



УДК 619.616.98:579.873.21 Т-07

С.В. ИОНИНА, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,
Н.А. ДОНЧЕНКО, доктор ветеринарных наук, директор,
В.Н. ДОНЧЕНКО, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник

Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока

630501, Новосибирская область, пос. Краснообск

e-mail: labtub@mail.ru

ВЗАИМОСВЯЗЬ ЦИРКУЛЯЦИИ МИКОБАКТЕРИЙ ВО ВНЕШНЕЙ СРЕДЕ С ТУБЕРКУЛИНОВЫМИ РЕАКЦИЯМИ У ЖИВОТНЫХ

Проведен комплекс лабораторных исследований, включающий бактериологическую и молекулярно-генетическую идентификацию атипичных микобактерий туберкулеза, выделенных из различных объектов внешней среды и организма грызунов, а также из биологического материала крупного рогатого скота в благополучных по туберкулезу хозяйствах Новосибирской области. Проведены биологические исследования, заключающиеся в заражении беспородных белых мышей суспензией выделенных микобактерий и биологическим материалом с целью их идентификации и определения вирулентности и патогенности. Определено процентное содержание реагирующих на введение туберкулина сельскохозяйственных животных к общему количеству исследованного крупного рогатого скота в трех хозяйствах Новосибирской области. При изучении биологического материала от 404 сельскохозяйственных животных из трех хозяйств, благополучных по туберкулезу, реагирующих на введение ППД туберкулина, изменений, характерных для туберкулеза, не выявлено. Исследование объектов внешней среды (почва, навоз, вода, сено, силос) и органов грызунов показало наличие в них атипичных микобактерий туберкулеза I–IV групп по Раньону, а также *M. avium*. Проведение молекулярно-генетических исследований подтвердило наличие в изученных образцах ДНК атипичных микобактерий и *M. avium*. Выделенные и идентифицированные из внешней среды атипичные микобактерии туберкулеза приводят к сенсibilизации организма крупного рогатого скота к ППД туберкулина для млекопитающих. Проявление неспецифических реакций у крупного рогатого скота на введение ППД туберкулина связано с циркуляцией атипичных микобактерий туберкулеза во внешней среде и персистенцией их в организме грызунов.

Ключевые слова: атипичные микобактерии туберкулеза, крупный рогатый скот, ППД туберкулин для млекопитающих, туберкулез, генетическая структура, туберкулинизация.

Поголовье крупного рогатого скота в Сибири за последние годы практически оздоровлено от туберкулеза. Однако при контроле эпизоотической ситуации по данному заболеванию в благополучных хозяйствах отмечаются случаи реагирования животных на внутрикожную ППД туберкулиновую пробу. При послеубойном осмотре туш изменений, характерных для туберкулеза, не отмечается, а лабораторными методами он у них был исключен. Это свидетельствует о том, что указанные животные сенсibilизированы непатогенными (атипичными) микобактериями, которые, попадая в организм животных, вызывают у них различные иммунологические реакции. В результате в организме животных происходит перестройка

иммунологической памяти, возникают неспецифические реакции, вследствие чего они реагируют на внутрикожную туберкулиновую пробу [1, 2].

В Сибири неспецифические туберкулиновые реакции у крупного рогатого скота обусловлены в основном персистенцией в организме животных микобактерий *M. fortuitum*, *M. smegmatis* и *M. scrofulaceum*, которые могут длительное время сохраняться в объектах внешней среды [3]. Указанный феномен иммунологической перестройки организма животных создает большие трудности в дифференциации внутрикожных туберкулиновых реакций при профилактических исследованиях крупного рогатого скота ППД туберкулином для млекопитающих [4]. В регионе в последние годы отмечены зоны миграции нетуберкулезных микобактерий, экологическими нишами которых являются объекты внешней среды и природные резервуары (грызуны и птицы, чаще всего голуби) [5].

Для идентификации атипичных микобактерий используют различные методы бактериологической диагностики, основные из которых – культуральные и биохимические тесты. Помимо бактериологической диагностики в последнее время стали использовать молекулярно-генетические методы, в частности метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Генотипирование микобактерий – важное звено в проведении высокодостоверных клинико-эпизоотологических исследований для выявления источника сенсibilизации животных атипичными микобактериями [6, 7].

Цель исследования – установить причину реагирования сельскохозяйственных животных на введение ППД туберкулина при отсутствии туберкулезных изменений.

В задачи исследования входило выделить и идентифицировать микобактерии из объектов внешней среды и органов грызунов в благополучных по туберкулезу хозяйствах Новосибирской области; установить взаимосвязь между реакцией у крупного рогатого скота на введение ППД туберкулина с циркуляцией атипичных микобактерий туберкулеза во внешней среде и персистенцией их в организме грызунов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для проведения научных исследований использован культуральный метод, включающий предпосевную обработку биоматериала (внутренние органы от сельскохозяйственных животных и грызунов) методом седиментации, объектов внешней среды (почва, вода, навоз, сено и силос) – методом А.П. Аликаевой с последующим посевом полученных после обработки осадков на плотные питательные среды Финн-2 [8] и Левенштейна – Йенсена [9]. Биологический метод заключается в использовании беспородных белых мышей, которых заражали суспензией, полученной в результате обработки биоматериала от реагирующих на туберкулин животных. Заражение мышей проводили в условиях вивария. На каждую пробу брали 5 белых мышей массой 25–30 г и вводили в подхвостовую вену суспензию 0,1 мл. Эвтаназию лабораторных животных осуществляли через 14 дней, так как ранее проведенные в лаборатории исследования свидетельствовали о том, что в этот промежуток времени в организме мышей происходит максимальное накопление атипичных микобактерий [10]. При вскрытии у

подопытных животных отмечали гиперемию легких, увеличение селезенки и печени.

При посеве на плотные питательные среды как биоматериала от крупного рогатого скота, так и от белых мышей наблюдения за ростом атипичных микобактерий 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.

Метод ПЦР со специфическими праймерами на район *mgA*-гена *M. avium*, последовательности 16S-23S рРНК на вид *Mycobacterium* и системы *senX3-regX3* для дифференциации типичных микобактерий, выделенных из объектов внешней среды и секвенирование фрагментов интересующих генов, филогенетический анализ осуществляли с использованием программ MEGA 2.1. и GeneDoc 2.6. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием бутстреп-теста. При постановке ПЦР руководствовались общими требованиями к проведению реакции и олигонуклеотидным праймерам [11, 12]. 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.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимосвязь циркуляции атипичных микобактерий во внешней среде с выявлением внутрикожной реакции на ППД туберкулин для млекопитающих у крупного рогатого скота изучена при проведении научных исследований в трех районах Новосибирской области, в каждом из которых было взято по одному хозяйству.

В хозяйстве первого района внутрикожной туберкулиновой пробой исследованы 2132 гол. крупного рогатого скота, на ППД туберкулин для млекопитающих реагировали 146 животных (6,84 %). На вскрытии во внутренних органах и лимфатических узлах туберкулезных изменений у них не обнаружено. Из биоматериала 146 прореагировавших на введение туберкулина животных лабораторными методами исследований от 98 гол. выделены и идентифицированы атипичные микобактерии I, II и IV групп по Раньону и *M. avium*. В этом же хозяйстве взято 19 проб из объектов внешней среды (почва, навоз, вода, сено, силос) и биоматериал у отловленных грызунов (мыши). Лабораторными исследованиями материала из семи проб почвы в двух изолированы атипичные микобактерии IV группы по Раньону и *M. avium*. Из сена и силоса (по три пробы) выделены микобактерии IV группы по Раньону, из навоза крупного рогатого скота (три пробы) – атипичные микобактерии туберкулеза IV группы по Раньону, из воды (три пробы) – *M. avium*. Из биоматериала внутренних органов и лимфатических узлов грызунов через 2 мес после посева на питательные среды произошел рост культур, идентифицированных как атипичные 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 семи случаях выявлена ДНК *M. fortuitum*, в трех – *M. smegmatis*.

В хозяйстве второго района исследовано внутрикожной туберкулиновой пробой 1100 животных, 148 из них (13,45 %) реагировали на ППД туберкулин для млекопитающих. При послеубойном секционном исследовании животных туберкулезных изменений не обнаружено. Из биоматериала 148 животных при лабораторном исследовании от 82 гол. изолированы и идентифицированы атипичные микобактерии IV группы по Раньону. В этом хозяйстве при обработке проб из объектов внешней среды получены следующие результаты: из 11 проб силоса в 9 выделили атипичные микобактерии туберкулеза IV группы по Раньону. Из трех проб почвы изолированы и идентифицированы атипичные микобактерии III и IV группы по Раньону и *M. avium*. Из биоматериала внутренних органов и лимфатических узлов грызунов лабораторными методами из 16 проб изолированы и идентифицированы атипичные 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* (1 – почва), *M. fortuitum* (4 – силос) и *M. smegmatis* (6 – силос и почва). Из 20 анализированных проб биоматериала грызунов в двух выявлено сочетанное инфицирование двумя видами атипичных микобактерий: в первом случае – *M. avium* и *M. microti*, во втором – *M. avium* и *M. fortuitum*.

В хозяйстве из третьего района исследовали внутрикожной туберкулиновой пробой 2988 животных, из них реагировало на ППД туберкулин для млекопитающих 110 (3,68 %). При секционном исследовании туберкулезных изменений во внутренних органах и лимфатических узлах у них не обнаружено. Из биоматериала 110 гол. крупного рогатого скота лабораторными методами исследования от 58 животных были изолированы и идентифицированы атипичные микобактерии туберкулеза IV группы по Раньону и *M. avium*. При обработке проб, взятых из объектов внешней среды этого хозяйства, получены следующие результаты: из трех проб сена в одном случае изолированы и идентифицированы атипичные микобактерии II группы по Раньону, из девяти проб силоса в пяти – атипичные микобактерии III и IV групп по Раньону и *M. avium*, из восьми проб почвы в шести – атипичные микобактерии III и IV групп по Раньону и *M. avium*. Из биоматериала грызунов в пяти пробах лабораторными методами исследования изолированы и идентифицированы атипичные микобактерии II и III групп по Раньону. В этом же хозяйстве при обработке методом ПЦР в одной пробе сена выделена ДНК атипичной неидентифицированной микобактерии. При обработке пяти проб силоса в трех случаях идентифицированы *M. smegmatis*, в двух – *M. intracellulareae*. Из восьми проб почвы в четырех отмечено наличие ДНК *M. fortuitum*, в двух – ДНК *M. avium*.

Проведенные исследования показали, что при посеве первичного биоматериала (объекты внешней среды) и биоматериала, полученного в результате биологического исследования, изолированные микобактерии на

питательных средах имели S-форму, бежевую окраску, колонии распределялись отдельно или в виде слившихся между собой по поверхности среды, что характерно для колоний атипичных микобактерий туберкулеза. При прямой микроскопии мазков выделенных культур микобактерий, окрашенных по Цилю – Нильсену, обнаружены короткие и утолщенные кислотоустойчивые красные зернистые палочки, которые идентифицированы как микобактерии. Атипичные микобактерии, сенсibiliзирующие организм крупного рогатого скота, могут персистировать в организме грызунов и находиться в различных объектах внешней среды. На вскрытии у таких животных не обнаруживают туберкулезных изменений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенного комплекса лабораторных исследований выделены и идентифицированы атипичные микобактерии туберкулеза из объектов внешней среды в благополучных по туберкулезу крупного рогатого скота хозяйствах Новосибирской области. Проникновение в организм крупного рогатого скота атипичных микобактерий ведет у животных к иммунному ответу, который клинически может не проявляться, но при этом образуются специфические антитела, служащие причиной реагирования их на ППД туберкулин для млекопитающих. Выявление ДНК атипичных микобактерий из объектов внешней среды также свидетельствует о сенсibiliзации организма крупного рогатого скота к ППД туберкулина для млекопитающих и подтверждает факт постоянного риска инфицирования животных атипичными микобактериями туберкулеза. Следовательно, проявление неспецифических реакций у крупного рогатого скота на введение ППД туберкулина связано с циркуляцией атипичных микобактерий туберкулеза во внешней среде и персистированием их в организме грызунов.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Донченко А.С., Овдиенко Н.П., Донченко Н.А. Диагностика туберкулеза крупного рогатого скота. – Новосибирск, 2002. – С. 194–216.
2. Урбан В.П., Данко Ю.Ю., Пескова В.А. Причины аллергических реакций на внутрикожное введение туберкулина у крупного рогатого скота в благополучных по туберкулезу хозяйствах: сб. тр. ЛВИ. – Л., 1988. – Вып. 16. – С. 92–94.
3. Донченко А.С. и др. Характеристика микобактерий, изолированных из материала животных и объектов внешней среды // Вопросы эпизоотологии, диагностики и мероприятия по ликвидации туберкулеза и бруцеллеза животных. – Новосибирск, 1987. – С. 28–32.
4. Донченко А.С. и др. Дифференциальная диагностика туберкулиновых реакций в благополучных по туберкулезу хозяйствах: метод. реком. – 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. Диагностика туберкулеза животных / А.С. Донченко, В.Н. Кисленко, Н.А. Донченко, Н.Л. Тупота, Н.М. Колычев, Л.М. Каримова. – Новосибирск, 2011. – 247 с.
8. А.с. № 325879 (СССР) МКИЗ С12к 1/06. Среда для культивирования микобактерий туберкулеза / Э.Р. Финн; № 1434125/31-16; заявл. 11.05.1970; опубл. 8.02.1973; Бюл. № 10.
9. Меджилов М.М. Справочник по микробиологическим питательным средам. – М.: Медицина, 2003. – 208 с.

10. Гребенникова Т.В., Кальнов С. Л., Забережный А.Д. Молекулярные методы исследования в диагностике туберкулеза // Вет. патология. – 2004. – № 1. – С. 92–93.
11. Kumar S., Tamura K., Jakobsen I.B. et al. MEGA 2: molecular evolution genetics analysis software // Bioinformatics. – 2001. – Vol. 17. – P. 1244–1245.
12. Saitou N., Nei M. The Neighbor – joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees // Mol.Biol.Evol. – 1987. – Vol. 4. – P. 406–425.

Поступила в редакцию 15.03.2016

**S.V. IONINA, Candidate of Science in Biology, Senior Researcher,
N.A. DONCHENKO, Doctor of Science in Veterinary Medicine, Director,
V.N. DONCHENKO, Candidate of Science in Biology, Lead Researcher**

*Institute of Experimental Veterinary Science of Siberia and the Far East
Krasnoobsk, Novosibirsk District, Novosibirsk Region, 630501 Russia
e-mail: labtub@mail.ru*

RELATIONSHIP BETWEEN CIRCULATIONS OF MYCOBACTERIA IN THE ENVIRONMENT AND TUBERCULIN RESPONSES IN ANIMALS

There was carried out a complex of laboratory examinations including bacteriological and molecular-genetic identification of atypical mycobacteria of tuberculosis isolated from different objects of the environment and the organism of rodents as well as from biological material derived from cattle at the tuberculosis-free farms of Novosibirsk Region. The biological examinations have been conducted, which consist in infecting outbred white mice with suspension containing isolated mycobacteria and with biological material to order to identify them and determine virulence and pathogenicity. The percentage of agricultural animals reacting to the tuberculin injection was found in relation to the total number of cattle examined at three farms of Novosibirsk Region. When studying biological material derived from 404 agricultural animals, reacting to the tuberculin injection, from three tuberculosis-free farms of Novosibirsk Region, no changes, characteristic of tuberculosis, were detected. The examination of the environmental objects (soil, manure, water, hay, silage) and organs of rodents showed the presence of atypical mycobacteria I–IV groups Rangone, and *M. avium*. The molecular-genetic studies conducted confirmed the presence of DNA of atypical mycobacteria and *M. avium* in the samples. Atypical mycobacteria of tuberculosis, isolated from the environment and identified, result in sensitizing the organism of cattle to tuberculin PPD for mammals. Manifestations of non-specific reactions in cattle to the tuberculin PPD injection is bound up with circulations of atypical mycobacteria of tuberculosis in the environment, and their persistence in the organism of rodents.

Keywords: atypical mycobacteria, tuberculosis, cattle, tuberculin PPD for mammals, genetic structure, tuberculinization.