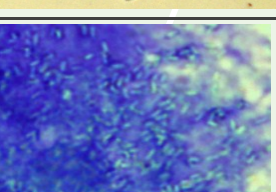
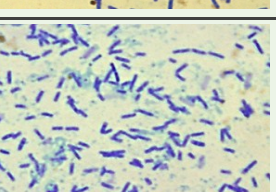
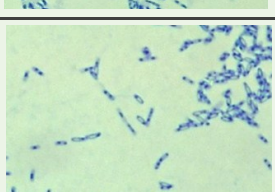
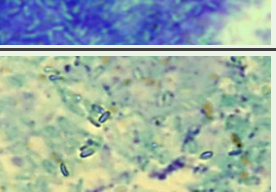
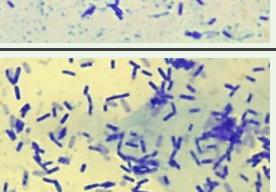
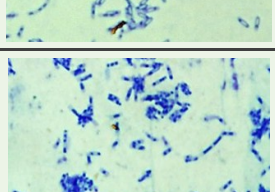
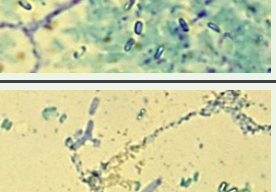
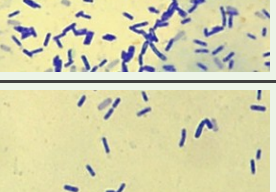
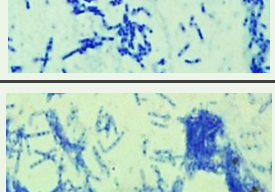
Антигенный состав изолятов из молока практически не отличался от состава

WD штаммов *M. bovis*, выделенных из лимфатического узла коровы с туберкулезными изменениями (CWD *M. bovis* tbc 24), а также из почвы, контаминированной *M. bovis* 8, инактивированного дезинфектантами (Is CWD *M. bovis* 8/1703, Is CWD *M. bovis* 8/1, Is CWD *M. bovis* 8/2/2) [19] (рисунок 9). Необходимо отметить, что одинаковый антигенный состав был у изолятов, выделенных из пробы «Ne», деконтаминированной разными способами (обработка хлоргексидином, фильтрация через фильтр 0,22 μm, прогревание при 97 °C и фильтрация через фильтр 0,22 μm) (рисунок 10). Было показано, что незначительные различия антигенного состава у изолятов касались лишь концентрации антигенов, что проявлялось в разной высоте пиков в РИЭФ (рисунки 11, 15).

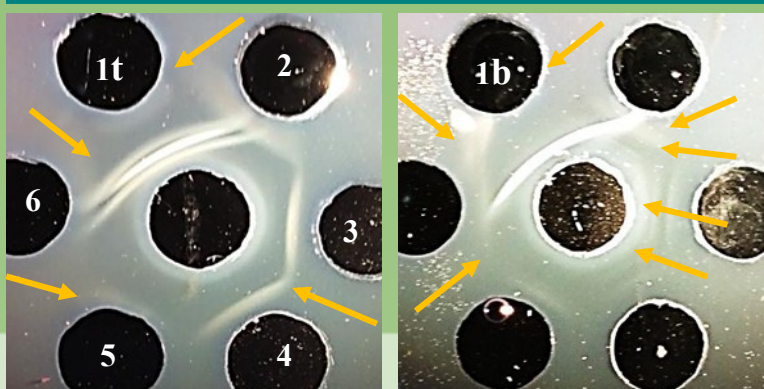


Ось абсцисс – разведения антисыворотки *M. bovis* 8;
 ось ординат – ОП при 450 нм
**Рисунок 7. – ИФА соникатов
 изолятов из молока и сониката
 типичного штамма *M. bovis* 8
 (бациллярный) с антисывороткой
 к *M. bovis* 8**

Таблица 2. – Изменение морфологии изолятов из молока при культивировании без пересева, через 20 ч и 48 ч после пересева на среде МусСел DW

	Без пересева	Через 20 ч после пересева	Через 48 ч после пересева
a			
b			
c			
d			
e			
f			
g			

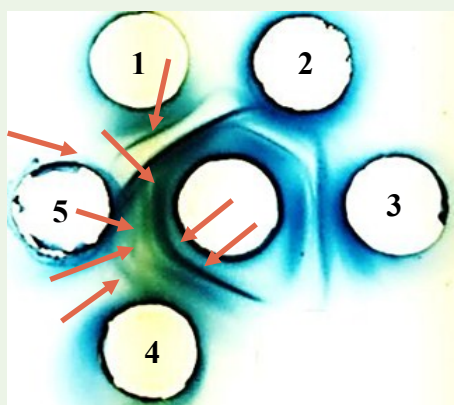
Примечание: a – «Nech-g»; b – «Ne 0.22»; c – «Ne 97/0.22»; d – «La»; e – «DU»; f – «SU»; g – «E3%Sw» (ряды изолятов); Kinyoun; 10×100



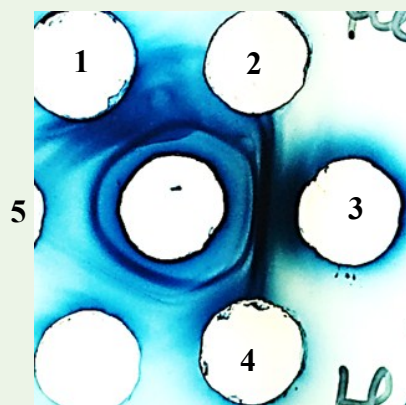
1t – *M. tuberculosis* H₃₇Rv;
 1b – *M. bovis* 8 и изолятами;
 2 – «Nech-g»; 3 – «Ne 0.22»;
 4-5 – «La»; 6 – «E3%Sw»
 (расположение одинаковое)
**Рисунок 8. – РИД антисывороток
 (в центре) к *M. tuberculosis* H₃₇Rv
 и к *M. bovis* 8 с сониками**

Таблица 3. – Превышение ОП в ИФА соникатов изолятов из молока с разведениями антисыворотки к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv в сравнении с ОП отрицательной сыворотки (S/neg)

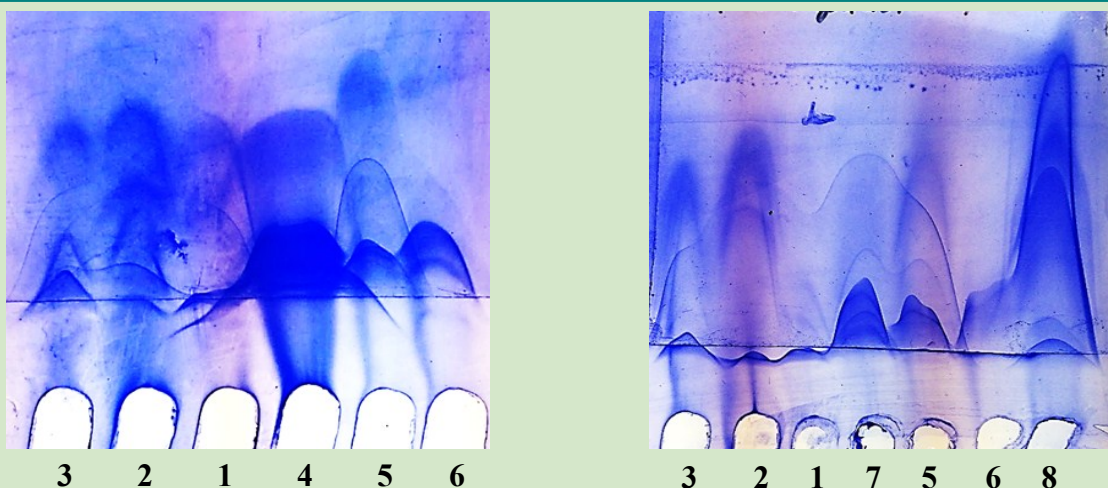
Разведение	Соникаты изолятов из молока					
	«Nech-g»	«Ne 0.22»	«Ne 97/0.22»	«La»	«E3%Sw»	CWD <i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv (контроль)
1:40	2,3	2,2	2,7	2,9	8,3	2,5
1:80	2,5	3,9	4,3	2,1	10,0	2,7
1:160	5,0	5,3	6,4	3,5	10,2	3,1
1:320	7,9	8,4	11,7	6,2	16,3	7,0
1:640	7,9	12,2	15,5	7,5	16,5	8,6
1:1280	9,5	16,2	24,1	8,1	16,0	14,2
1:2560	8,8	21,7	17,5	8,7	14,7	11,6
1:5210	14,3	20,1	19,7	13,8	16,4	13,4



1 – CWD *M. bovis* tbc 24; 2 – Is CWD
M. bovis 8/1703; 3 – Is CWD *M. bovis* 8/1;
 4 – Is CWD *M. bovis* 8/2/2;
 5 – Is «E3%Sw»; стрелки – преципитаты
 идентичных антигенов у штаммов
 CWD *M. bovis* и Is «E3%Sw»
**Рисунок 9. – РИД антисыворотки
 к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv (в центре)
 с сониками (в периферических лунках)**



1 – CWD *M. bovis*; 2 – Is «Nech-g»;
 3 – Is «Ne 97/0.22»; 4 – Is «Ne 0.22».
 Плавное слияние всех преципитатов
**Рисунок 10. – РИД антисыворотки к CWD
 МБТ FLK-BLV HC 0.22 (в центре)
 с сониками (в периферических лунках)**



1 – Is «Nech-g»; 2 – Is «Ne 0.22»; 3 – Is «Ne 97/0.22»; 4 – CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv; 5 – Is «E3%Sw»; 6 – Is «La»; 7 – Is «Ag BLV HC 0.22»; 8 – Is «Ser BLV 52».

В левой части в агарозе антисыворотка к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv,
в правой части – к CWD МБТ FLK-BLV HC 0,22

Рисунок 11. – РИЭФ соникатов

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При исследовании ультрапастеризованного молока положительные результаты ПЦР с праймерами для выявления генома МБТ оказались неожиданными. Это касалось не только молока, произведенного в странах, не имеющих статуса благополучия, но и в странах, считающихся оздоровленными от туберкулеза крупного рогатого скота. Хотя результаты ПЦР были недостаточно четкими и их можно было признать сомнительными, корректность обнаружения генома МБТ была подтверждена выделением из всех проб ультрапастеризованного молока НКУ (CWD) форм МБТ.

Изоляты были выделены из ультрапастеризованного молока, которое для деконтаминации прогрели 15 мин при температуре 99 °С, поскольку только МБТ могут

восстановить жизнеспособность в виде CWD-форм после такого термического воздействия [14]. Необходимо отметить, что инфекционный агент, находившийся в молоке, был в фильтрующейся вирусоподобной форме, так как рост CWD МБТ был получен при посеве молока, пропущенного через фильтр 0,22 μm. Существование фильтрующихся форм МБТ уже не вызывает сомнений [21, 22]. В частности, нами (не-опубликованные данные) также были обнаружены фильтрующиеся формы МБТ размером порядка 0,1 μm (рисунок 12). Но фильтрующиеся формы, находившиеся в молоке, были еще и термостабильными, так как CWD МБТ были выделены и из проб молока, предварительно прогретых при температуре 97 °С и пропущенных через фильтр 0,22 μm.

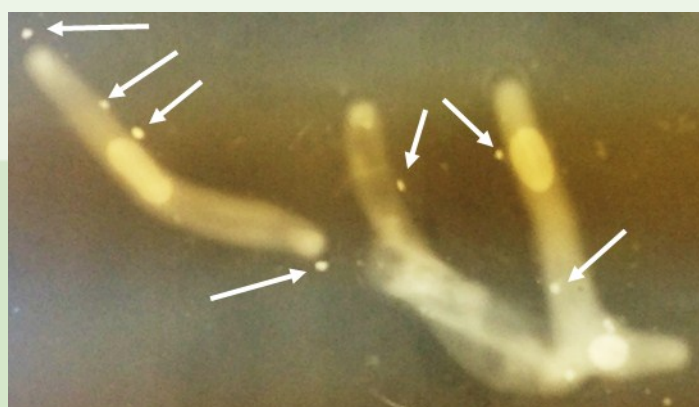
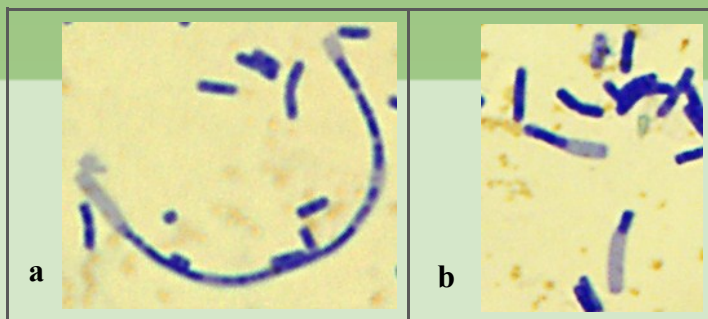


Рисунок 12. – Электронная микроскопия *M. bovis*. Заметны фильтрующиеся формы (стрелки). Совместные исследования с INTA (Argentina)

bar 1 μ

Изоляты из ультрапастеризованного молока имели характерный для CWD МБТ полиморфизм [10, 22, 23], который был, в частности, связан с тем, что в процессе роста и деления клетки могли образовывать другие клетки с отличающейся морфологи-

ей (рисунок 13), причем в изолятах из молока, произведенного в разных странах, можно было обнаружить клетки одинаковой формы (таблица 2, рисунок 14), в том числе частично кислотоустойчивые (рисунок 6).



a – Is «Ne 0.22»; b – Is «DU»; Kinyoun, 10×100

Рисунок 13. – Образование клеток разной морфологии (стрелки)



a – Is «Ne 0.22»; b – «Is La»; c – Is «E3%Sw»; Kinyoun, 10×100

Рисунок 14. – Длинные нитевидные формы с зернистостью

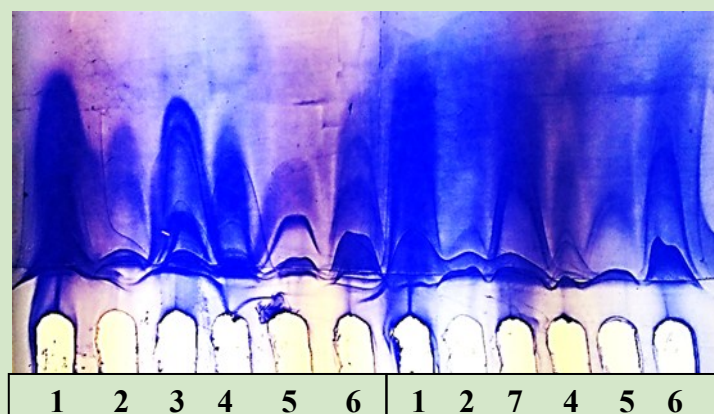
Результаты ПЦР свидетельствовали о происхождении изолятов от МБТ комплекса *tuberculosis-bovis* (наиболее вероятно, от *M. bovis*). Это подтверждает установленное в ИФА и в РИД приблизительное 50%-ное антигенное родство с типичными МБТ, что коррелирует с ранее установленной степенью изменения антигенного состава при экспериментальной трансформации *M. bovis* в CWD-форму [24]. Необходимо отметить, что у микроорганизмов, не относившихся к роду *Mycobacterium*, у которых было обнаружено антигенное родство с *M. bovis*, этот показатель с *Nocardia asteroidis* не превышал 20,5 %, а с *Corynebacterium pyogenes* – 4,6 % [25]. Важным моментом было и то, что антигенный состав изолятов из молока был практически идентичен антигенному составу экспериментально полученных и выделенных CWD штаммов *M. bovis*.

Тот факт, что изоляты из одной и

той же пробы молока, деконтаминированной хлоргексидином, пропущенной через стерилизующий фильтр (0,22 μm), прогретой при 97 °С и фильтрованной через стерилизующий фильтр (0,22 μm), имели идентичный антигенный состав, подтверждает предположение о том, что инфекционный агент, находившийся в ультрапастеризованном молоке, представлял собой термостабильную вирусоподобную (защитную) форму. Такие формы при подъеме температуры успевают образовать гибнущие вегетативные КУ и НКУ формы МБТ [14, 26]. В наших исследованиях защитные формы, находившиеся в ультрапастеризованном молоке, восстанавливали жизнеспособность в виде НКУ CWD-форм МБТ после инкубации проб в стимуляторе роста и посева смеси на питательную среду МусСел DW [14, 26]. Однако защитные формы МБТ могут восстанавливать жизнеспособность и при попадании в организм

[14]. То есть молоко, даже ультрапастеризованное, в котором есть защитные формы МБТ, биологически небезопасно. Хотя CWD-изоляты из молока не вызывали гибель лабораторных мышей, они приживались и персистировали в организме животных (результаты биопроб не приведены). С одной стороны, пока еще нет достоверных экспериментальных доказательств возможности реверсии восстановивших жизнеспособность CWD МБТ в патогенную форму, также нет подтверждения их роли в реци-

дивах туберкулеза. Но уже достаточно давно получены доказательства их участия в индукции онкогенеза [27], а также других патологических состояний [23, 28, 29]. В связи с этим обращает внимание тот факт, что изоляты из молока имели практически идентичный антигенный состав с изолятами из культуры клеток FLK-BLV и линии перевиваемых Т-лимфоцитов человека (Jurkat), больного Т-лимфобластной лейкемией (рисунок 15, видно образование плавно сливающихся преципитатов).



1 – Is CWD МБТ «Jurkat» [21]; 2 – Is «E3%Sw»; 3 – CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv; 4 – Is «DU»; 5 – «Is SU»; 6 – Is «Jurkat II 0.22 100 kDa + 0.22» [21]. В левой части – в агарозе а/с к CWD *M. tuberculosis* H₃₇Rv, в правой – к CWD МБТ FLK-BLV HC 0.22 [17, 18]

Рисунок 15. – РИЭФ соникатов

В целом полученные результаты показали:

- присутствие маркеров туберкулезной инфекции в молоке из стран как со статусом благополучия, так и не имеющих его указывает на скрытую туберкулезную инфекцию в каких-то стадах, являющихся источником поставки молока на молокоперерабатывающее предприятие;

- критерии благополучия стад (отсутствие патоморфологических признаков болезни и выявления реагирующих на туберкулин коров при 2 исследованиях с интервалом в 6 месяцев) не позволяют судить об отсутствии скрытой туберкулезной инфекции. Это связано с тем, что персистирующие в CWD- или L-формах МБТ не вызывают развития макроскопических изменений и гиперчувствительности к классическому туберкулину;

- для оценки реальной ситуации в

стадах целесообразно использовать ПЦР, посев крови и молока с применением специальных стимуляторов роста и соответствующих питательных сред, а также ИФА с набором антигенов типичных и CWD МБТ;

- термическая обработка молока инактивирует микобактерии туберкулеза, но не действует на образующиеся термостабильные защитные формы;

- фильтрация через стерилизующие фильтры 0,22 μm не позволяет удалить из молока защитные формы МБТ;

- защитные формы МБТ восстанавливают жизнеспособность в виде НКУ CWD МБТ, способных длительно персистировать в организме без развития макроскопических изменений, хотя не исключена их роль в индукции онкогенеза и других патологических состояний неясной этиологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. Юсковец, М. К. Туберкулез сельскохозяйственных животных и птиц / М. К. Юсковец. – Минск : Государственное издательство сельскохозяйственной литературы БССР, 1962. – 447 с.
2. Olmstead, A. L. *An Impossible Undertaking: The Eradication of Bovine Tuberculosis in the United States* / A. L. Olmstead, P. W. Rhode // *The Journal of Economic History*. – 2004. – Vol. 64. – № 3. – P. 734–772.
3. Palmer, M. V. *Bovine Tuberculosis and the Establishment of an Eradication Program in the United States: Role of Veterinarians* / M. V. Palmer, W. R. Waters // *Veterinary Medicine International*. – 2011. – Vol. 2011. – P. 1–12.
4. *Diagnosis of mycobacteria in bovine milk: an overview* / C. A. D. Bolaños [et al.] // *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. – 2017. – Vol. 59. – P. 1–13.
5. *Nontuberculous mycobacteria in milk from positive cows in the intradermal comparative cervical tuberculin test: implications for human tuberculosis infections* / C. A. D. Bolaños [et al.] // *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. – 2018. – Vol. 60. – P. 6.
6. *Survival of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in retail pasteurised milk* / Z. E. Gerrard [et al.] // *Food Microbiology*. – 2018. – Vol. 74. – P. 57–63.
7. Оценка эффективности термического обеззараживания молока туберкулин-положительных коров с использованием методов детекции CWD форм микобактерий туберкулеза / А. П. Лысенко [и др.] // *Экология и животный мир*. – 2017. – № 1. – С. 41–48.
8. *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.
9. Иммуноферментный анализ в изучении причин реакций на туберкулин у коров / А. П. Лысенко [и др.] // *Основные направления развития ветеринарной науки : материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 90-летию РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселского»* / Минск : РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселского», 2013. – С. 128–137.
10. Феномен изменчивости микобактерий туберкулеза и его использование для обнаружения туберкулезной инфекции / А. П. Лысенко [и др.] // *Туберкулез – глобальная катастрофа человечества : материалы I Междунар. заочной науч.-практ. конф., 24 марта 2014 г. / Ростов-на-Дону : РостГМУ, 2014. – С. 176–198.*
11. 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.
12. *Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review* / V. Beran [et al.] // *Veterinární Medicina*. – 2012. – Vol. 51. – № 7. – P. 365–389.
13. 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.
14. *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.
15. Выявление микобактерий туберкулеза в тканях с помощью дифференцирующей иммунопероксидазной окраски / А. П. Лысенко [и др.] // *Туберкулез и болезни легких*. – 2014. – № 10. – С. 55–58.
16. *A manual of quantitative immuno-electrophoresis: methods and applications* / ed. N. H. Axelsen. – Oxford : Blackwell, 1977. – 169 p.
17. *Further evidence for cancer as cell-wall-deficient mycobacterial disease* / A. P. Lysenko [et al.] // *Journal of Molecular Pathological Epidemiology*. – 2016. – Vol. 1. – № 1. – P. 1–12.
18. Вирус бычьего лейкоза – вирусоподобная форма микобактерий туберкулеза? / А. П. Лысенко [и др.] // *Экология и животный мир*. – 2019. – № 1. – С. 15–24.
19. Микобактерии туберкулеза после летального воздействия дезинфектантов могут восстанавливать жизнеспособность в виде микобактерий с дефектной клеточной стенкой / А. Э. Высоцкий [и др.] // *Эпизоотология, иммунология, фармакология, санитария*. – 2019. – № 2. – С. 26–35.

20. Investigation of the relationship of latent tuberculosis infection with the development of myeloid and lymphoblastic leukemia / O. P. Lysenko [et al.] // Reports of Vinnytsia National Medical University. – 2020. – Vol. 24. – № 1. – P. 51–58.

21. Markova, N. Filterable forms and L-forms of Mycobacterium bovis BCG : impact for live vaccine features / N. Markova, G. Slavchev, L. Michailova // Human Vaccines & Immunotherapeutics. – 2012. – Vol. 8. – № 6. – P. 759–764.

22. 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.

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

24. Особенности антигенного состава измененных форм микобактерий туберкулеза / А. П. Лысенко [и др.] // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2010. – № 10. – С. 54–58.

25. Cross-reactions between mycobacteria. II. Crossed immunoelectrophoretic analysis of soluble antigens of BCG and comparison with other mycobacteria / M. Harboe [et al.] // Scandinavian journal of immunology. – 1979. – Vol. 9. – № 2. – P. 115–124.

26. Микобактерии туберкулеза при термическом воздействии образуют защитные формы, проходящие через ультрафильтры и восстанавливающие жизнеспособность в виде CWD-форм / А. П. Лысенко [и др.] // Эпизоотология, иммунология, фармакология, санитария. – 2019. – № 1. – С. 33–45.

27. Diller, I. Experiments with mammalian tumor isolates / I. Diller // Ann NY Acad Sci. – 1970. – № 174. – P. 655–674.

28. Livingston, V. Mycobacterial Forms In Myocardial Vascular Disease / V. Livingston, E. Alexander-Jackson // Journal of the American Medical Women's Association. – 1965. – Vol. 20. – P. 449–452.

29. Cantwell, A. R. Variably acid-fast bacteria in a fatal case of Hodgkin's disease / A. R. Cantwell // Archives of Dermatology. – 1984. – Vol. 120. – № 3. – 401 p.

ТАЛПАН

ПРЕПАРАТ ВЕТЕРИНАРНЫЙ

оказывает акарицидное контактное действие против взрослых форм клещей *Varroa destructor*, паразитирующих на пчелах

применяется для лечения пчел при варроатозе весной и в летне-осенний период после откачки товарного меда при температуре воздуха от плюс 10 °С до плюс 25 °С

содержит муравьиную и щавелевую кислоту

WWW.BIEVM.BY