

Лысенко А.П., доктор ветеринарных наук, профессор¹
Власенко В.В., доктор биологических наук, профессор²
Красникова Е.Л., научный сотрудник¹
Ван Хунлян, аспирант³

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

² Винницкий национальный аграрный университет, г. Винница

³ УО «Витебская «ордена Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск

ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ТЕРМИЧЕСКОГО ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЯ МОЛОКА ТУБЕРКУЛИНПОЗИТИВНЫХ КОРОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ ДЕТЕКЦИИ CWD ФОРМ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

Резюме

В крови и в молоке 75% туберкулинпозитивных коров условно благополучного по туберкулезу стада обнаружена ДНК комплекса *M.tuberculosis-M. bovis*. Из крови выделены микобактерии туберкулеза с дефектной (CWD) клеточной стенкой.

Из пулов молока туберкулинпозитивных коров, подвергнутых трехкратному кипячению, выделены микобактерии туберкулеза с дефектной (CWD) клеточной стенкой. Изоляты выдерживали 10 мин прогрева при температуре 100⁰С и проходили через стерилизующий фильтр 0,22 мкм. Полученные результаты указывают на то, что существующие режимы термического обеззараживания молока не обеспечивают биологическую безопасность молочной продукции.

В исследованиях использованы стимуляторы роста «Mycell DW», ВКГ и питательная среда «Mycell DW», позволяющие с высокой чувствительностью получать рост CWD формы микобактерий туберкулеза через 2–5 суток после посева.

Summary

In a blood and in milk of 75% the tuberculinpositive cow's DNA of the *M.tuberculosis-M. bovis* complex is found. From a blood were isolated cell wall deficient (CWD) mycobacteria.

From milk pools this cows subjected to three-fold boiling tuberculosis CWD mycobacteria are isolated. Isolates maintained 10 min. a heating at 100⁰С and passed 0,22 microns through the sterilizing filter. The received results indicate that the existing regimens of a thermal decontamination of milk don't ensure biological safety of dairy products.

In researches the growth stimulant of "Mycell DW", VKG and Mycell DW nutrient medium allowing to receive with high sensitivity growth of a CWD form of mycobacteria of tuberculosis in 2–5 days after seed are used.

Поступила в редакцию 02.06.2017 г.

ВВЕДЕНИЕ

Методы обнаружения микобактерий туберкулеза (МБТ) разрабатывались в конце 19 в начале 20 века во время катастрофического распространения и превалирования тяжелых форм заболевания. Поэтому, вполне закономерно, сложился «золотой стандарт» диагностики – выделение патогенных кислотоустойчивых палочек МБТ. Но почти сразу, после открытия возбудителя болезни, было обнаружено, что МБТ могут менять форму, терять кислотоустойчивость, резко снижать патогенность [14,15]. Измененные (трансформиро-

ванные) формы МБТ настолько отличались от типичных кислотоустойчивых палочек, что по фенотипическим признакам, их было трудно отнести даже к роду *Mycobacterium*. Поэтому, из-за отсутствия точных методов идентификации, несмотря на достаточно широкие исследования, отношение к проблеме изменчивости МБТ долго оставалось скептическим. С другой стороны пандемия туберкулеза вызывала необходимость бороться с типичным возбудителем и массовым проявлением заболевания, не обращая внимания на феномен изменчивости МБТ.

Санитарные меры, применение вакцины БЦЖ, появление эффективных химиотерапевтических средств настолько снизили заболеваемость, что даже предполагалось полное искоренение туберкулеза. Однако, несмотря на оптимистические прогнозы, проблема туберкулеза осталась актуальной и в 21 веке [19]. Это связано не только с относительно высоким уровнем заболеваемости, но и с распространением латентной (скрытой) туберкулезной инфекции, при которой в организме присутствуют МБТ, но заболевание не развивается [1, 2, 9, 15].

При латентной туберкулезной инфекции МБТ персистируют, преимущественно, в виде трансформированных (измененных) форм, возникающих в результате адаптации к неблагоприятным условиям [1, 2, 9, 16]. Механизмы трансформации изучены недостаточно, но известно, что у МБТ меняется структура клеточной стенки, появляются лишние клеточной стенки L- и формы с ригидной, но «дефектной» клеточной стенкой (CWD – cell wall deficient)[1, 2, 9, 15]. Обнаружить CWD формы МБТ с помощью общепринятых бактериологических методов почти невозможно, поэтому они выпадают из поля зрения исследователей. Один из путей решения проблемы – применение стимуляторов роста и специальных питательных сред (ВКГ, Влакон, Муссел DW), позволяющие выделить CWD МБТ [1, 11, 12, 13]. Для этого исследуемый материал инкубируют в стимуляторе роста (24–48 ч) и высевают на питательную среду, на которой колонии CWD МБТ появляется уже через 2–5 суток [1, 11, 12, 13].

Использование стимуляторов роста и специальных сред позволило обнаружить ряд неизвестных свойств МБТ и, в частности, их уникальную термостабильность [11]. Это представляет интерес не только с точки зрения использования туберкулинов, но и эффективности термического обеззараживания молока. Известно, что больные туберкулезом коровы выделяют МБТ с молоком. До начала внедрения пастеризации в 20–30-х годах прошлого века до 30% слу-

чаев заболевания человека были вызваны МБТ бычьего вида [17]. В настоящее время, благодаря термическому обезвреживанию молока, случаи туберкулеза человека, вызванные *M. bovis* – единичны. Вместе с тем, несмотря на относительное благополучие по туберкулезу крупного рогатого скота, выявляется значительное количество коров, реагирующих на туберкулин. В частности, только в Великобритании в последнее десятилетие ежегодно выделяли порядка 30000 туберкулинпозитивных животных, от которых до момента сдачи на убой могло быть получено не менее 50 тысяч тонн молока [5]. Безусловно, все молоко подвергается термическому обеззараживанию. Считается, что 10 мин кипячение, пастеризация при температуре 90°C 5 мин или 30 мин при температуре 85°C полностью убивает МБТ в молоке [17]. Однако эти данные были получены с помощью общепринятых бактериологических методов относительно типичных МБТ.

Цель исследования – изучение эффективности термического обеззараживания молока туберкулинпозитивных коров с использованием методов детекции CWD форм микобактерий туберкулеза.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследовали 24 пробы крови и молока коров, реагирующих на туберкулин из стада с неопределенным статусом по туберкулезу.

ДНК выделяли из стабилизированной крови. Молоко центрифугировали при 5000g, ДНК выделяли из полученного осадка. Пробы смешивали с лизирующим буфером (по 500 мкл) и прогревали при температуре 95°C 5 мин. ДНК из лизатов выделяли на аффинных колонках (ИБОХ НАНБ). Амплификацию проводили с праймерами 16s RNA (*Mycobacterium*) и MPB 70 (комплекс *tuberculosis-bovis*) на амплификаторе C1000TM ThermoCycler (BioRad): 95⁰ – 4*, 94⁰ – 1*(58–62 (60))⁰ – 1*, 72⁰ – 1,3*)×30 циклов, 72⁰ – 5*.

Продукты амплификации детектировали электрофоретически в 2 % агарозном геле (Sigma), результаты учитывали на Мо-

lecular Imager GelDoc™ XR+ (BioRad).

Бактериологический посев. Использованы стимулятор роста «Mycsell DW» (с 0,15 % хлоргексидина), стимулятор роста ВКГ «Ганза» и питательная среда «Mycsell DW».

Пробы были объединены в 3 пула крови и 3 пула молока (таблица 1). Пулы молока 3-кратно прогреты до закипания. После этого, пробы пулов смешивали со стимулятором роста Mycell DW (1:2) и после 24 ч инкубации при температуре 37°C высевали на пробирки со средой «Mycsell DW».

Мазки изолятов окрашивали дифференцирующим иммунопероксидазным методом (ДИП) [2, 11, 12, 13], который включал инактивацию эндогенной пероксидазы, окраску по Kinyoun, обработку конъюгатом пероксидазы с аффинно-очищенными антителами к *M. bovis* и проявление субстратным раствором 3,3`-диаминобензидина.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В ПЦР в 18 пробах крови и молока (75%) обнаружена ДНК *M.tuberculosis* – *M. bovis* (таблица 1).

Таблица 1 – Результаты исследования крови и молока коров, реагировавших на туберкулин

№ п/п	ПЦР с кровью		Посев пулов крови, ПЦР изолята	ПЦР с молоком		Посев пулов молока после прогревания при 100°C
	16s RNA	MPB 70 tuberculosis-bovis		16sRNA	MPB 70 tuberculosis-bovis	
1	+	+	Пул 1 Рост +++ ПЦР 16sRNA+ MPB 70+	+	+	Пул 1 Рост +++ ПЦР изолята 16sRNA+ MPB 70+
2	+	+		+	+	
3	+	+		+	+	
4	+	+		+	+	
5	+	+		+	+	
6	+	+		+	+	
7	±	+		+	+	
8	+	+		+	+	
9	+	+	Пул 2 Рост +++ ПЦР 16sRNA+ MPB 70+	+	+	Пул 2 Рост +++ ПЦР изолята 16sRNA+ MPB 70+
10	+	+		+	+	
11	+	+		+	+	
12	+	+		+	+	
13	-	-		-	-	
14	+	+		+	+	
15	-	-		-	-	
16	-	-		-	-	
17	+	+	Пул 3 Рост +++ Не исследовали	+	+	Пул 3 Рост +++ ПЦР 16sRNA+ MPB 70+
18	-	-		-	-	
19	+	+		+	+	
20	+	+		-	-	
21	+	+		+	+	
22	-	-		-	-	
23	-	-		-	-	
24	+	+		+	+	

Пулы молока были 3 раза нагреты до кипения. После инкубации в стимуляторе роста и посева на среду «Mycsell DW» не гретых пулов крови и кипяченого молока через 2 суток в посевах всех пулов крови и молока стал заметен тонкий налет – «газон». После его пересева через 2 суток отмечен сплошной рост прозрачных колоний (таблица 1).

При ДИП окраске мазков клетки изолятов окрашивались в интенсивный коричневый цвет, что указывало на то, что они реагировали с антителами к антигенам типичных МБТ (рисунок 1). Изоляты имели характерную для CWD форм МБТ морфологию (биполярные длинные и короткие палочки, длинные и короткие зернистые палочки, длинные и короткие «пустые» палочки, веретенообразные и колбоподобные клетки) [12, 13].

ДНК изолятов из крови и кипяченого молока в ПЦР дала положительную реакцию с праймерами 16s RNA (род *Mycobacterium*) и с праймерами MPB70 (*tuberculosis-bovis* комплекс) (таблица 1).

Результаты посева и ПЦР показали, что у коров, реагировавших на туберкулин, в крови и в молоке присутствуют МБТ, причем они не инактивировались кипячением и восстанавливали жизнеспособность в виде CWD форм МБТ.

Для подтверждения термостабильности изолятов их суспензии прогрели 10 мин при температуре 100⁰С на твердотельном термостате Biosan CH100 (таблица 2). После этого, они были смешаны со стимулятором роста ВКГ (1:2), 24 ч инкубированы при температуре 37⁰С и посеяны на среду «Mycsell DW». Часть суспензии изолята из крови пула 2 перед посевом была дополнительно подвергнута стерилизующей фильтрации через фильтр Millex[®]GP 0,22 мкм (таблица 2).

Через 3 суток в посевах суспензий гре-

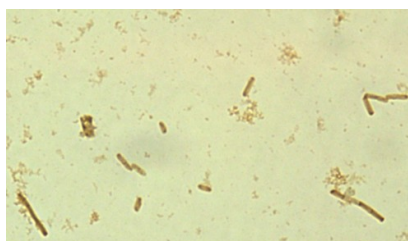
тых изолятов из крови и молока был получен рост колоний (таблица 2, 3). В посевах фильтрата изолята из крови через 3 суток роста не обнаружено. Через 6 суток проведен пересев придонной жидкости. На 7 сутки в пересеве появился «газон». Через 12 суток в пробирках начального посева фильтрата также стал заметен «газон». Его пересев дал через 1 сутки интенсивный рост колоний (таблица 3) коротких биполярных и зернистых палочек и других CWD форм МБТ, которые окрашивались в интенсивный коричневый цвет, что указывало на то, что они реагировали с антителами к антигенам типичных МБТ (таблица 3).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

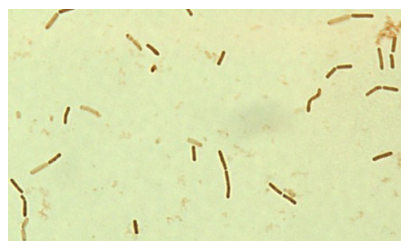
Обнаружение ДНК МБТ в крови и в молоке свидетельствовало о том, что реакции на туберкулин у коров из стада с неопределенным статусом по туберкулезу (условно благополучного) были связаны с туберкулезной инфекцией. Это подтверждено выделением из крови CWD форм МБТ. Несмотря на то, что при убое животных не было обнаружено видимых туберкулезных изменений, они выделяли МБТ с молоком.

Особенностью использованной методики бактериологического исследования является то, что, если в материале присутствуют типичные МБТ, на питательной среде вырастают CWD формы [1, 11, 12, 13]. Поэтому нельзя сделать вывод, в типичной или CWD форме МБТ находились в крови и в молоке, однако однозначно, они сохраняли жизнеспособность после 3-кратного кипячения инфицированного молока. То есть МБТ выдерживали гораздо более сильное воздействие, чем при известных режимах термической обработки молока. Более того, CWD МБТ, выделенные из кипяченого молока, выдерживали 10 мин прогревание при температуре 100⁰С.

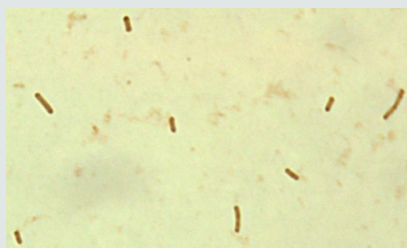
1a



1b



1c



1d

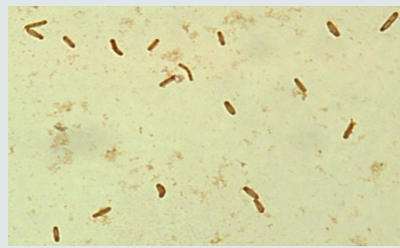


Рисунок 1 – Микроскопия изолятов из пулов крови и кипяченого молока:

1a – изолят из крови пула 1, 1b – изолят из крови пула 2,

1c – изолят из молока пула 1, 1d – изолят из молока пула 3. ДИП окраска 10x100

Таблица 2 – Схема и результаты опыта по изучению термостабильности изолятов из крови и молока и способности проходить через стерилизующий фильтр

Изолят	ПЦР исходного изолята	Рост после прогрева и инкубации в стимуляторе роста	Посев фильтрата прогретой суспензии, инкубированной в стимуляторе роста через стерилизующий фильтр 0,22 мкм
изолят из крови пула 2	16s+, 70+	через 3 суток	через 6 суток пересев придонной жидкости, в течение 6 суток роста нет, после слепого посева через 1 сутки рост по ходу петли в исходной пробирке (1 посева). Через 12 суток в пробирках исходного посева газонный рост
изолят из крови пула 1	16s±, 70+	через 3 суток	не проводили
изолят из молока пула 3	16s+, 70+	через 3 суток	не проводили
изолят из молока пула 2	16s+, 70±	через 3 суток	не проводили
изолят из молока пула 1	16s+, 70±	через 3 суток	не проводили

Таблица 3 – Результаты микроскопии роста изолятов из крови и молока после 10 мин прогрева при температуре 100⁰С и стерилизующей фильтрации

Изолят	ДИП окраска мазков	
	10x100	увеличенный фрагмент
изолят из крови пула 2, выросший после прогрева (не фильтрованный)		
первичный рост фильтрата гретого изолята из крови пула 2		

Это, вероятно, не предел устойчивости. По ранее полученным данным, CWD МБТ были выделены из туберкулинов, при получении которых применяют нагрев до температуры 121⁰С 30–60 мин [11].

Жизнеспособность сохраняют не вегетативные клетки МБТ. Инфицированное МБТ молоко после термической обработки не вызывает заболевания туберкулезом. Под действием высокой температуры вегетативные клетки погибают, но успевают образовать защитные формы, природа которых не совсем ясна. Вместе с тем, уже известно, что они способны восстанавливать жизнеспособность в виде CWD форм не только *in vitro*, но и при попадании в организм хозяина [11].

Недавно у МБТ были обнаружены спороподобные термостабильные формы несколько меньшего размера, чем вегетативные клетки [8], а также формы, сопоставимые по размеру с вирусами [16, 18]. Наши опыты дали бактериологическое подтверждение существования фильтрующихся форм МБТ. Посев фильтрата гретого изолята из крови дал рост CWD МБТ, хотя визуально заметные колонии, появились заметно позже, чем при посеве гретой суспензии изолята. В мазках посева фильтрата наблюдалось образование специфической сети, внутри которой образовывались палочковидные формы (таблица 3, стрелка).

Результаты исследований однозначно показали, что кипячение и, следовательно, пастеризация полностью не обезвреживают молоко инфицированных (туберкулинпозитивных) коров. Оно содержит защитные формы МБТ, способные восстанавливать жизнеспособность в виде CWD МБТ при попадании в организм потребителя [11]. Необходимо отметить, что CWD МБТ не вызывают типичного заболевания, но они способны, практически, пожизненно перси-

стировать в организме хозяина [1, 9, 11, 12, 15]. Их потенциальную опасность связывают не только с вероятностью реверсии [2], но и с тем, что они могут быть возможными причинами возникновения опухолей [4, 9, 12, 15, 20], заболеваний центральной нервной и сердечно-сосудистой системы [10], сахарного диабета [6], саркоидоза [4], болезни Крона [7, 15].

Установление факта сохранения жизнеспособности МБТ после термической обработки молока туберкулинпозитивных коров, пусть даже в виде защитных форм, ставит целый ряд проблем обеспечения биологической безопасности и вызывает необходимость дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

1 В крови и в молоке 75 % туберкулинпозитивных коров условно благополучного по туберкулезу стада обнаружена ДНК комплекса *M.tuberculosis* – *M. bovis*.

2 Из крови туберкулинпозитивных коров условно благополучного по туберкулезу стада выделены микобактерии туберкулеза с дефектной (CWD) клеточной стенкой.

3 Микобактерии туберкулеза с дефектной (CWD) клеточной стенкой были выделены из пулов молока туберкулинпозитивных коров, подвергнутых трехкратному кипячению. Следовательно, существующие режимы термического обеззараживания молока не обеспечивают биологическую безопасность молочной продукции.

4 Микобактерии туберкулеза с дефектной (CWD) клеточной стенкой, выделенные из пулов кипяченого молока туберкулинпозитивных коров, выдерживали 10 мин прогревание при температуре 100⁰С и были способны проходить через стерилизующий фильтр 0,22 мкм.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Власенко, В.В. Туберкулез в фокусе проблем современности / В.В. Власенко. – Винница: Наука, 1998. – С. 350.
- 2 Земскова, З.С. Скрыто протекающая туберкулезная инфекция / З.С. Земскова, И.Р. Дорожкова. – Москва: Медицина, 1984. – С. 49–63.
- 3 Лысенко, А.П. Выявление микобактерий туберкулеза в тканях с помощью дифференцирую-

цей иммунопероксидазной окраски / А.П. Лысенко, В.В. Власенко, А.П. Лемши, Т.П. Новик, Е.А. Мухалевиц, И.Г. Власенко / *Туберкулез и болезни легких* 2014, №10. – С. 55–58.

4 Alavi, H.A. Immunolocalization of cell-wall-deficient forms of *M. tuberculosis* complex in sarcoidosis and in sinus histiocytosis of lymph nodes draining carcinoma./ H.A. Alavi, E.A. Moscovic // *Histol Histo-pathol.* 1996 Jul;11(3):683–94.

5 Baker, C. Bovine TB statistics: Great Britain.– Biffing paper No 6081, 13 May, 2015.

6 Broxmeyer, L. Diabetes mellitus, tuberculosis and the mycobacteria: two millennia of enigma. *Medical Hypothesis* (2005); 65 (3): 433–9.

7 Chiodini, R.J. Sheroplactic phase of mycobacteria isolated from patients with Crohn,s disease. / R.J. Chiodini, H.J. Van Kruiningen, W.R. Thayer, J.A. Coutu. // *Journal of Clinical Microbiology*, 1986, – 24, P.357–363.

8 Ghosh, J., Larsson, P., Singh, B., Pettersson, B.M.F., Islam, N.M., Sakhar, S.N., Dasgupta, S., Kisebom, L. Sporulation in mycobacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009, 106, –26, – P.10781–10786.

9 Guliang, H, Tefu, L. Mycobacterium tuberculosis L-forms. *Microbial Ecology in Health and Disease.* 1999, 10, –P. 129–133.

10 Huaman, M., Henson, D., Ticona, E., Sterling, T.R., Garvy, B.A. Tuberculosis and cardiovascular disease: linking the epidemics. *Tropical Disease, Travel Medicine and Vaccines* 2015 1:10.

11 Lysenko, A.P. The tuberculin skin test: how safe is safe? The tuberculins contain unknown forms capable of reverting to cell-wall-deficient mycobacteria / A.P. Lysenko, V.V. Vlasenko, L. Broxmeyer [et al.] / *Clinical and Experimental Medical Sciences.* 2014, 1. 2, no. 1–2, P.55–73.

12 Lysenko, A.P., Broxmeyer L., Vlasenko V., Krasochko P.A., Lemish A.P., Krasnikova, E.L. Further evidence for Cancer as Cell-wall-deficient Mycobacterial Disease. *J. of Molecular Pathological Epidemiology;* 2016. – Vol.1. – No. 1:8. – P. 1–12.

13 Lysenko, A.P., Broxmeyer, L., Vlasenko, V., Krasochko, P.A., Lemish, A.P., Krasnikova, E.L. CWD Tuberculosis Found in Spongiform Disease Formely Attributed to Prions: Its Implication towards Mad Cow Disease, Scrapie and Alzheimer`s. *J. of Molecular Pathological Epidemiology.* – 2017.–Vol.3.–№3:3. – P.1–13.

14 Malassez, L., Vignal, W. Tuberculose zoogloeique. *Archives de Physiologie Normale et Pathologique*, 1883, series 3, 2, P. 369–412.

15 Mattman, L.H. Cell Wall Deficient Forms: Stealth Pathogens. 3rd ed. CRC Press, Boca Raton. 2001. – 416 pp.


16 Marcova, N., Slavchev, G., Michailova, L. Unique biological properties of Mycobacterium tuberculosis L-form variants: impact for survival under stress. *Int. Microbiology* (2012) 15:61–68.

17 Olmesead, A., Rhode, P. An Impossible Undertaking: The Eradication of Bovine tuberculosis in the United States. *The Journal of Economic History*, Vol.64, No 3 (September 2004), P.1–39.

18 Slavchev, G., Michailova, L., Markova, N. Stress-induced L-forms of *M. bovis*: challenge to survivability. *New Microbiologica.* 2013, 36:157–166.

19 WHO Report Global Tuberculosis Control 2010 World Health Organization; WHO Library Cataloguing-in-Publication Data 2010; 218pp p.16.

20 Tian, Y.S. Clinical End-Points Associated with Mycobacterium tuberculosis and Lung Cancer: Implications into Host-Pathogen Interaction and Coevolution / Y.S. Tian, T. Hao, B. Cao [et al.] / *Bio Med Research Intern.* Vol. 2015 (2015) 9pp.

	<p>Средство дезинфицирующее «Пермакс»</p> <ul style="list-style-type: none"> → содержит перекись водорода, молочную кислоту, секвион; → обладает широким спектром антимикробного действия; → не обладает местно-раздражающим и сенсбилизирующим действием; → предназначено для проведения профилактической и вынужденной дезинфекции животноводческих помещений, в т.ч. в присутствии животных 	<p>Концентрат средства дезинфицирующего «Надкарбосепт»</p> <ul style="list-style-type: none"> → активно действующие компоненты – перекись водорода, надкислотные группы; → предназначен для проведения профилактической и вынужденной дезинфекции животноводческих помещений; → обрабатывают в присутствии сельскохозяйственных животных 	<p>Средство дезинфицирующее «Криокс»</p> <ul style="list-style-type: none"> → состоит из перекиси водорода, продуктов каталитического взаимодействия уксусной и янтарной кислот; → обладает антимикробным, вирулицидным, фунгицидным и протозидным действием по отношению к группам малоустойчивых, устойчивых и высокоустойчивых возбудителей, активно по отношению к возбудителям, вызывающим болезни пчел
---	---	--	---