

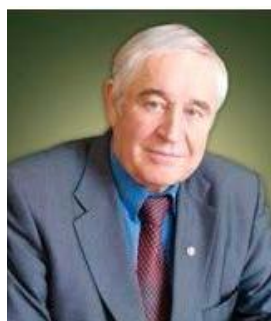
УДК 619:616.98:579.873.21 Т – 07

ВЗАИМОСВЯЗЬ ЦИРКУЛЯЦИИ АТИПИЧНЫХ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЁЗА ВО ВНЕШНЕЙ СРЕДЕ С ПРОЯВЛЕНИЕМ ТУБЕРКУЛИНОВЫХ РЕАКЦИЙ У СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

С. В. Ионина, канд. биол. наук



Н. А. Донченко,
д-р вет. наук



А. С. Донченко,
акад. РАН

Сибирский федеральный научный центр агrobiотехнологий РАН

Ключевые слова: нетуберкулёзные микобактерии, крупный рогатый скот, ППД-туберкулин для млекопитающих, туберкулёз, колонии, питательные среды, генетическая структура, туберкулинизация, объекты внешней среды.

Установлена взаимосвязь между циркуляцией нетуберкулёзных микобактерий, изолированных из объектов внешней среды и организма грызунов, и возникновением внутрикожных аллергических реакций у крупного рогатого скота при введении ППД-туберкулина для млекопитающих. Проведена бактериологическая и генетическая идентификация нетуберкулёзных микобактерий, выделенных из объектов внешней среды в хозяйствах Новосибирской области.

THE RELATIONSHIP BETWEEN THE CIRCULATION OF ATYPICAL MYCOBACTERIA IN THE ENVIRONMENT WITH THE MANIFESTATION OF TUBERCULIN REACTIONS IN SELSKOHOZAYSTVENNIH

S. V. Ionina, N. A. Donchenko, A. S. Donchenko

Siberian Federal scientific center of agrobiotechnology the Russian Academy of Sciences

Key words: mycobacteria tuberculosis, large horned live-stock, PPD-tuberculin for mammals, tuberculosis, colonies, nourishing ambiances, genetic structure, tuberculinization, objects of the external ambience.

The relationship between circulating mycobacterium isolated from objects in the environment and the body of rodents and the emergence of intradermal allergic reactions in cattle when administered PPD-tuberculin for mammals. Conducted bacteriological and genetic identification of mycobacteria, you fission of environmental objects in the farms of the Novosibirsk region.

Поголовье крупного рогатого скота в Сибири за последние годы практически оздоровлено от туберкулёза. Однако контроль эпизоотической ситуации по туберкулёзу в благополучных хозяйствах осложняется выявлением в них животных, реагирующих на проведение внутрикожной туберкулиновой пробы, осуществляемой ППД-туберкулином для млекопитающих [1].

При послеубойном осмотре туш таких животных изменений, характерных для туберкулёза, не отмечается. Это говорит о том, что животные инфицированы непатогенными – не-

туберкулёзными микобактериями, которые, проникая в организм животных, вызывают у них различные иммунологические реакции. В результате этого организм животных претерпевает перестройку иммунологической памяти, и они реагируют на внутрикожную туберкулиновую пробу. В Сибири неспецифические туберкулиновые реакции у крупного рогатого скота обусловлены в основном персистенцией в организме *M. fortuitum*, *M. smegmatis* и др., которые могут длительное время сохраняться в объектах внешней среды [2, 3]. Указанный феномен иммунологической перестройки организма животных вносит большие трудности в дифференциацию внутрикожных туберкулиновых реакций при исследовании ППД-туберкулином для млекопитающих [4].

В последние годы в Сибири отмечены зоны миграции нетуберкулёзных микобактерий, экологическими нишами которых являются объекты внешней среды и природные резервуары, такие как грызуны и птицы, чаще всего голуби [5].

Для идентификации нетуберкулёзных микобактерий используют различные методы бактериологической диагностики, основными из которых являются культуральный метод и биохимические тесты. Помимо бактериологической диагностики в последнее время стали использовать молекулярно-генетические методы. Генотипирование микобактерий, в частности, является важным звеном в проведении высокодостоверных клинико-эпизоотологических исследований для выявления источника сенсibilизации животных нетуберкулёзными микобактериями [6].

Для проведения научных исследований был использован культуральный метод, включающий предпосевную обработку методом Аликаевой объектов внешней среды (почва, вода, навоз, сено и силос) и обработку первичного биоматериала от сельскохозяйственных животных и внутренних органов грызунов методом седиментации с последующим посевом полученного осадка на плотную питательную среду Финн-2 [7] и Левенштейна-Йенсена [8]. Затем применялся биологический метод, заключающийся в заражении беспородных белых мышей полученной в результате обработки биоматериала суспензией. Заражение проводили в виварии ФГБНУ ИЭВСиДВ, на каждую пробу брали 5 мышей массой 25–30 г, суспензию вводили в подхвостовую вену в количестве 0,1 мл. Эвтаназию лабораторных животных проводили через 14 дней, так как ранее проведенные в лаборатории исследования свидетельствовали о том, что через данный промежуток времени в организме белых мышей происходит максимальное накопление атипичных (нетуберкулёзных) микобактерий [9]. Патолого-анатомические исследования мышей показали гиперемии легких, увеличение селезенки и печени.

При посеве на плотные питательные среды как первоначального биоматериала, так и биоматериала, полученного при забое лабораторных животных, наблюдения за ростом культур проводили ежедневно в течение 7 дней, в дальнейшем – через каждые 10 дней. Культурально-морфологические свойства появившихся на питательных средах колоний оценивали по характеру роста, форме колоний и методом прямой микроскопии.

При постановке полимеразной цепной реакции (ПЦР) со специфическими праймерами на район *sig*-гена *M. avium*, последовательности 16S-23S рРНК на вид *Mycobacterium* и системы *senX3-regX3* для дифференциации типичных микобактерий, выделенных из объектов внешней среды, секвенирования фрагментов интересующих генов руководствовались общими требованиями к проведению реакции и олигонуклеотидным праймерам [10, 11]. Филогенетический анализ осуществляли с использованием программ MEGA 2.1. и GeneDoc 2.6. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием бутстреп-теста. Результаты ПЦР визуализировали с помощью электрофореза в 1,7% -м агарозном геле и документировали на трансиллюминаторе UVT 1. Реакция считалась положительной, если полученный бэнд от исследуемой пробы на электрофорезе имел ожидаемый размер и совпадал с контрольным образцом.

Взаимосвязь циркуляции микобактерий в объектах внешней среды и выявления реакции на введение ППД-туберкулина для млекопитающих у крупного рогатого скота была изучена при

проведении научных исследований в трех районах Новосибирской области, в каждом из которых было взято по одному хозяйству.

В хозяйстве первого района исследовано 2132 головы крупного рогатого скота, на внутрикожное введение ППД-туберкулина реагировало 146 животных (6,84% от всего количества исследованных), у которых при вскрытии туберкулёзных изменений во внутренних органах и лимфатических узлах не обнаружено. Из биоматериала животных бактериологическим исследованием выделены и идентифицированы микобактерии I, II и IV групп по Раньону, *M. avium* и *M. paratuberculosis*.

В данном хозяйстве были взяты пробы из объектов внешней среды (почва, навоз, вода, сено, силос) и биоматериал у отловленных грызунов (мыши) в количестве 19 проб.

Лабораторными исследованиями материала из 7 проб почвы в 2 пробах были изолированы микобактерии IV группы по Раньону и *M. avium*. Из сена (3 пробы) и силоса (3 пробы) выделены микобактерии IV группы по Раньону; из навоза крупного рогатого скота (3 пробы) во всех пробах выделены микобактерии туберкулёза IV группы по Раньону. Из 3 проб воды – *M. avium*. Из внутренних органов и лимфатических узлов органов грызунов через 2 месяца после посева на питательные среды отмечен рост культур, идентифицированных как микобактерии III и IV групп по Раньону.

При постановке ПЦР с образцом воды, взятым на территории пастбища, и образцом почвы идентифицированы ДНК *M. avium*. При обработке проб с территории пастбища в 7 случаях выявлена ДНК *M. fortuitum*, в 3 – *M. smegmatis*.

В хозяйстве второго района исследовано внутрикожной туберкулиновой пробой 1100 голов животных, 148 голов (13,45% от всего количества исследованных) реагировало на введение ППД-туберкулина для млекопитающих. При убое животных на секции туберкулёзных изменений не обнаружили. Из биоматериала этих животных при бактериологическом исследовании изолированы и идентифицированы микобактерии IV группы по Раньону.

При лабораторной обработке объектов внешней среды получены следующие результаты. Из 11 проб силоса в 9 выделили микобактерии туберкулёза IV группы по Раньону. Из 3 проб почвы изолированы и идентифицированы микобактерии III и IV группы по Раньону и *M. avium*. При посеве биоматериала внутренних органов и лимфатических узлов грызунов из 16 проб изолированы и идентифицированы микобактерии III и IV группы по Раньону.

ПЦР-анализ полученных культур и ДНК, выделенной из объектов внешней среды и верхнего слоя засеянной питательной среды, позволил их типировать как *M. avium* (n=1, почва), *M. fortuitum* (n=4, силос) и *M. smegmatis* (n=6, силос и почва). Из 20 анализируемых проб биоматериала грызунов в 2 выявлено сочетанное инфицирование двумя видами микобактерий. В первом случае выявлено сочетание *M. avium* и *M. microti*, а во втором – *M. avium* и *M. fortuitum*.

В хозяйстве третьего района исследовали внутрикожной туберкулиновой пробой 2988 голов животных, из них реагировало на введение ППД-туберкулина 110 голов (3,68% от всего количества исследованных), на секции у животных не обнаружены туберкулёзные изменения. Из биоматериала крупного рогатого скота были изолированы и идентифицированы микобактерии туберкулёза IV группы по Раньону и *M. avium*.

При обработке объектов внешней среды из этого хозяйства получены следующие результаты. Сена обработано 3 пробы – из одной изолированы и идентифицированы микобактерии II группы по Раньону; из 9 проб силоса в 5 изолированы и идентифицированы микобактерии III и IV групп по Раньону и *M. avium*; из 8 проб почвы в 6 изолированы и идентифицированы микобактерии III и IV групп по Раньону и *M. avium*. Из биоматериала грызунов в 5 пробах изолированы и идентифицированы микобактерии II и III групп по Раньону.

При обработке методом ПЦР в 1 пробе сена выделена ДНК атипичной не идентифицированной микобактерии. При обработке 5 проб силоса в 3 идентифицирована *M. smegmatis*, в 2 – *M. intracellulareae*. Из 8 проб почвы отмечено наличие ДНК *M. fortuitum* в 4, а в 2 пробах – ДНК *M. avium*.

Все выделенные микобактерии в соответствии с классификацией Раньона относятся к нетуберкулёзным микобактериям (атипичным).

При посеве первичного биоматериала (объекты внешней среды) и биоматериала, полученного в результате биологического исследования, микобактерии при рассмотрении их на поверхности питательных сред имели S-форму и бежевую окраску, колонии распределялись раздельно или имели форму слившихся между собой по поверхности среды, что соответствует колониям нетуберкулёзных микобактерий. При прямой микроскопии мазков культур микобактерий, окрашенных по Циль-Нильсену, обнаружены короткие и утолщённые кислотоустойчивые красные зернистые палочки, которые идентифицированы как микобактерии туберкулеза.

Нетуберкулёзные микобактерии, сенсibiliзирующие организм крупного рогатого скота при внутрикожном введении ППД туберкулина для млекопитающих, могут персистировать в организме грызунов и в объектах внешней среды. При вскрытии у таких животных не обнаруживают изменения, характерные для туберкулёзной инфекции.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. *Туберкулиновые реакции у крупного рогатого скота, сенсibiliзированного различными видами микобактерий*: сб. науч. тр. / ВАСХНИЛ. Сиб. отд-ние, ИЭВСиДВ. – Новосибирск, 1987. – С. 9–14.
2. *Выделение микобактерий из органов и тканей животных*: сб. науч. тр. / РАСХН. Сиб. отд-ние, ИЭВСиДВ. – Новосибирск, 1988. – С. 28–31.
3. *Вопросы эпизоотологии, диагностики и мероприятия по ликвидации туберкулёза и бруцеллёза животных*: сб. науч. тр. / ВАСХНИЛ. Сиб. отд-ние. – Новосибирск, 1987. – С. 28–32.
4. *Дифференциальная диагностика туберкулиновых реакций в благополучных по туберкулёзу хозяйствах: метод. рекомендации* / А.С. Донченко [и др.]. – Новосибирск, 2002. – 7 с.
5. *Качкин М.В.* Комплексная эпизоотологическая оценка проявления туберкулиновых реакций у животных на территориальном и популяционном уровне с использованием информационных технологий: автореф. дис. ... канд. вет. наук. – Новосибирск, 2007. – 167 с.
6. *Белобородова А.А.* Повышение эффективности лабораторной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота: автореф. дис. ... канд. вет. наук. – Новосибирск, 2008. – 147 с.
7. *А.с. № 325879 СССР*: МКИЗ С12k 1/06, № 1434125/31–16. Среда для культивирования микобактерий туберкулеза / Э.Р. Финн. – Заявл. 11.V.1970; опубли. 8.II.1973. – Бюл. № 10. – 4 с.
8. *Меджидов М.М.* Справочник по микробиологическим питательным средам: монография. – М.: Медицина, 2003. – 208 с.
9. *Молекулярные методы исследования в диагностике туберкулёза* / Т.В. Гребенникова [и др.] // Ветеринарная патология. – 2004. – № 1. – С. 92–93.
10. *MEGA 2: molecular evolution genetics analysis software* / S. Kumar, K. Tamura, I.B. Jakobsen [et al.] // Bioinformatics. – 2001. – Vol. 17. – P. 1244–1245.
11. *Saitou N., Nei M.* The Neighbor – joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol. Biol. Evol. – 1987. – Vol. 4. – P. 406–425.