УДК 619:616.98:579.873.21:616-07

БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ МИКОБАКТЕРИАЛЬНОЙ ИНФЕКЦИИ У ЖИВОТНЫХ ПОСЛЕ ВВЕДЕНИЯ ТУБЕРКУЛИНА

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

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

Новик Т.П.

УО Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск, Республика Беларусь

Притыченко А.Н.

УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины», Республика Беларусь

Власенко И.Г.

Винницкий аграрный университет, Украина

После внутрикожного введения туберкулина в диагностической дозе из крови 20-40% животных с помощью питательной среды ВКГ удается выделить измененные некислотоустойчивые формы возбудителя туберкулеза, которые имеют такой же полипептидный профиль и антигены, как изолят из туберкулина.

Туберкулин получают из термически инактивированной жидкой питательной среды после роста на ней патогенных штаммов микобактерий туберкулеза (МБТ). Учитывая то, что его вводят человеку и животным, препарат, безусловно, не должен содержать патогенных клеток, не быть токсичным и реактогенным [8]. Опыт применения туберкулина подтверждает его относительную безопасность. Вместе с тем, получены данные о том, что высокая температура, убивая патогенные формы возбудителя, не предотвращает образование термически устойчивых структур [1, 4]. В туберкулинах обнаружены светопреломляющие некислотоустойчивые зерна, которые, как считается, содержат жизнеспособные элементы МБТ [5]. Высказывалось предположение о том, что МБТ в неблагоприятных условиях, в том числе и в организме, образуют подобные структуры, способствующие их выживанию [6, 7]. Такие адаптивные формы не дают роста при обычных методах контроля стерильности, но при использовании стимуляторов роста и специальных сред восстанавливают жизнеспособность [1,4]. Полученные изоляты некислотоустойчивы, слабопатогенны, но персистируют в организме морских свинок и индуцируют гиперчувствительность к туберкулину [4].

Для выделения термостабильных форм МБТ использовались стимулятор роста и питательная среда ВКГ [1]. Считается, что эффект восстановления жизнеспособности достигается активацией стимулятором роста ВКГ Са-зависимых ферментов и K-Na-насосов МБТ [1]. Однако, неизвестно, способны ли такие формы МБТ, восстанавливать жизнеспособность в организме.

Целью работы явилось изучение возможности восстановления жизнеспособности в организме животных термостабильных форм МБТ после внутрикожного введении туберкулина в диагностической дозе.

Материалы и методы. В работе использовали стандартный раствор ППД туберкулина для млекопитающих Курской биофабрики серии 11 в дозах 10000МЕ\0,2 мл (для крупного рогатого скота) и 1000 МЕ\0,2 мл (для морских свинок).

Исследования проведены:

– на 2-х месячном теленке и 6 морских свинках, которым внутрикожно трехкратно вводили туберкулин повторные инъекции через 7 и 20 суток);

– на 5 телятах 2-7 дневного возраста;

–10 коровах благополучного по туберкулезу стада.

До введения туберкулина и и через 72 ч после инъекции аллергена у животных стерильно брали пробы крови, которые смешивали со стимулятором роста ВКГ

(1:1), инкубировали 24 ч. (37^{0}С) и сеяли по 400-600 мкл на среду ВКГ (*HANSA*, Ukraine). Контролем служили посевы на среду ВКГ стимулятора роста ВКГ без проб крови и посев смеси ППД туберкулина для млекопитающих со стимулятором роста ВКГ. Чашки с посевами инкубировали до 7 суток при 37^{0}С.

При появлении на среде ВКГ колоний, готовили мазки (окраска по Циль-Нильсену) с последующей микроскопией и цифровой фиксацией результатов на микроскопе Olympus BX-51.

Бактериальную массу исследовали в реакции агглютинации (РА) на предметных стеклах с антисывороткой к M.bovis Vallee, адсорбированной Staph.aureus, Str. sp., E.coli и антигенами нетуберкулезных микобактерий (НТМБ) [4], в электрофорезе в готовых блоках 12,5% ПААГ-ДСН и в иммуноблоттинге с кроличьей антисывороткой к M.bovis Vallee (1:50) [4].

Результаты исследований. Установлено, что стандартный раствор туберкулина для млекопитающих после 24 ч инкубации со стимулятором роста ВКГ (1:1, 37^{0}С) и посеве на среду ВКГ через 48 ч. дал рост «парафиновых» колоний некислотоустойчивых кокков и палочек (рис.1).

Пробы крови морских свинок, взятые до введения туберкулина, не давали роста на среде ВКГ. После первой внутрикожной инъекции туберкулина и посеве крови через 24 ч. после нее, рост мелких светлых «парафиновых» колоний получен у 2 (33,3%) из 6 морских свинок. После II и III инъекции рост в посевах крови получен у 3 -х (50%) и 4-х (66,7%) морских свинок. Культуры росли на среде ВКГ через 1-3 сутки. В мазках обнаруживали крупные синие кокки и биполярные палочки, иногда встречались формы красного цвета (рис.1). Выделенные культуры агглютинировались антисывороткой к M.bovis Vallee и, следовательно, имели общие поверхностные антигены с классической формой МБТ.

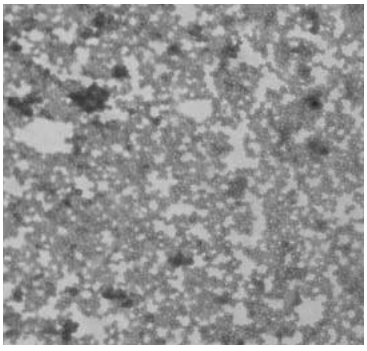


Рис.1 – Изолят из ППД туберкулина, полученный на питательной среде ВКГ (3 сутки инкубации, окраска по Циль-Нильсену (100х10)

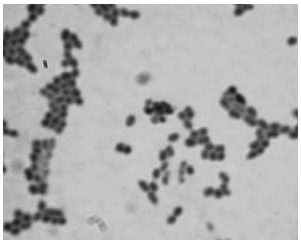


Рис. 2. Культура, выделенная из крови морской свинки, после введения туберкулина (1000МЕ). Окраска по Циль-Нильсену (100х10)

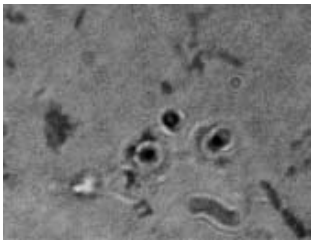


Рис. 3. Культура, выделенная из крови теленка после введения 10000МЕ туберкулина. Окраска по Циль-Нильсену (100х10)

После внутрикожной инъекции туберкулина (10000МЕ) теленку, посев крови, взятой через 72 ч., дал на среде ВКГ рост белых «парафиновых» колоний. В мазках обнаружены синие палочки, неокрашенные светопреломляющие и розоватые кокки (рис. 2).

При последующих инъекциях туберкулина из крови теленка также выделяли культуры с подобной морфологией, реагировавшие в РА с антисывороткой к M. bovis Vallee.

При посеве крови 5 новорожденных телят после туберкулинизации в 1 случае (20%) был получен рост колоний, характерных для адаптивных форм МБТ.

В таблице 1 приведены результаты посева крови 10 коров после введения туберкулина. Во всех случаях результат туберкулинизации был отрицательный, но у 40% животных после введения туберкулина в крови появлялись адаптивные формы МБТ, которые агглютинировались в РА моноспецифической антисывороткой M. bovis Vallee с оценкой +3-+4.

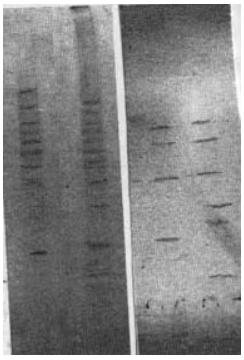
Таблица 1 – Результаты посева крови коров до и после туберкулинизации на питательную среду ВКГ

Инвентарный №.	**Реакция на ППД туберкулин**	**Результаты посева крови после туберкулинизации**	
		Рост на среде ВКГ	**РА изолята с а.с M.bovis**
6293	Отриц.	+	+++
6274	Отриц.	-	-
6201	Отриц.	-	-
6680	Отриц.	-	-
7957	Отриц.	+	++++
6574	Отриц.	-	-
6153	Отриц.	+	+++
6189	Отриц.	+	+++
6114	Отриц.	-	-
6248	Отриц.	-	-
Итого	10	**4 (40%)**	**4 (40%)**

В электрофорезе ПААГ-ДСН (12,5%) сравнили полипептидный профиль культуры, выделенной из туберкулина для млекопитающих и из крови теленка. Полипептидный профиль культуры из туберкулина был представлен 11 фракциями (с м.м. 80, 67, 65, 51, 45, 38, 36, 32, 24, 17, 14 kDa). Полипептидный профиль изолята из крови теленка после туберкулинизации, состоял из 10 фракций (с м.м. 85, 67, 65, 51, 45, 38, 36, 32, 24, 17kDa), которые по расположению и молекулярной массе были, практически, такие же, как у изолята из туберкулина (рис.3).

В иммуноблоттинге с антисывороткой к M. bovis Vallee (рис.3) реагировали антигены культуры из туберкулина для млекопитающих с м.м. 51, 45, 38, 36, 24, 20 и 14 kDa, а антигены изолята из крови с м.м. 51, 45, 38 и 17 kDa. Фракции контрольной культуры E.coli с антисывороткой M. bovis Vallee окрашенных полос не давали. Таким образом, результаты электрофореза и иммуноблоттинга подтвердили родство изолята из туберкулина и крови теленка после его введения в диагностической дозе.

Обсуждение результатов. Посев на среду ВКГ стандартного раствора ППД туберкулина подтвердил наличие в нем жизнеспособных структур [4]. Оказалось, что и в организме животных после однократного введения туберкулина находящиеся в нем термостабильные формы восстанавливали жизнеспособность. Обнаружить это явление удалось у части подопытных животных. У новорожденных телят изолят из крови получен лишь в одном случае (20%). Необходимо отметить, что в иммуноферментном анализе (ИФА) с соникатом M. bovis у 4 из 5 подопытных телят были обнаружены высокие уровни антимикобактериальных антител (ΔОП в сравнении с эмбриональной сывороткой 3,8-9,1), вероятно, колострального происхождения, а изолят из крови был получен у теленка с самым низким показателем (ΔОП 1,2).



1 2 1 2

Рис. 4 – Электрофорез ПААГ-ДСН (12,5%) и иммуноблоттинг (с антисывороткой M. bovis 1:50) ВКГ – изолята из крови телки после инъекции туберкулина (1) и изолята из туберкулина (2)

У коров персистенция в крови жизнеспособных форм МБТ после введения туберкулина отмечена в 40% случаев. У морских свинок после 3-кратного введения препарата этот показатель повышался до 66,7%.

Все изоляты, полученные из крови животных после введения туберкулина агглютинировались в РА антисывороткой к бактериальной форме M. bovis, истощенной антигенами НТМБ и банальной флоры, что подтверждало

наличие у них поверхностных антигенов, характерных для бактериальной формы возбудителя [4]. Более того, изолят из крови подопытного теленка имел, практически, идентичный полипептидный профиль и антигенные свойства, как у изолята из туберкулина.

Значение факта персистенции адаптивных форм МБТ после туберкулинизации пока трудно оценить, но, безусловно, его надо учитывать при диагностике туберкулеза у реагировавшего на туберкулин крупного рогатого скота с использованием питательной среды ВКГ. Отмечено, что через 20-30 суток после введения туберкулина адаптивные формы МБТ из крови не выделяются. Поэтому, взятие крови для дифференциальной диагностики необходимо проводить не ранее, чем через 20 суток после туберкулинизации. С другой стороны, полученные данные, в известной степени могут объяснять иммунизирующие свойства туберкулина [2], которые трудно трактовать с позиций современной иммунологии.

Выводы. 1. После внутрикожного введения туберкулина в диагностической дозе из крови 20-40% животных удается выделить измененные некислотоустойчивые формы возбудителя туберкулеза.

2. Измененные некислотоустойчивые формы возбудителя туберкулеза, выделенные из крови животных, имеют такой же полипептидный профиль, как изолят из туберкулина, а также антигены, характерные для классического возбудителя туберкулеза.

Список лытературы

1. Власенко, В.В. Туберкулез в фокусе проблем современности // Винница: Наука, 1998. - 350 с. ***2.*** Евглевский, А.А. Совершенствование аллергической диагностики и специфической профилактики туберкулеза крупного рогатого скота: Автореф. дис. канд. вет. наук. – Воронеж. – 1992. – 26 с. ***3.*** Лысенко, А.П. Антигены Mycobacterium bovis и атипичных микобактерий, изучение и применение для дифференциальной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота: Автореф. дис. докт. вет. наук. Минск. – 1994. – 35 с. ***4.*** Лысенко, А.П., Лемиш, А.П.,,. Красникова, Е.Л., с соавт. Изучение термической устойчивости микобактерий туберкулеза // Проблемы туберкулеза и болезней легких. – 2007. – №2. – с. 42-46. ***5.*** Лысенко, А.П., Лемиш, А.П., с соавт. Выявление адаптивных форм микобактерий в туберкулинах // Современные проблемы инфекционной патологии человека. Сборник научных трудов. – Выпуск 1. – Минск. – «Белпринт». – 2008. – с.227-230. ***6.*** Николаева Г.М., Дорожкова И.Р. Морфология измененных форм микобактерий туберкулеза // Проблемы туберкулеза. – 1988. – №4. – с. 57-59. ***7.*** Maggini, Praloran, Gammarotta // Ann.dell Instituto Carlo Forlanini. – v. XXY. – 1965. – P. 321-345. ***8.*** Mannual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Annimals, 5th edition, 2004.

BACTERIOLOGICAL MARKERS OF MYCOBACTERIAL INFECTION IN ANIMALS AFTER INTRODUCTION OF TUBERCULIN

Lysenko A.P., Lemish A.P., Arhipov I.N.
Institute of Experimental Veterinary Medicine named after S.N. Vyshelessky, Minsk, Belarus
Novik T.P.
Byelorussian State Medical University, Minsk, Belarus
Pritychenko A.N.
Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Belarus
Vlasenko I.G.
Vinnitsa Agrarian University, Ukraine

After intracutaneus introduction of tuberculin in a diagnostic dose from blood of 20-40% of animals by means of nutrient medium VKG it is possible to allocate changed adaptive forms of M.bovis which have the same polypeptide profile and antigens as isolate from tuberculin.

УДК 619:616.98:578.826.2:636.4

ВИРУСНЫЙ ГЕПАТИТ Е У СВИНЕЙ

Максимович В.В., Семенов В.М., Багрецов В.Ф., Конотоп Д.С., Семенов С.В.
Витебская государственная академия ветеринарной медицины, г. Витебск
Витебский государственный медицинский университет, г. Витебск

В Республике Беларусь до настоящего времени исследований по идентификации данной инфекции у свиней не проводилось. Впервые проведенными серологическими исследованиями сывороток крови от свиней в РБ, выявлены серопозитивные к вирусу гепатита Е животные. Наличие антител к вирусу у супоросных и подсосных свиноматок, свидетельствует о циркуляции данного возбудителя среди данных групп свиней. Учитывая имеющиеся сведения о возможности заражения человека гепатитом Е от свиней, необходимо проведение широких исследований по установлению возможности циркуляции вируса гепатита Е как среди людей, так и домашних свиней.

Гепатит Е – инфекционная вирусная болезнь, характеризующаяся у человека признаками острого гепатита. Возбудитель болезни – одноцепочныйный, РНК-геномный вирус семейства Hepeviridae, род Hepevirus [4]. Гепатит Е неравномерно распределен в различных регионах мира. Эпидемии гепатита Е среди людей регистрируются главным образом в странах с жарким климатом (Индия, Бирма, страны Латинской Америки и Средней Азии).

В 1997 году в США, Штат Иллинойс, у свиней был обнаружен вирус гепатита Е (SwEV), который в антигенном отношении очень близок к вирусу гепатита Е человека. В дальнейшем он был выделен в Новой Зеландии, Испании, Нидерландах, Японии, Германии, Канаде, Тайване и др. Вирус гепатита Е имеет 4 генотипа, выделенных в различных географических регионах мира, у животных и людей [2, 6].

Во многих странах Европы (Англия, Италия, Дания, Нидерланды, Греция и др.), выделяемый вирус гепатита был идентифицирован как генотип 3. На сегоднешний день генотип 3 (подтипы e, f и др.) единственный, выделенный и идентифицированный у свиней в Европе, по генетической структуре схожий с другими вирусами, выделенными у свиней и людей. Генотипы 3 и 4, выделенные от животных, также могут вызывать заболевание у людей. Изоляты вируса, выделенные от свиней и человека в различных странах часто генетически схожи, что подтверждает возможность роли свиньи как резервуара инфекции, и ее возможную роль в передаче болезни человеку [1,6].

С целью выяснения степени распространения гепатита Е среди свиней в Европе, проводились скриннинговые исследования сывороток крови. A Siochu, C Alexopou-