

study conducted simultaneous test after 30 and 45 days after inoculation plants using tuberculin for mammals and allergen of atypical mycobacteria.

The results. Manifestation of allergic reactions to the introduction of different mycobacterial allergens in laboratory animals differed depending on the type of allergen sensitization period after the animals, and depending on the source selection culture. Thus, it should be noted that in all cases allergic reactions were significantly more pronounced in the animals injected mycobacterial cultures isolated from biological material, selected from cattle. Also in all experimental animals reaction to the introduction of masses by means dominated by reactions to PPD-tuberculin for mammals is a natural result.

Conclusion. The results of the research significant difference between research on atypical mycobacteria cultures sensitizing properties not found in this case determined that the culture of isolated biological material from cattle have significantly more pronounced sensitizing properties compared with cultures isolated from environmental objects.

**Keywords:** atypical mycobacteria, cattle, sensitization, nonspecific reactions

УДК: 619:616-07:[57.083.32+577.2.08]:579.873.21:636.2

## **РОЛЬ ПЕРСИСТЕНТНЫХ L-ФОРМ *M. AVIUM* SUBSPECIES *PARATUBERCULOSIS* (MAP) В ВОЗНИКНОВЕНИИ НЕСПЕЦИФИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ НА ТУБЕРКУЛИН**

**Завгородний А. И., Позмогова С. А., Сапко С. А., Калашник Н. В.**

Национальный научный центр «Институт экспериментальной и клинической ветеринарной медицины», г. Харьков, Украина, e-mail: svetlanapozmogova@gmail.com

В статье представлены результаты бактериологических и молекулярно-генетических исследований биологического материала от КРС с невыясненной причиной аллергических реакций на туберкулин (n=20), фекальных масс от зоопарковых животных (n=9) и одной пробы водопроводной воды. Культуральным методом изолировано и идентифицировано в ПЦР 6 культур (4 – *M. avium* spp. *hominisuis*, 1 – *M. avium* ssp. *avium*, 1 – *M. avium* subsp. *paratuberculosis*). Остальные 24 пробы не росли при стандартной процедуре культивирования, однако росли на полужидкой среде для изоляции L-форм. Некультивируемые измененные формы с помощью ПЦР были идентифицированы как *M. avium* ssp. *paratuberculosis* (n=21), *M. avium* ssp. *hominisuis* (n=2) и одна проба не идентифицирована. Факт выявления персистирующих в организме сельскохозяйственных и зоопарковых животных измененных форм MAP, свидетельствует о том, что они могут обуславливать латентную форму паратуберкулеза и быть причиной сенсibilизации к туберкулину.

**Ключевые слова:** паратуберкулез, сенсibilизация, персистенция, измененные формы микобактерий.

Паратуберкулез (паратуберкулезный энтерит, болезнь Йоне) – это микобактериальное (*M. avium* subspecies *paratuberculosis* (MAP)) инфекционное заболевание, характеризующееся хроническим дегенеративным гранулематозным энтеритом, преимущественно дистальных отделов тонкого и толстого кишечника, а также поражением мезентериальных лимфатических узлов. Паратуберкулез широко распространен во многих странах среди различных видов сельскохозяйственных и диких животных. С конца 70-х годов прошлого столетия хозяйства Украины считаются благополучными по этой инфекции. Однако при плановых аллергических исследованиях КРС на туберкулез в благополучных хозяйствах с помощью внутрикожной туберкулиновой пробы часто выявляют парааллергические реакции, которые, как правило, обусловлены атипичными микобактериями. Вместе с тем, в отдельных случаях причина сенсibilизации организма животных к туберкулину остается не установленной.

Существует концепция, согласно которой в инфицированном организме наряду с классическими формами микобактерий персистируют CWD-формы (от англ. «cell wall deficient / defective» – бактерии с отсутствующей / дефектной клеточной стенкой), которые являются причиной скрытой, хронической и рецидивирующей / ремиссирующей инфекции животных (паратуберкулез, туберкулез) и человека (туберкулез, саркоидоз и болезнь Крона) [1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11]. Учитывая большую вероятность заноса возбудителя паратуберкулеза на территорию Украины с импортированным, субклинически инфицированным племенным скотом, а также отсутствие диагностических исследований животных на паратуберкулез, вполне вероятно, что причиной реакций на туберкулин могут быть как классические формы MAP, так и их длительная персистенция в измененной L- или CWD-форме. Возможности обнаружения CWD-форм MAP в биологическом материале с помощью микроскопии, культивирования, методами гибридизации ДНК и других методов весьма ограничены, что подтверждает относительно небольшое количество опубликованных данных [12]. Трудности детекции *M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) из патологического материала связаны с биологическими

особенностями возбудителя. Основные из них – чрезвычайно медленный рост и привередливость к искусственным питательным средам, способность *M. avium* к L-конверсии и длительная персистенция возбудителя в измененной форме [8]. Кроме того, низкий уровень обнаружения персистирующих микобактерий методами культивирования, по мнению ряда исследователей, связан с тем, что микобактерии адаптируются к низкому содержанию кислорода внутри гранулемы путем уменьшения метаболической активности, клеточного деления, повышения резистентности к вредным факторам и усиления экспрессии некоторых ферментов, что обуславливает их переход в неактивное (дремлющее) состояние, и как следствие, неспособности клеток к реверсии и росту при стандартных условиях культивирования [13, 14, 15]. Покоящиеся клетки сохраняют свою жизнеспособность, но теряют способность к репликации и росту *in vitro* и становятся «некультурабельными». Вместе с тем, ряд авторов рассматривают состояние покоя CWD-форм микобактерий как обратимое явление, т.е. микобактерии в силу естественных или искусственно индуцированных причин способны ревертировать в исходные бактериальные формы и реактивировать инфекционный процесс [10, 16, 17, 18]. Таким образом персистенция возбудителя в измененных формах создает постоянный очаг инфекции, не поддающийся бактериологическому контролю и создающий сложности при диагностике.

**Целью** наших исследований явилось определение причины возникновения неспецифических реакций на туберкулин у КРС.

**Материалы и методы.** Было исследовано 20 проб биологического материала (подчелюстные, заглочочные, средостенные, бронхиальные, мезентериальные лимфатические узлы) от реагирующего на туберкулин КРС, 9 проб фекальных масс от зоопарковых животных (слон, европейский олень, пекари ошейниковый, кенгуру (n=2), бизон, пони шотландский, голубой гну и цесарка) и одна проба водопроводной воды. Пробы № 31 — эпизоотическая культура *M. avium* изолированная из мезентериальных лимфатических узлов КРС, № 32 – референтный штамм *M. Johnei (M. avium)* служили контролем. Исследования проводили с помощью бактериологических (культурального и бактериоскопического) и молекулярно-генетических (ПЦР) методов исследования.

Пробы биоматериала (л/у) и водопроводной воды обрабатывали по методу Аликаевой, с использованием 6 % серной кислоты, пробы фекальных масс – с применением 0,9 % N-цетилпиридиния хлорида. Обработанный материал высевали на «Сухую питательную среду для культивирования микобактерий» и «Питательную среду для культивирования *M. avium* subsp. *paratuberculosis*» и культивировали при 37 °С. Через каждые 30 дней из соскобов с поверхности среды готовили мазки и окрашивали по методу Циль-Нильсена. Через каждые 3 месяца проводили несколько «слепых» пассажей смывов на среду для культивирования *M. avium* subsp. *paratuberculosis*.

Изоляцию L-форм *M. avium* проводили на специально разработанной нами полужидкой среде.

Изоляцию суммарной ДНК осуществляли с помощью коммерческого набора для экстракции нуклеиновых кислот «ДНК-сорб-В» производства «Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии» (Российская Федерация) согласно листа-вкладыша.

Реакцию амплификации проводили с помощью коммерческого набора «PCR-Core» производства фирмы Isogen (Российская Федерация) согласно листа-вкладыша и системы праймеров FR 300 F/R (CAG CCA GCC GAA TGT CAT CC/ TGC ACA CAG GCC ACA AGG GA) i IS 900 F/R (GGG TGT GGC GTT TTC CTT CG/ TCC TGG GCG CTG AGT TCC TC).

**Результаты исследований.** В результате проведенного бактериологического исследования после 2–3-х «слепых» пассажей на «Питательной среде для культивирования *M. avium* ssp. *paratuberculosis*» было выделено 5 культур (2 культуры от КРС, 3 — от бизона, европейского оленя, кенгуру (1)). Выделенные культуры росли очень медленно, видимый рост в виде тонкого белого маслянистого налета наблюдали спустя 3–4 месяца после 3-х «слепых» пассажей. При дальнейших исследованиях в ПЦР четыре культуры были идентифицированы как *M. avium* ssp. *hominisuis* (MAH) и одна – *M. avium* ssp. *paratuberculosis* (MAP). Кроме того, от цесарки через 35 дней после посева биоматериала на «Сухую питательную среду для культивирования микобактерий» была выделена еще одна культура. По культурально-морфологическим свойствам эта культура была отнесена к *M. avium* ssp. *avium* (MAA). В остальных посевах (24 пробы) видимого роста культур на твердых питательных средах не наблюдали. Однако при микроскопии через 30 дней после первичного посева биоматериала, почти во всех мазках наблюдали бледно-розовые сферические скопления, похожие на облака. Еще через пассаж среди этих розовых сфероидов выявляли очень мелкие, похожие на пыль фукусиновые зерна, кислотоустойчивые кокковидные формы, которые сначала образовывали единичные скопления, а при последующих пассажах — сферические образования уступали место множеству агломератов кислотоустойчивых кокковидных форм, зерен, среди которых иногда наблюдали очень мелкие единичные кислотоустойчивые палочки. Следует отметить, что полную утрату кислотоустойчивости, нитевидные структуры и другие гетероморфные формы мы не наблюдали, т. е. все сферические, кокковые и палочковидные формы имели цвет от бледно-розового до ярко-красного. Несмотря на 5–6 проведенных последовательных пассажей, полную реверсию к палочковидным формам при микроскопии мы не выявили, получить видимый рост колоний в какой-либо форме на твердых средах также не удалось. Этот факт свидетельствует о стабильности измененных форм.

Дальнейшим шагом наших исследований была изоляция «некультивируемых» L-форм, которую проводили с использованием разработанной нами полужидкой среды. В глубь этой среды с помощью пастеровской пипетки был произведен посев смывов с поверхности «Питательной среды для культивирования *M. avium* ssp. *paratuberculosis*». Через 30–40 дней культивирования в отдельных пробирках появился рост в виде туманности с наличием мельчайшей зернистости. Рост наиболее хорошо видных колоний L-форм представлен на рисунке 1.

Параллельно с посевом на полужидкую среду для изоляции L-форм, смывы были исследованы на наличие ДНК MAP в ПЦР.

Результаты проведенных молекулярно-генетических исследований приведены в электрофореграммах (рис. 2, 3).



Рис. 1. Рост L-форм в полужидкой питательной среде (через 30 дней)

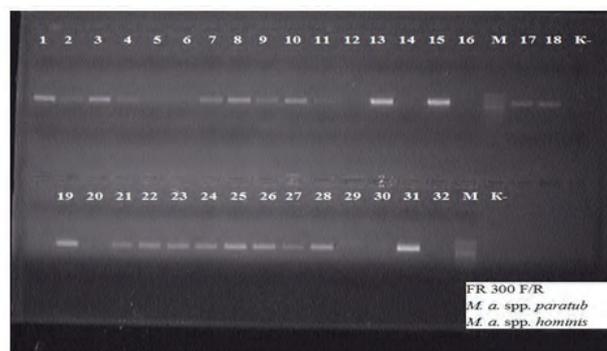


Рис. 2. Результат электрофоретического анализа продуктов амплификации в 1,5 % агарозном геле с системой праймеров FR 300 F/R: №№ 1–30 — исследуемые образцы, № 31 и 32 – позитивный контроль, М – маркер молекулярного веса, К – отрицательный контроль

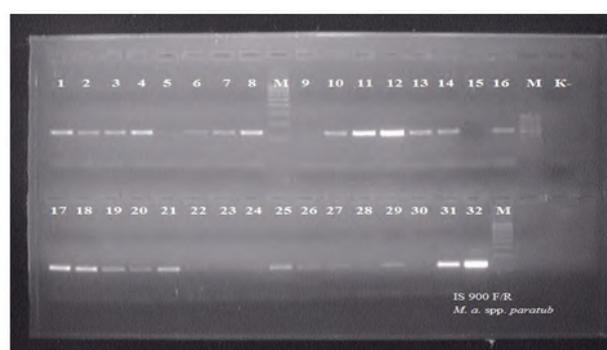


Рис. 3. Результат электрофоретического анализа продуктов амплификации в 1,5 % агарозном геле с системой праймеров IS 900 F/R: №№ 1–30 – исследуемые образцы, № 31 и 32 – позитивный контроль, М – маркер молекулярного веса, К – отрицательный контроль

По результатам проведенных ПЦР исследований с системой праймеров FR 300 F/R в образцах №№ 1–4, 7–11, 13, 15, 17–19, 21–28, 31 образовывались амплификационные фрагменты соответствующей длины (300 п.н.) и были идентифицированы как *MAP* или *MAN*. С системой праймеров IS 900 F/R было выявлено 24 позитивных образца (№№ 1–4, 6–8, 10–14, 16–21, 25–27, 29, 31, 32), в которых образовывались ампликоны специфической длины 216 п.н.

Таким образом, из 20 исследуемых проб биологического материала от КРС, в ПЦР идентифицированы 18 – *MAP* и только 2 пробы – *MAN*. Из 9 проб фекалий от зоопарковых животных идентифицировано 4 – *MAN*, 4 – *MAP* и 1 – *MAA*.

Факт выявления ДНК двух подвидов *M. avium* complex (*MAP* и *MAN*) в пробах биологического материала от КРС и фекалиях зоопарковых животных разных видов, свидетельствует о персистенции классических и измененных форм в организме животных. Изоляция L-форм и ДНК *MAP* из питьевой воды имеет важное эпидемиологическое значение, так как *MAP* являются возможным этиологическим агентом в развитии у человека болезни Крона.

**Выводы.** 1. Не все штаммы *MAP* возможно изолировать при стандартной процедуре культивирования. 2. Персистирующие в организме сельскохозяйственных животных измененные формы *MAP* могут обуславливать сенсбилизацию к туберкулину. 3. Бактериологическое исследование проб биоматериала от сенсбилизированных к туберкулину животных рекомендуется проводить с использованием твердых и полужидких питательных сред. В случае отрицательных результатов культурального исследования и позитивной микроскопии, пробы необходимо дополнительно исследовать в ПЦР.

## Список литературы

- Allan, E., Hoishen, C. & Gumpert, J. Bacterial L-forms. // *Advances in Applied Microbiology*. - 2009. - Vol. 68. - P. 1- 39.
- Beran, V., Havelkova, M., Kaustova, J., Dvorska, L., Pavlik, I. Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review // *J. Veterinarni Medicina*. - 2006. - № 51, (7). - P. 365–389.
- Domingue, G. Demystifying pleomorphic forms in persistence and expression of disease. // *Discovery Medicine*. - 2010. - Vol.10, N 52. -P. 234-246.
- Onwuamaegbu, M.; Belcher, R. & Soare, C. Cell wall-deficient bacteria as a cause of infections: a review of the clinical significance. // *Journal of International Medical Research*. - 2005. - Vol. 33, N 1. - P. 1- 20.
- Zhang, Y. Persistent and dormant tubercle bacilli and latent tuberculosis. // *Frontiers in Bioscience*. - 2004. - Vol. 9, N 1. - P. 1136-1156.
- Domingue, G. *Cell-wall Deficient Bacteria: Basic Principles and Clinical Significance*. Reading Mass: Addison Wesley Publishing Co., 1982.
- Michailova, L.; Kussovski, V.; Radoucheva, T.; Jordanova, M.; Berger, W.; Rinder, H. & Markova, N. Morphological variability and cell wall deficiency in *Mycobacterium tuberculosis* 'heteroresistant' strains. // *International Journal of Tuberculosis and Lung Diseases*. - 2005. -Vol. 9, No 8. - P. 907-914.
- Nadya Markova. Cell Wall Deficiency in Mycobacteria: Latency and Persistence, Understanding Tuberculosis - Deciphering the Secret Life of the Bacilli, Dr. Pere-Joan Cardona (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/30919. - 2012.
- Mattman, L.H. *Cell wall Deficient Forms. Stealth Pathogens*, 3rd ed., CRC Press Inc., Boca Raton., 2001.
- Прозоровский, С.В., Кац Л.Н., Каган Г.Я. L-формы бактерий //М.: Медицина, 1981. - 239 с.
- Condron RJ, Schroen CJ, Black CA, Ridge SE and Hope AF. 1995. Histological confirmation of subclinical infection with Map in cattle. In: *Proceedings of the Fourth International Colloquium on Paratuberculosis*; July 17- 21, 1994, (Chiodini RJ, Kreeger JM, eds), International Association for Paratuberculosis Inc., Providence, RI, USA, pp:297-301.
- Hulten K, Karttunen TJ, El-Zimaity HM, Naser SA, Collins MT, Graham DY, El-Zaatari FA. Identification of cell wall deficient forms of *M. avium* subsp. paratuberculosis in paraffin embedded tissues from animals with Johne's disease by in situ hybridization // *J Microbiol Methods*. - 2000. - Vol. 42(2). P. 185-95.
- Wayne L.G. Dormancy of Mycobacterium tuberculosis and latency of disease. *European. // Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. - 1994. - № 13. - P. 908–914.
- Ulrichs T., Kaufmann S.H.E. Mycobacterial persistence and immunity. // *Frontiers in Bioscience*. - 2002. - № 7. - P. 458–469.
- Bobchenok A.P., Steklova L.N., Vishnevskaya Y.B., Melnikova N.N., Vishnevsky B.I. The detection rate and clinical and diagnostic values of L-forms of the pathogen in patients with pulmonary or extrapulmonary tuberculosis (in Russian). // *Problemy Tuberkuleza i Bolezni Legkikh*. - 2002. - № 4. - P 19–21.
- Елисеєва І.В., Бабич Е.М., Волянський Ю.Л., Скляр Н.І., Белозерський В.І. Оролі латентних, трудно культивуємих і некультивуємих персистентних бактерій в патології людини // *Аналі Мечниковського Інституту*. - 2006. - № 1. - P. 12-46.
- Shleeveva, M.; Salina, E. & Kaprelyants, A. (). Dormant of Mycobacteria. // *Mikrobiologiya*. - 2010. - Vol. 79, No. 1. - P. 3–15.
- Udou T.; Ogawa M. & Mizuguchi, Y. (). Spheroplast formation of *Mycobacterium smegmatis* and morphological aspects of their reversion to the bacillary form. // *Journal of Bacteriology*. - 1982. - Vol. 151, No 2. - P. 1035–1039.

**THE ROLE OF PERSISTENT L-FORMS OF *M. AVIUM* SUBSPECIES *PARATUBERCULOSIS* (MAP) IN THE OCCURRENCE OF NONSPECIFIC REACTIONS ON TUBERCULIN**

**Zavgorodniy A. I., Pozmogova S. A., Sapko S. A., Kalashnyk M. V.**

*National Scientific Center «Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine», Kharkiv, Ukraine*

*The purpose of research - the definition of the causes of non-specific reactions on tuberculin in cattle.*

*It was studied 20 samples of biological material from reacting on tuberculin cattle, 9 samples of fecal matter from zoo animals and one sample of tap water.*

*Materials and methods. Investigations were conducted with using bacteriological (culture and microscopy) and molecular genetic (PCR) research methods.*

*The results of research. Six cultures were isolated with using culture method. These cultures were identified by PCR as: 4 - *M. avium* spp. hominisuis, 1 - *M. avium* subsp. avium, 1 - *M. avium* subsp. paratuberculosis. The other 24 samples did not grow in standard cultivation procedure, but grew on semi liquid medium for the isolation of L-forms. Nonculturable altered forms were identified by PCR as the *M. avium* ssp. paratuberculosis (n = 21), *M. avium* ssp. hominissuis (n = 2), and one sample was not identified.*

*Eighteen samples of biological material from cattle were identified as positive MAP, 2 samples – MAH positive by PCR from 20 samples in total number. Four samples of faeces from zoo animals identified as *M. avium* spp. hominisuis, 4 – *M. avium* subsp. paratuberculosis, 1 – *M. avium* subsp. avium.*

*Isolation of L-forms and DNA of MAP from drinking water has great epidemiological importance, because MAP is the etiologic agent of the development of Crohn's disease in humans.*

*Conclusions. 1. It's not possible to isolate all strains of MAP according standard procedure of cultivation. 2. Modified forms of MAP that persist in the organism of agricultural animals can cause sensibilization on tuberculin in animals. 3. Bacteriological examination of biological material samples from animal sensibilized to tuberculin recommended to conduct with using solid and semi liquid nutrient media. Samples should be further investigated by PCR in case of negative results of culture study and positive microscopy.*

**Keywords:** paratuberculosis, sensitization, persistence, modified forms of mycobacteria