

Результаты ГПНИ ИЭВ им. С.Н. Вышелесского

В 2019-2020 гг. в рамках ГПНИ 9 «Качество и эффективность агропромышленного производства» подпрограмма 9.5 «Животноводство и племенное дело» (2016-2020 гг.), Институтом экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского было выполнено задание 5.66 **«Исследование действия дезинфектантов на микобактерии туберкулеза с учетом их способности образовывать защитные формы, способные восстанавливать жизнеспособность в виде форм с дефектной клеточной стенкой».**

Установлено, что щелочной раствор формальдегида и композиция на основе глутарового альдегида полностью инактивировали микобактерии туберкулеза (МБТ). Дезинфектанты с ПГМГ и ЧАС подавляли 98-98,9% клеток, а композиция «ЧАС + органические кислоты» с меньшим спектром ЧАС, инактивировала 92,7% клеток МБТ. Тем не менее, после инкубации «убитых» МБТ в стимуляторе роста и посева на среду ВКГ, во всех случаях удалось получить восстановление жизнеспособности в виде CWD МБТ. То есть, при летальном контакте с дезинфектантами, как и при термическом стрессе, МБТ образовывали защитные формы. В этом процессе можно предполагать участие белков теплового шока (hsp 65, hsp 70), способствующих сохранению жизнеспособности МБТ в макрофагах в условиях гипоксии, голодания, действия ферментов и окислителей.

В восстановлении жизнеспособности МБТ основную роль играли стимуляторы роста, предположительно активизирующие поступление в защитные формы водных растворов, стимулирующие Са-зависимые ферменты и, возможно, синтез ростовых факторов ускоряющих, даже в субпикомолярных концентрациях, рост микобактерий. Появлению колоний также способствовали «слепые» пересевы, использующиеся при выделении CWD МБТ, при которых, вероятно, переносятся ростовые факторы, обеспечивается контакт и взаимодействие клеток.

МБТ восстанавливали жизнеспособность в виде полиморфных некислотоустойчивых (НКУ) форм с типичной для CWD МБТ морфологией. То, что полученные культуры не были результатом контаминации, подтверждало наличие общих антигенов с *M. bovis* и специфичных для вида участков ДНК.

Установлено, что восстановление жизнеспособности химически инактивированных МБТ (потерявшие способность расти на яичных питательных средах и патогенность) может происходить при температуре 18-22⁰С в увлажненной почве. Предположено, что восстановившие жизнеспособность CWD МБТ способны размножаться в почве, так как *in vitro* могут расти при температуре ниже 37⁰С и на простых питательных субстратах. Од-

нако для подтверждения этого, нужны специальные исследования, так как на этот процесс может влиять микрофлора почвы.

Установлено, что жизнеспособность химически инактивированных микобактерий туберкулеза может восстанавливаться в виде некислоустойчивых микобактерий с дефектной клеточной стенкой (CWD) в организме с последующей длительной персистенцией. Восстановившие жизнеспособность CWD МБТ при введении *per os* приживались и персистировали в организме мышей. То есть, проникая с пищей, водой, аэрозолями, они могут инфицировать людей и сельскохозяйственных животных. Маловероятно, что CWD МБТ способны быстро трансформироваться в типичные патогенные МБТ. Даже частичная реверсия при целенаправленных попытках индукции, происходит крайне редко. Тем не менее, значимость феномена восстановления жизнеспособности химически инактивированных МБТ подтверждает установленное родство CWD изолятов из контаминированной почвы с CWD изолятами из ультрапастеризованного молока производства Швеции и Латвии, считающихся свободными от туберкулеза крупного рогатого скота. То есть, даже при длительном отсутствии случаев активного заболевания туберкулезом, в стадах присутствуют животные, инфицированные CWD МБТ, которые остаются «незаметными» для классических методов выявления туберкулезной инфекции и длительно выделяют измененные (защитные формы) МБТ с молоком, сохраняющие способность восстанавливать жизнеспособность после ультрапастеризации. Актуальность этой связи подтверждает установленное родство изолятов из контаминированной почвы и CWD изолятов из культур Т-лимфоцитов человека с Т-лимфобластной лейкемией и клеток почки эмбриона овцы, инфицированных вирусом бычьего лейкоза (FLK-BLV).

Установлено, что восстановившие жизнеспособность после летального химического воздействия CWD МБТ имеют не только повышенную устойчивость, но и полную резистентностью к дезинфектанту, использовавшемуся для инактивации родительской культуры, а также и к некоторым другим АДВ. В частности, рост CWD МБТ №2 «Глутаровый альдегид» не подавляла «своя» дезинфицирующая композиция. Вероятно, МБТ каким-то образом кодировали информацию о летальном агенте, а восстанавливаясь экспрессировали факторы защиты белков и ДНК. Так как штамм CWD МБТ №2 «Глутаровый альдегид» оказался резистентным и к ПГМГ, разрушающим цитоплазматические мембраны за счет электростатического взаимодействия с кислыми фосфолипидами, можно предположить, что в каких-то генах МБТ кодируется информация о факторах защиты, а восстановившиеся клетки экспрессируют функционирование защитных механизмов. Вероятно, механизм

защиты мог становиться универсальным, так как при повторных контактах изолятов с дезинфектантами, оказывавших ингибирующее действие, резистентность появлялась уже после 1-2 контактов.

Безусловно, существование МБТ во внешней среде и образование защитных форм при стрессах, нуждаются в дальнейшем изучении, но уже сейчас ясно, что дезинфекция борется с формой МБТ, вызывающей туберкулез, но не исключает проблему восстановления их жизнеспособности и возможных эффектов, вызываемых восстановившимися жизнеспособность CWD МБТ. Если процесс восстановления жизнеспособности МБТ невозможно предотвратить, замедлить образование CWD МБТ можно ротацией дезинфектантов с разными АДВ.

Известно, что большинство микроорганизмов, если они выделены не от человека и животных, подвергавшихся лечению антибиотиками, чувствительны к большинству антибиотиков разных групп. Однако исследованные CWD МБТ, в том числе восстановившие жизнеспособность после воздействия дезинфектантов, оказались преимущественно резистентными. Они были резистентны к стрептомицину, эффективному против типичных МБТ. На 6 из 7 штаммов не действовал пенициллин, цефалоспорины и неомицин. Только фторхинолоны оказывали выраженное действие на все штаммы CWD МБТ. Исходя из механизма их действия, можно предположить, что уникальная жизнеспособность МБТ и CWD МБТ может быть связана с функционированием ДНК-гиразы, топоизомеразы-4, участвующих в синтезе ДНК и РНК.

Необходимо отметить, что резистентность к антибиотикам была более выраженной у CWD МБТ, выделенных при опухолевых заболеваниях, а также при туберкулезе человека. То есть, в случаях когда их родительские формы ранее могли контактировать с антибиотиками (лечение антибиотиками, добавление антибиотиков в питательную среду при культивировании культур клеток). Причем, у таких CWD МБТ, исключительно быстро развивалась резистентность, в том числе к фторхинолонам и рифампицину.

Ранее было известно, что CWD МБТ отличаются выраженным полиморфизмом, но не ясно, от чего зависит появление той или иной формы. Нами, впервые установлено, что на изменение морфологии, часто радикальное, могут влиять антибиотики. Скорее всего, изменение морфологии является признаком приспособления к неблагоприятным условиям, вызываемым антибиотиком. Пока не удалось определить закономерности изменения морфологии, но защитные реакции проявлялись образованием «пустых» спороподобных

форм, зернистых форм, вплоть до появления отдельных кокков, образованием частично кислотоустойчивых фрагментов клеток, а иногда ростом в виде детрита.

В результате исследований были подготовлены:

Методические рекомендации: **«Повышение эффективности дезинфекции при проведении мероприятий по профилактике туберкулезной инфекции у крупного рогатого скота».**