

УДК 619:616-076:079.4:579.873.21

Лысенко А.П., Архипов И.Н., Лемиш А.П., Новик Т.П.

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

Власенко В.В., Власенко И.Г., Гаврилюк Н.Д.

Винницкий национальный аграрный университет, г. Винница

Усанов С.А., Гилеп А.А., Сергеев Г.В., Василевская А.В.

ГНУ «Институт биоорганической химии НАН Беларуси», г. Минск

РЕЗУЛЬТАТЫ ИДЕНТИФИКАЦИИ В РЕАКЦИИ АГГЛЮТИНАЦИИ И В ПЦР ИЗОЛЯТОВ ИЗ КРОВИ И ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ РЕАГИРОВАВШИХ НА ТУБЕРКУЛИН КОРОВ ПОЛУЧЕННЫХ НА СРЕДАХ ВКГ И ВЛАКОН*

*Бактериологическому исследованию с применением питательных сред ВКГ и ВЛАКОН подвергнут патологический материал и кровь 139 коров с реакциями на туберкулин. Весь патологический материал предварительно был проверен на средах накопления (ВКГ, ВЛАКОН). Установлено, что 23 изолята из крови и лимфатических узлов показали отрицательную реакцию агглютинации (РА), что совпало с отрицательными результатами полимеразной цепной реакции (ПЦР). Из 25 изолятов, реагировавших в РА - 17 (68%), дали положительную ПЦР с праймерами 16S RNA и MPV 70, хотя в мазках были обнаружены рубиново-красные формы. Результаты указывают на то, что отрицательный результат в РА может однозначно свидетельствовать о том, что изолят не относится к микобактериям туберкулеза. Отрицательная реакция ПЦР с праймерами возможно связана с отсутствием, особенно, у штаммов *M.tuberculosis*, соответствующих генов на что указывают исследования специалистов в гуманной медицине..*

Ключевые слова: питательные среды ВКГ, ВЛАКОН, микобактерии туберкулеза, реакция агглютинации (РА), полимеразная цепная реакция (ПЦР).

Несмотря на существующие средства диагностики и профилактики, актуальность проблемы туберкулеза не снижается - более половины населения планеты инфицировано, 2-3 млн. человек ежегодно умирают от болезни, выявляется 3-6 млн. голов туберкулинпозитивного крупного рогатого скота. В 1993 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) признала, что нарастающая эпидемия туберкулеза представляет глобальную угрозу человечеству [1]. В связи с этим, особую значимость представляет углубленное изучение биологии возбудителя болезни и разработка принципиально новых средств диагностики и профилактики болезни.

В Республике Беларусь в последние 20 лет число неблагополучных пунктов по туберкулезу крупного рогатого скота постоянно снижалось. Однако полностью исключить случаи возникновения болезни не удастся. Уровень выявления реагирующих животных остается высоким (0,3-0,5%), что существенно усложняет получение стадами статуса, официально признанных благополучными по туберкулезу [2].

* В статье использованы материалы научных исследований, проводимых в рамках договора о международном сотрудничестве ученых Украины и Беларуси.

Проблема туберкулиновых реакций в благополучных по туберкулезу стадах изучается, достаточно, давно. На такие «парааллергические» реакции обратили внимание еще в 20 –х годах XX столетия после первых успехов в борьбе с туберкулезом [32, 44]. Как правило, их связывали с инфицированием коров атипичными микобактериями или *M. avium* [4, 5, 6] но, учитывая современные представления об адаптивных возможностях возбудителя болезни, нельзя исключать роль латентной (скрытой) туберкулезной инфекции в индукции ГЗТ к туберкулину [7, 8].

Оценка эпизоотического состояния хозяйств по выявлению реагирующих на туберкулин животных и отсутствию туберкулезных изменений на секции, к сожалению, не отражает реального эпизоотического процесса, и не позволяет достоверно прогнозировать развитие ситуации. Иммунологический скрининг показал, что у 8-11% туберкулинпозитивных коров реакции могут быть связаны с инфицированием *M. bovis* и *M. tuberculosis*, так как у них в крови обнаруживаются антитела к видоспецифическим антигенам этих видов [7, 8].

Угроза рецидивов болезни заставляет ежегодно проводить туберкулинизацию и сдавать на убой реагирующих высокопродуктивных животных. Такие меры, в значительной степени, обоснованы, и считаются ранней профилактикой заболевания, однако, в силу относительно низкой чувствительности и специфичности пробы, они не позволяют выяснить причины реакций на туберкулин, источники и резервуары инфекции, проводить целенаправленную борьбу с возбудителем болезни. Кроме того, отсутствие прямого подтверждения персистенции возбудителя туберкулеза у туберкулинпозитивных животных, может расцениваться, как гипердиагностика, наносящая значительный экономический ущерб.

«Золотым стандартом» диагностики в ветеринарии считается посмертное выделение возбудителя туберкулеза на яичных питательных средах или получение положительного результата биопробы [4]. Однако даже в условиях относительного неблагополучия хозяйств в 80-е годы прошлого века, с помощью бактериологического исследования у туберкулинпозитивных коров без видимых патологоанатомических изменений удавалось выделить возбудитель туберкулеза лишь в 0,03-0,2% случаев [9]. Тем не менее, современная диагностика туберкулеза крупного рогатого скота продолжает базироваться на позициях мономорфизма и представлениях о достаточно простой биологии возбудителя болезни, хотя роль адаптивных форм (фильтрующиеся, L-формы, микобактерии с дефектами клеточных стенок) в инфекционном процессе доказана достаточно давно [10].

В значительной степени прямое выявление измененного возбудителя туберкулеза и его труднокультивируемых форм затруднено отсутствием простых, доступных и дешевых методов бактериологического исследования.

Существенный сдвиг в изучении возбудителя туберкулеза и методах ускоренного культивирования достигнут, благодаря разработке стимулятора роста и питательной среды ВКГ В.В.Власенко [11]. Установлено, что на питательной среде рост возбудителя туберкулеза, в том числе и труднокультивируемых форм удается получить уже через 24-72 ч после посева, причем выросшая бактериальная масса не загрязняется компонентами среды, как на полужидких средах и доступна для дальнейшего исследования [11].

С помощью питательной среды ВКГ был установлено и подтверждено, что классическая рубиново-красная палочка – лишь одна из форм развития возбудителя

туберкулеза [11]. Фактично, традиційні представлення, признаючи возбудителем тільки те форми, які мають класическі признакі, описанні на заре мікробіології, на сучасному етапі не дозволяють дати відповідь на ряд суттєвих питань причин активізації туберкульозної інфекції, понять її патогенез, виявити резервуари інфекції.

Унікальні властивості поживного середовища ВКГ, ВЛАКОН дозволяють отримувати ріст різних форм возбудителя туберкулеза, які, виходячи з традиційних представлень, важко віднести не тільки до певного виду, але і до роду *Mycobacterium*. В цій зв'язі важливо розробити не тільки прижиттєву бактеріологічну діагностику туберкулеза, але і доступні точні методи ідентифікації ізолятів.

Матеріали і методи досліджень. В дослідженнях використовували: «Набір для прискореного виявлення мікобактерій туберкулеза (на основі поживних серед ВКГ і ВЛАКОН)», «Набір сировоток для ідентифікації культур комплексу *M.bovis-M.tuberculosis*, вирощених на поживному середовищі ВКГ в реакції аглютинації (РА)», «Набір реактивів для детекції в ПЦР мікобактерій комплексу *M.tuberculosis* МТК-Т» (розроблені ГНУ «Інститут біоорганічної хімії НАН Білорусі»), а також 139 проб крові і патологічного матеріалу від реагуючого на туберкулін великого рогатого скоту.

Для посіву на середовище ВКГ кров'яні або гомогенати лімфатических вузлів змішували зі стимулятором росту ВКГ (1:1) і інкубували 24 години, висівали по 0,5-0,8 мл на разові чашки Петри зі середовищем ВКГ або ВЛАКОН. Чашки герметизували скотчем. Посіви інкубували при 37⁰С 7 днів. Ізоляти досліджували в пластинчатій реакції аглютинації (РА) з моноспецифічною антисировоткою до комплексу *M.tuberculosis-M.bovis*, контролювали служили негативна сировотка (К-) і 0,9% розчин хлориду натрію. Стекла з результатами реакції висувували, фарбували за Циль-Нільсену, і піддавали світловій мікроскопії (10x100), що дозволяло оцінити морфологію ізолятів і мікроскопічну картину аглютинації.

В ПЦР з праймерами IS 6110 досліджували безпосередньо патологічний матеріал. Ізоляти досліджували з праймерами MPB 70 з внутрішнім контролем (ВК) з праймерами 16sRNA. Її ампліфікація повинна була свідчувати про успішний перебіг ПЦР, а відсутність ампліфікації - про ложноотрицательну реакцію.

Результати досліджень. Весь патологічний матеріал попередньо був перевірений в ПЦР (праймери IS 6110). Во всіх випадках в ПЦР був отриманий негативний результат, але з вказаних проб на середовища накоплення (ВКГ, ВЛАКОН) було виділено 72 ізоляти.

Представлені результати ПЦР (праймери MPB 70) 68 ізолятів з крові і лімфатических вузлів реагуючих на туберкулін корів з наступною перевіркою в ПЦР з ВК.

З 68 ізолятів за результатами ПЦР з праймерами 16sRNA – 26 (38,2%) були віднесені до роду *Mycobacterium*. З них 22 (84,6%) – до *M. tuberculosis complex* (праймери MPB 70). При повторному дослідженні з ВКО ці результати були підтвержені. Крім того, 4 проби (№№41, 67, 69, 70) не дали ампліфікацію ВК і, тому їх можна було віднести до ложноотрицательних.

Вказані вище культури, а також деякі інші були перевірені в РА, включаючи мікроскопічну оцінку реакції.

Установлено, что 18 изолятов при испытании в пластинчатой РА дали отрицательную реакцию. Микроскопическая картина РА, также свидетельствовала об отсутствии агглютинации клеток. Эти данные совпали и с отрицательными результатами ПЦР (специфичность РА-100%). У 15 изолятов (65,2%) из 23, в ПЦР обнаружены специфические участки ДНК, характерные для МБТ. Интересно отметить, что кровь 2 коров образовывала в РИД положительную реакцию с соникатом *M.bovis*. Изоляты из крови этих коров интенсивно (++++) агглютинировались антисывороткой *M.bovis* с формированием мощных агглютинатов клеток и давали положительный результат ПЦР.

Обсуждение результатов. Отрицательные результаты прямого исследования крови и лимфатических узлов реагировавших на туберкулин коров в ПЦР подтвердило необходимость «обогащения» пробы ДНК МБТ. Такое явление связано с трудностями выделения ДНК МБТ из крови и патологического материала без видимых туберкулезных изменений, а также наличием в них ингибиторов. Это подчеркивает необходимость предварительного использования питательной среды накопления. Ранее, для этого испытывалась питательная среда Школьниковой [10], позволяющая за 1-2 месяца, получить рост измененных микобактерий для последующей идентификации в ПЦР [12]. Вместе с тем, такой продолжительный срок накопления, неприемлем для экспресс-диагностики, среда Школьниковой не рекомендовалась для посева крови, к тому же с нее трудно получить бактериальную массу изолятов для выделения относительно чистой ДНК МБТ. Указанные выше проблемы успешно решает питательные среды накопления (ВКГ, ВЛАКОН), позволяющие с высокой чувствительностью выделять измененные МБТ из крови [8]. Известно, что изоляты микобактерий туберкулеза, дают стойкую суспензию, в отличие от культур, выделенных на яичных средах. Это делает доступным их исследование в РА на наличие общих антигенов с классической формой возбудителя. Известно, что отличительной чертой ПЦР, является высокая специфичность, что позволяет верифицировать результаты РА. Так, по результатам всех исследований, 23 изолята, полученные из крови и лимфатических узлов показали отрицательную РА, что совпало с отрицательными результатами ПЦР. Таким образом, отрицательный результат в РА может однозначно свидетельствовать о том, что культура не относится к микобактериям туберкулеза.

Следует заметить, что 68% культур, реагировавших в РА, в ПЦР показали наличие специфических участков ДНК МРВ 70, что подтверждает высокую диагностическую ценность РА. Вместе с тем 32% РА-позитивных культур не реагировали в ПЦР с праймерами МРВ 70, хотя в большинстве из них в мазках были обнаружены рубиново-красные формы. Возможно, это связано с отсутствием, особенно у штаммов *M.tuberculosis*, соответствующих генов [13]. Считается, что у трансформированных МТБ часто отсутствуют участки IS 6110, поэтому лучшие результаты при идентификации в ПЦР измененных культур дают праймеры МРВ 64 [12].

Выводы. 1. Полученные результаты показывают, что у коров благополучных стад может отмечаться скрытая туберкулезная инфекция, которую можно выявить прижизненно, только с применением питательных сред ВКГ и ВЛАКОН.

2. Отрицательный результат в РА может однозначно свидетельствовать о том, что изолят не относится к микобактериям туберкулеза.

3. Установлено, что 23 изолята из крови и лимфатических узлов показали отрицательную реакцию агглютинации (РА), что совпало с отрицательными результатами полимеразной цепной реакции (ПЦР)

Литература

1. WHO Report-Geneva, 2002.-175 p.
2. Лысенко А.П., Лемиш А.П., Архипов И.Н., Притыченко А.Н. Изучение причин туберкулиновых реакций у крупного рогатого скота с применением иммуноферментного анализа и бактериологического исследования крови на питательной среде ВКГ Ветеринарная медицина Беларуси.- 2007 (2009).- №3-4.- с.6-11
3. Румачик И.И. Разные подходы при аллергической диагностике туберкулеза крупного рогатого скота и их эффективность / И.И. Румачик, Н.А. Кузнецов // Весці ААН Беларусі, -Минск, 2000. - № 4. – С. 22-25.
4. Юсковец М.К. Туберкулез сельскохозяйственных животных и птиц / М.К. Юсковец // Мн.: - Ураджай. - 1963. - 448 с.
5. Wayne L.G. Таксономические и генетические аспекты мирового распространения атипичных микобактерий / L.G. Wayne // Тр. 21-й Междунар. конф. по туберкулезу. – М., 1971. – С. 145-147.
6. Pearson C.W., Corner L.A. and A.W.D. Lepper 1977 Tuberculin sensitivity of cattle inoculated with atypical mycobacteria isolated from cattle, feral pigs and trough water. Austral. Vet. J. 53, 507-511.
7. Лысенко, А.П. Антигены *Mycobacterium bovis* и атипичных микобактерий, изучение и применение для дифференциальной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота: автореф...дисс. д-ра вет. наук: 16.00.03/А.П.Лысенко; БНИИ экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелеского. – М.,1994.- 34 с.
8. Лысенко А.П. Диагностическая ценность питательной среды ВКГ для прижизненного выявления туберкулезной инфекции у крупного рогатого скота / А.П. Лысенко, А.П. Лемиш, И.Н.Архипов, [и др.]// Ветеринарна медицина.- Мижвид.темат. наук.зб. 85.- 2005.- С.695-699.
9. Румачик И.И., Король Н.М., Бабаш В.Д. Динамика выделения микобактерий от скота и птицы в Республике Беларусь за 1976-1993 гг. //Весці ААН Беларусі, 1995.- №2.- с. 77-99.
10. Земскова З.С. Скрыто протекающая туберкулезная инфекция / З.С.Земскова [и др.]– М.: Медицина, 1984. –284 С.
11. Власенко В.В. Туберкулез в фокусе проблем современности/ В.В. Власенко. – Винница: Наука, 1998.- 350с.
12. Мельникова, Н.Н. Бактериологическая диагностика туберкулеза внелегочных локализаций с исследованием L-трансформированных вариантов микобактерий: автореф. дис. ... канд. мед. наук / Н.Н.Мельникова -Санкт – Петербург, 2007.- 21 с.
13. Harboe M. MPB 70, a unique antigen of *M.bovis* BCG / M. Harboe, S. Nagai // Am.Rev.Resp.Dis.- 1984. – 129. –Р. 444-452.

Summary

It was estimated better results of VLACON environ using: decreasing the time of analysis, increasing effectiveness comparatively with Lovenshtein-lensen environ, decreasing the period of extralungs forms of tuberculosis verification, increasing sensitivity and decreasing period of bacteriology diagnostics in oligo - and abacillus tuberculosis patients.