

УДК 619:616-076:079.4:579.873.21

Притыченко А.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент\*,

Сас А.С.\*

Лысенко А.П., доктор ветеринарных наук, профессор\*\*,

Архипов И.Н., кандидат ветеринарных наук\*\*

\*УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск

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

## ВЫДЕЛЕНИЕ ИЗМЕНЕННЫХ ФОРМ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗА ИЗ КРОВИ КОРОВ, РЕАГИРОВАВШИХ НА ТУБЕРКУЛИН

### Резюме

При бактериологическом исследовании крови с применением стимуляторов роста и питательных сред ВКГ и Микофаст у здоровых телят результат был отрицательным, а у 4 из 5 коров благополучного по туберкулезу стада были выделены измененные микобактерии туберкулеза, частично трансформировавшиеся в кислотоустойчивые кокки и палочки, агглютинировавшиеся антисывороткой к антигенами бациллярной формы *M. tuberculosis-M. bovis* и, имевшие специфические участки ДНК 16SRNA и MPB 70. Используемые методы ускоренной бактериологической диагностики позволили обоснованно удалить из стада потенциально опасных животных и исключить возможность возникновения активного заболевания в срок 6-9 суток.

### Summary

Bacteriological research with use of auxesis and roewth medium WKG and Micofast of blood shows, that the result in health calves was negative, in 4 of 5 cows in the tuberculosis-safe heard were found micobacteria's of tuberculosis, partly transformed in acid-fast cocci and rods, agglutinated with antiserum of bacillary form antigens *M.tuberculosis-M.bovis* with stecific DNA-parts 16SRNA and MPB 70. Used methods of expeditious bacteriological diagnostic allow to delete reasonably potential dangerous animals and to rule out development of active disease during 6-9 days and nights.

(Поступила в редакцию 24.05.2011)

### ВВЕДЕНИЕ

Несмотря на благополучие по туберкулезу большинства хозяйств республики, уровень выявления реагирующих на туберкулин коров за последние годы был достаточно высоким (0,3-0,7%). Ужесточение требований к критериям благополучия стад по туберкулезу (отсутствие реакций на туберкулин), вызывает необходимость использования методов быстрого выяснения их этиологии [2,10].

Ранее считалось, что туберкулиновые реакции без патоморфологического и бактериологического подтверждения туберкулеза связаны, главным образом, с инфицированием крупного рогатого скота атипичными (нетуберкулезными, НТМБ) микобактериями [11]. Исследования, проведенные в Республике Беларусь, свидетельствуют о широком распространении НТМБ, преимущественно IV группы по Runyon во внешней среде и в животноводческих помещениях [9]. Вместе с

тем, несмотря на то, что у НТМБ есть антигены общие с микобактериями туберкулеза (МБТ), в условиях эксперимента часто не удавалось вызвать гиперчувствительность к туберкулину у животных [4]. Кроме того, гиперчувствительность к туберкулину, индуцируемая НТМБ, непродолжительна и реакции быстро «выпадают» [4,5,9]. На практике в благополучных хозяйствах реакции на туберкулин часто весьма интенсивны, и носят устойчивый характер [11].

С появлением новых методов бактериологической и молекулярно-генетической диагностики [3] было установлено, что скрытая туберкулезная инфекция, также вносит вклад в индукцию туберкулиновых реакций у крупного рогатого скота [7,9]. В современном молочном скотоводстве, благодаря систематической диагностике, превалируют ранние стадии инфекции [4]. МБТ в организме находятся под контролем иммунной системы, не вызывая явного заболевания [10,11]. Такая

персистенция еще не болезнь, но потенциально опасна, так как ухудшение условий содержания и развитие вторичных иммунодефицитов, может стимулировать развитие болезни. Кроме того, нельзя исключить вероятность передачи инфекции животным и человеку с молоком и мясом [3]]. Поэтому, выделение измененных форм МБТ у крупного рогатого скота надо рассматривать, как маркер туберкулезной инфекции, а не как основание для наложения карантина [1,6,7].

При попадании в организм, особенно небольшого количества МБТ со сниженной вирулентностью, почти всегда под действием факторов иммунной системы происходит их трансформация в L-формы и CWDF (cell wall-defective forms) – формы с дефектами клеточной стенки, представленные нестойкими палочками, кокками, шаровидными и ветвящимися структурами [1,7,8,10]. Такие формы, как правило, не растут на яичных питательных средах (Левенштейна-Иенсена, Гельберга, Петраньяни и др.). В последнее время, для их выделения рекомендована питательная среда ВКГ со стимулятором роста [7]. Разрабатываются и другие питательные среды для выделения CWDF микобактерий туберкулеза [1,7,12].

Морфология и свойства CWDF микобактерий туберкулеза существенно отличаются от классических бациллярных форм. Однако они сохраняют специфичные для МБТ антигены, по которым их можно идентифицировать, например, в реакции агглютинации [1,7,9,12]. Наиболее точную видовую идентификацию позволяет провести полимеразная цепная реакция (ПЦР), направленная на выявление специфических участков ДНК МБТ [1,7,12].

**Цель исследований** - изучение этиологии реакций на туберкулин у коров в благополучном по туберкулезу стаде с применением новых методов бактериологической диагностики туберкулеза и ПЦР.

## МАТЕРИАЛЫ, МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

300 голов коров благополучного по туберкулезу стада исследовали туберкулином очищенным (ТО) для млекопитающих УП «Витебская биофабрика», который вводили внутрикочно безыгольным инъектором

(0,2 см<sup>3</sup> 10000МЕ).

Реакции учитывали через 72 ч.

От 5 реагирующих на туберкулин коров и 5 клинически здоровых телят 1 месячного возраста взяты пробы крови (по 5 см<sup>3</sup> в стерильные одноразовые шприцы).

Гемолизированную кровь (после замораживания) смешивали (1:2) со стимуляторами роста ВКГ («Ганза» Украина) и Микофаст (экспериментальный состав). Смеси инкубировали 24 ч при 37<sup>0</sup>С и по 0,7 мл высевали на питательную среду ВКГ и Микофаст, разлитые в стерильные пластиковые чашки Петри. Чашки инкубировали 5 суток при 37<sup>0</sup>С и просматривали ежедневно.

При обнаружении роста бактериальную массу колоний исследовали в реакции агглютинации (РА) на предметных стеклах РА в 0,9% растворе NaCl (контроль самоагглютинации), К- (отрицательная контрольная сыворотка не содержащая антител к антигенам микобактерий туберкулеза), К+ (антисыворотка к комплексу бациллярных антигенов *M. tuberculosis-M. bovis*, истощенная антигенами нетуберкулезных микобактерий). Реакцию учитывали через 1-2 мин, стекла высушивали, фиксировали и окрашивали по Цилю-Нильсену. Окрашенные мазки просматривали на микроскопе Olimpus B51X.

Для ПЦР из культур выделяли ДНК путем инкубации взвеси в лизирующем буфере 10 мин при 95<sup>0</sup>С.

ПЦР ставили с праймерами 16SRNA и MPB70 (0,5-06, 1 ед.), при условиях: 2 мМ MgCl<sub>2</sub>=2 мкл, Таq-полимеразы-2 ед. (для объема 25 мкл). Амплификацию проводили по программе 1 цикл (94 °С 4 мин), 30 циклов (94 °С 1 мин, 60 °С 1 минута, 72 °С, 1 мин), 1 цикл (72 °С, 10 мин).

Ампликоны подвергали электрофорезу в 1,5% агарозном геле с бромистым этидием при 10 В/см. Результаты учитывали на трансиллюминаторе (Bio-Rad 2000).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При посеве контрольных проб крови от клинически здоровых телят на питательные среды ВКГ и Микофаст роста не обнаружено. Эти результаты подтверждают специфичность метода при исследовании здоровых, не инфицированных животных.

При посеве крови реагирующих на ту-

беркулин коров, рост на 2-3 сутки во всех случаях получен рост на питательной среде ВКГ (100%) и в 6 случаях (60%) на среде Микофаст (таблица 1).

На среде ВКГ отмечался рост мелких колоний. На среде Микофаст культуры росли в виде крупных маслянистых колоний (рисунок 1).

Таблица 1 – Посев проб крови реагирующих на туберкулин коров на питательные среды ВКГ и Микофаст

Инв.№ коровы, № чашки	Рост на ВКГ	РА изолята в 0,9% растворе NaCl, К-, К+	Рост на Микофаст	РА изолята в 0,9% растворе NaCl, К-, К+	Результат
10863 (1)	+	-, -, -	нет		контаминация
10863 (2)	+	-, -, ++	нет		Изм. МБТ?
96233 (1)	+	-, -, +++++	+	-, -, +++++	Изм. МБТ
96233 (2)	+	-, -, +++++	+	-, -, +++++	Изм. МБТ
96709 (1)	+	-, -, -	нет		
96709 (2)	+	-, -, -	нет		
30297 (1)	+	-, -, +++++	+	-, -, +++++	Изм. МБТ
30297 (2)	+	-, -, +++++	+	-, -, +++++	Изм. МБТ
11928 (1)	+	-, -, -	+	-, -, +++++	Изм. МБТ
11928 (2)	+	-, -, -	+	-, -, +++++	Изм. МБТ



Рисунок 1 – Посев крови коровы №96233 на среду Микофаст, 4 сутки инкубации

При исследовании в РА, 5 культур (50%), выделенных на среде ВКГ реагировали с антисывороткой к *M. tuberculosis-M. bovis*.

Из 6 культур выделенных на среде Микофаст, в РА реагировали -4 (66,7%). В 0,9% растворе NaCl и в К- суспензии культур ос-

тавались гомогенными, а в антисыворотке к *M. tuberculosis-M. bovis* давали выраженный агглютинат (рисунок 2). Полученные результаты указывали на то, что большинство выделенных культур содержали общие антигены с *M. tuberculosis-M. bovis*.



Рисунок 2 - Суспензия изолята 96233 (Микофаст) в К- (контрольной отрицательной сыворотке) и в «бацилярной» антисыворотке *M. tuberculosis-M. bovis*.

В мазке ВКГ-изолята коровы 10863 (2). обнаружены формы не кислотоустойчивых (синего цвета), крупных кокков и палочек.

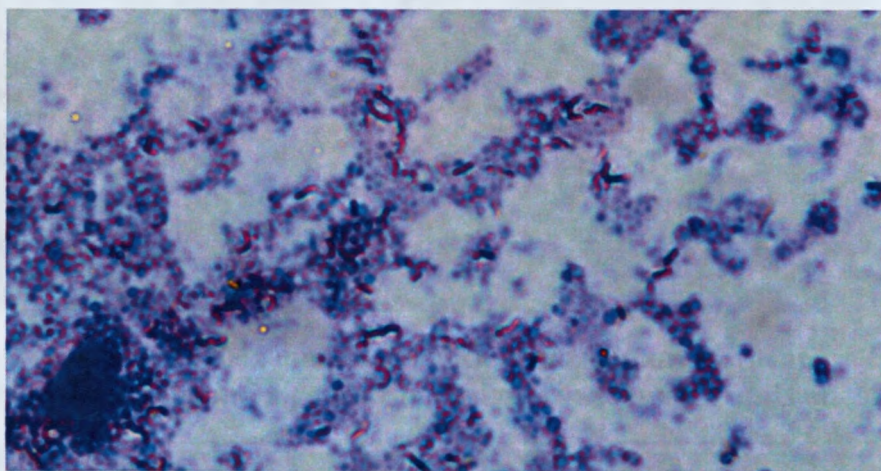
С учетом того, что изолят агглютинировался антисывороткой *M. tuberculosis-M. bovis*, можно предположить, что культура – изме-

ненные МБТ.

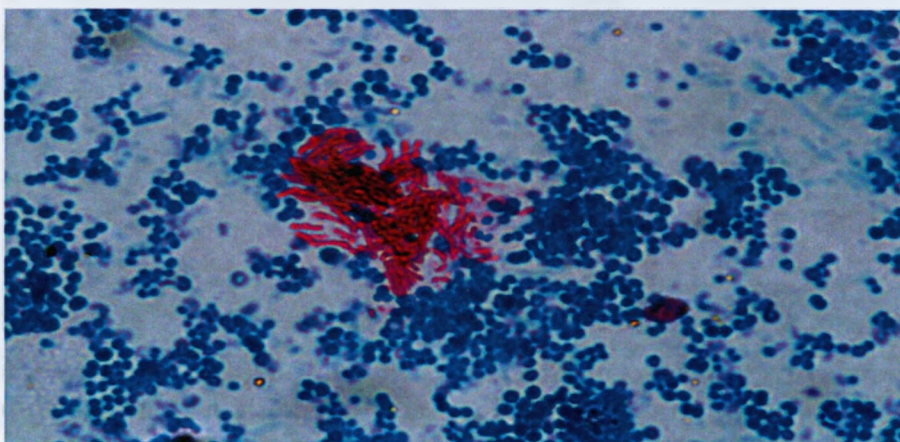
На рисунке 3 представлены результаты микроскопии ВКГ-изолята коровы 96233 (1). В мазке присутствуют неокислотоустойчивые (синего цвета) кокковидные формы и формируемые ими кислотоустойчивые (красные) палочки. С учетом положительных результатов РА сделано заключение, что это измененные МБТ, трансформирующиеся в бациллярную форму возбудителя. Тот факт, что в крови коровы 96233 присутствовали МБТ, однозначно подтвердили ре-

зультаты ее посева на среду Микофаст (рисунок 4). Из крови были выделены характерные для измененных форм МБТ крупные кокковидные формы и типичные рубиново-красные палочки.

Изолят коровы 96709 (1), выделенный на среде ВКГ был представлен неокислотоустойчивыми (синего цвета) кокковидными формами. Результат РА культуры был отрицательным, и на среде Микофаст проба не дала роста, что не позволило сделать предположение о принадлежности культуры.



**Рисунок 3 – Результаты микроскопии изолята коровы 96233 (1) со среды ВКГ. Окраска по Цилю-Нильсену (10x100)**



**Рисунок 4 – Результаты микроскопии изолята коровы 96233 (1) со среды Микофаст. Окраска по Цилю-Нильсену (10x100). В центре палочки рубиново-красного цвета**

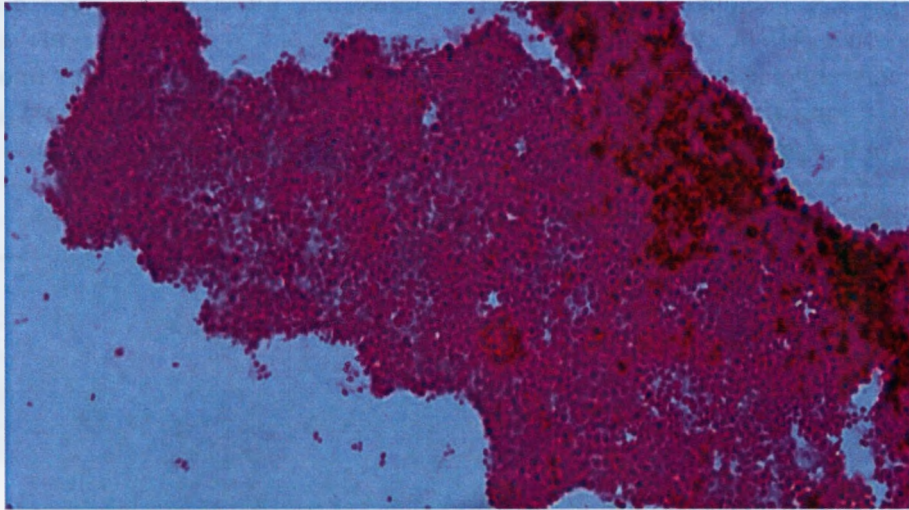
В мазке ВКГ-изолята коровы 30297 обнаружены неокислотоустойчивые (синего цвета) кокковидные формы и характерные для измененных микобактерий туберкулеза тетрады кокков и кокков с частичной кислотоустойчивостью. С учетом положительных результатов РА культуры, можно сделать заключение, что это измененные МБТ. Эти

данные однозначно подтверждают результаты посева пробы крови коровы 30297 на среде Микофаст, на которой получен рост кислотоустойчивых рубиново-красных кокков (рисунок 5).

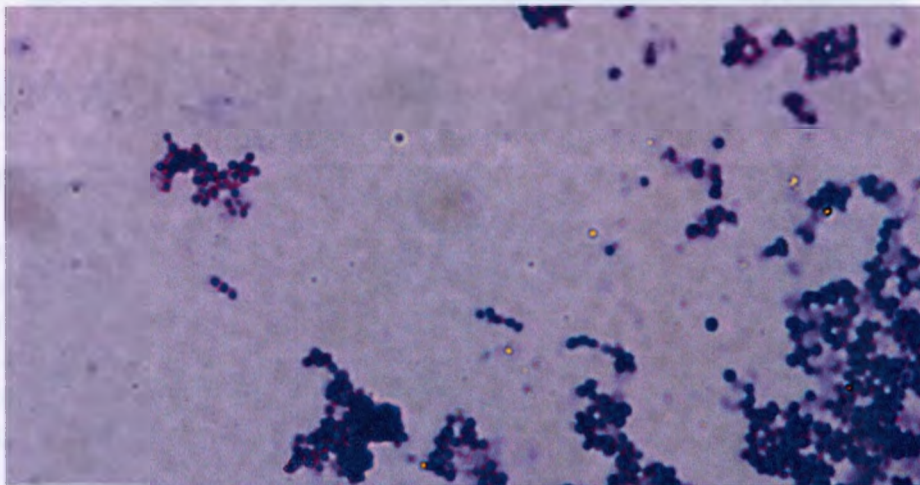
При посеве крови коровы 11928 на среду ВКГ получен рост полиморфной культуры, которая не агглютинировалась антисыворот-

кой *M. tuberculosis*-*M. bovis*. Вероятно, это можно расценить, как контаминация. Вместе с тем, при посеве этой же пробы крови на питательную среду Микофаст были получены типичные для МБТ неокислотоустойчивые крупные кокки, трансформирующиеся в ру-

биново-красные палочки (рисунок 6) и агглютинировавшиеся антисывороткой *M. tuberculosis*-*M. bovis*. Такой результат связан с тем, что стимулятор роста Микофаст содержит ингибитор банальной микрофлоры, не препятствующий росту МБТ.



**Рисунок 5 – Результаты микроскопии изолята коровы 30297 со среды Микофаст. Окраска по Цилю-Нильсену (10x100), в мазке рубиново-красные кокки**



**Рисунок 6 – Результаты микроскопии изолята коровы 11928 (2) со среды Микофаст. Окраска по Цилю-Нильсену (10x100). Видны синие кокки, трансформирующиеся в красные палочки**

Безусловно, что выделение измененных культур микобактерий туберкулеза, резко отличающихся по морфологии и тинкториальным свойствам от классического возбудителя болезни, существенно повышает требования к их идентификации. Поэтому, выделенные культуры на средах ВКГ и Микофаст, были исследованы в ПЦР с праймерами 16SRNA, позволяющими отнести культуру к роду *Mycobacterium* и праймерами MPB70, характерными для комплекса *M. tuberculosis*-

*M. bovis* (таблица 2).

Из таблицы 2 видно, что лишь культура 10863 (1) не дала амплификатов с размерами, характерными для участков 16SRNA и MPB70. Это коррелировало с результатами изучения морфологии культуры и отрицательными результатами РА. Культура 96709 ВКГ давала амплификат, соответствующий размеру участка 16SRNA, что позволило отнести ее к роду *Mycobacterium*. Все остальные культуры дали амплификаты в специфици-

ческих областях 16SRNA и MPB70, что указывало на их принадлежность к комплексу *M. tuberculosis-M. bovis*.

Результаты ПЦР и РА позволили сравнить чувствительность и специфичность использованных питательных сред. На питательной среде ВКГ рост получен в 100% посеянных проб. Однако в одной пробе получен пророст, а в другой неопределенный результат (специфичность 80%). На среде Микофаст рост получен в 70% проб, но во всех случаях результаты ПЦР подтвердили, что выделенные культуры относились к комплексу *M. tuberculosis-M. bovis* (специфичность

100%). Более того, на среде Микофаст чаще отмечался рост типичных кислотоустойчивых культур МБТ.

В целом, проведенные исследования позволили установить, что туберкулиновые реакции в стаде считавшимся благополучным по туберкулезу, связаны с латентной туберкулезной инфекцией. Эти результаты подтверждают данные А.П.Лемиша (2008) [8], И.Н.Архипова (2010) [9] согласно, которым в благополучных по туберкулезу стадах у 20-30% коров реакции на туберкулин, могут быть связаны с латентной туберкулезной инфекцией.

Таблица 2 – Сопоставление результаты посева проб крови реагировавших на туберкулин коров на питательные среды ВКГ и Микофаст, РА и ПЦР выделенных культур

Инв.№ № чашки	Рост на ВКГ	РА изоля- та в 0,9% растворе NaCl, K- K+	Рост на Мико- фаст	РА изо- ля-та в 0,9% NaCl, K- K+	Результат	ПЦР 16SRNA	ПЦР MPB70	Результат
10863 (1)	+	-, -, -	нет		Контами- нация	-	-	Контами-нация
10863 (2)	+	-, -, ++	нет		Изм. МБТ?	+	+	<i>M. tubercu- losis- M. bovis.</i>
96233 (1)	+	-, -, +++++	+	-, -, +++++	Изм. МБТ	+	+	<i>M. tubercu- losis- M. bovis.</i>
96233 (2)	+	-, -, +++++	+	-, -, +++++	Изм. МБТ	+	+	<i>M. tubercu- losis- M. bovis.</i>
96709 (1)	+	-, -, -	нет			+	-	Род <i>Myco- bacterium</i>
96709 (2)	+	-, -, -	нет					Не иссле- довали
30297 (1)	+	-, -, +++	+	-, -, +++++	Изм. МБТ	+	+	<i>M. tubercu- losis- M. bovis.</i>
30297 (2)	+	-, -, +++	+	-, -, +++++	Изм. МБТ	+	+	<i>M. tubercu- losis- M. bovis.</i>
11928 (1)	+	-, -, -	+	-, -, +++++	Изм. МБТ	+	+	<i>M. tubercu- losis- M. bovis.</i>
11928 (2)	+	-, -, -	+	-, -, +++++	Изм. МБТ	+	+	<i>M. tubercu- losis- M. bovis.</i>

На основании полученных результатов, «Санитарных и Ветеринарно-санитарных правил по профилактике и ликвидации заболеваний, общих для человека и животных. Туберкулез» и Ветеринарно-санитарных правил «Диагностика туберкулеза животных» (утверждены и введены в действие постановлением Министерства сельского хозяйства и продовольствия и Министерством здравоохранения Республики Беларусь № 31/21 26.03. 2010 г., № 46 от 30.07.2010 г.) для стада были разработаны рекомендации,

включавшие:

- проведение эпизоотологического анализа причин возникновения латентной туберкулезной инфекции (анализ результатов аллергической и бактериологической диагностики туберкулеза, динамики выявления реагировавших животных, происхождения животных, ввод животных в стадо);
- проведение диагностического убоя реагировавших животных в течение 15 суток, после выявления;
- патологоанатомическую экспертизу туш

с отбором лимфатических узлов для бактериологического исследования;

- дезинфекцию животноводческих помещений после удаления реагировавших коров препаратами специфически, действующими на микобактерии туберкулеза (КДП, Белопаг, Сандим Д, Микроцид, Любисан Эко и др.);

- медосмотр, флюорографию обслуживающего персонала фермы и эпидемиологическое расследование (наличие больных людей и прошедших курс лечения от туберкулеза среди животноводов и в ближайших населенных пунктов, привлечение к работе на ферме лиц, не прошедших медосмотр и флюорографию).

### ВЫВОДЫ

1 Реакции на туберкулин в обследованном благополучном по туберкулезу стаде были связаны с латентной туберкулезной инфекцией.

2 При ускоренной бактериологической диагностике туберкулеза путем посева крови на питательные среды ВКГ и Микофаст удалось выделить не только измененные неки-

слотоустойчивые микобактерии туберкулеза, но и формы трансформирующиеся в типичные кислотоустойчивые рубиново-красные палочки.

3 Посев крови здоровых, не инфицированных животных на питательные среды ВКГ и Микофаст во всех случаях дал отрицательный результат (100% специфичность у здоровых животных). При посеве крови туберкулин-положительных животных, питательная среда ВКГ оказалась более чувствительной, чем Микофаст (рост в 100% посеянных проб), но менее специфичной (80%). Чувствительность среды Микофаст составила 70% при 100% специфичности.

4 Применение методов ускоренной бактериологической диагностики туберкулеза и ПЦР позволяет в срок 6-9 суток определить статус стада.

5 Использованные методы ускоренной бактериологической диагностики позволили обоснованно удалить из стада потенциально опасных животных и предупредить возможность возникновения активного заболевания.

### ЛИТЕРАТУРА

1 Архипов, И.Н. Серологические, бактериологические и молекулярно-генетические маркеры туберкулезной инфекции крупного рогатого скота Автореф. дисс. ... канд. вет. наук.-Минск.- 2011.- 24с.

2 Ветеринарно-санитарные правила «Диагностика туберкулеза животных». Утверждены и введены в действие постановлением Министерства сельского хозяйства и продовольствия № 46 от 30.07.2010 г

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

4 Донченко А.С. Туберкулез крупного рогатого скота, верблюдов, яков, овец и пантовых оленей / А.С. Донченко, В.Н. Донченко // РАСХН. Сиб. отд.-ние. ИЭВСиДВ. - Новосибирск, 1994. - С. 4-23.

5 Донченко А.С., Овдиенко Н.П., Донченко Н.А. Диагностика туберкулеза крупного рогатого скота. - Новосибирск, 2004. - 309 с.

6 Земскова З.С., Дорожкова Н.И. Скрыто протекающая туберкулезная инфекция: М.- Медицина.- 1984.- 221 с.

7 Лемиш А.П. Ранняя диагностика туберкулеза крупного рогатого скота на основе выявления бактериологического маркера инфекции: Автореф. дисс. ... канд. вет. наук.-Минск.- 2008.- 21с.

8 Лысенко А.П., Лемиш А.П. Архипов И.Н. Но-

вик Т.П. Притыченко А.Н., Власенко И.Г. Бактериологические маркеры микобактериальной инфекции и антитела в крови у животных после введения туберкулина // Ветеринарна медицина.- Межвідомчий темтичний науковий збірник.- 92.- 2009.-Харків.- Міжнародна науково-практична конференція «Мониторинг, прогнозування, хвороб тварин із використанням сучасних методів епізоотології, молекулярної біології та біотехнології» (м.Феодосія, 14-17 вересня 2009 р.)- с.294-298.

9 Румачик И.И. Совершенствование диагностики и мер борьбы с туберкулезом у крупного рогатого скота и свиней. Диссертация. док. вет.наук.-Минск – 1997.-339с.

10 Санитарные и Ветеринарно-санитарные правила по профилактике и ликвидации заболеваний, общих для человека и животных. Туберкулез. Утверждены и введены в действие постановлением Министерства сельского хозяйства и продовольствия и Министерством здравоохранения Республики Беларусь № 31/21 26.03. 2010 г.

11 Шаров А. Н. Аллергическая диагностика туберкулеза у животных: повышение ее эффективности // Автореф. дис. докт.вет. наук.- М., 1989.- 29 с.

12 Zhang, Y. Persistent and dormant tubercle bacilli and latent tuberculosis /Y. Zhang // Front Biosci. – 2004. – № 1(9). – P. 1136-1156.