

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ, ВЫЗВАННЫХ АТИПИЧНЫМИ МИКОБАКТЕРИЯМИ

Е. А. КОСОВОКОВ, научный сотрудник,
Т. С. ДУДОЛАДОВА, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,
Всероссийский научно-исследовательский институт бруцеллеза и туберкулеза животных
(644001, г. Омск, ул. Лермонтова, д. 93)

Ключевые слова: атипичные микобактерии, морские свинки, туберкулез, микобактериозы, *M. phlei*, *M. smegmatis*, патогенные изменения, заражение, противотуберкулезные мероприятия, некротический очаг.

В статье приводится анализ изменений во внутренних органах животных, зараженных атипичными микобактериями в зависимости от срока заражения. В литературе описано более 20 видов атипичных микобактерий, являющихся причиной микобактериозов [1], однако в отличие от туберкулезных они относятся к необлигатным патогенам. По мере ликвидации туберкулеза сельскохозяйственных животных все более возрастает роль нетуберкулезных микобактерий и различных видов микобактериозов, которые нередко путают с туберкулезной инфекцией. Это объясняется тем, что при определенных условиях нетуберкулезные микобактерии могут проявлять патогенные свойства [2]. Установить этиологическую значимость нетуберкулезных микобактерий чрезвычайно сложно. Анализ изменений во внутренних органах животных, зараженных атипичными микобактериями, в зависимости от срока заражения позволяет более детально отследить развитие патологического процесса, вызванного искусственным заражением лабораторных животных, а также выявить четкую локализацию изменений в органах и тканях. Также метод позволяет дифференциально диагностировать патологические процессы, возникшие на определенных сроках инфицирования животных, характерных для развития тех или иных патологий [3, 4]. Таким образом, исследователю открывается более обширное представление о данном виде инфекции, что, несомненно, оказывает благотворное влияние на развитие науки и позволяет разрабатывать новые методы диагностики, профилактики и лечения, а также дает возможность усовершенствовать старые методы и внедрять их в работу научных организаций и животноводческих хозяйств для более эффективной борьбы с данным видом заболевания.

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF PATHOMORPHOLOGICAL CHANGES CAUSED BY ATYPICAL MYCOBACTERIA

Е. А. KOSOVOKOV, scientific employee,
Т. S. DUDOLADOVA, candidate of biological sciences, senior researcher,
All-Russian Research Institute of Brucellosis and Tuberculosis of Animals
(93 Lermontov str., 644001, Omsk)

Keywords: atypical mycobacteria, guinea pigs, tuberculosis, mycobacteriosis, *M. phlei*, *M. smegmatis*, pathogenic changes, infection, anti-tuberculosis measures, necrotic focus.

There are analyzes the changes in the internal organs of animals infected with atypical mycobacteria depending on the time of infection. In the literature there are described more than 20 species of atypical mycobacteria that are the cause of mycobacteriosis [1], however, unlike tuberculosis, they are related to non-pathogenic pathogens. As the elimination of tuberculosis of farm animals the role of non-tuberculosis mycobacteria and mycobacteriosis more and more increases, which are often confused with tuberculosis infection. This is because, under certain conditions non-tuberculosis mycobacteria can be pathogenic properties [2]. The etiological significance of non-tuberculosis mycobacteria are extremely difficult to determine. The analysis of changes in the internal organs of animals infected with atypical mycobacteria depending on the time of infection allows for more detailed monitoring of the development of the pathological process caused by artificial infection of laboratory animals, as well as to identify a clear localization of changes in the organs and tissues. The same method allows to differentially diagnose of pathological processes that occurred at certain periods of infection animals characteristic of the development of certain pathologies [3, 4]. Thus, the researcher displayed a vast information about this kind of infection, which undoubtedly has a beneficial effect on the development of science and allows us to develop new methods of diagnosis, prevention and treatment, as well as an opportunity to improve the old methods and implement them in the work of scientific organizations and animal farms, for a more effective fight against this disease.

Положительная рецензия представлена В. И. Плешаковой, доктором ветеринарных наук, профессором,
заведующей кафедрой Омского государственного аграрного университета им. П. А. Столыпина

Цель и методика исследований

Целью исследований явилось изучение патолого-анатомических и гистологических изменений у морских свинок, зараженных в эксперименте разными видами микобактерий.

Работа выполнялась в лаборатории диагностических исследований и биотехнологии ФГБНУ ВНИИБТЖ. Для выполнения поставленной задачи были сформированы три группы морских свинок (всего 45 голов), которые содержались в стандартных условиях, кормление осуществлялось согласно нормам рациона для лабораторных животных. Все опытные животные предварительно были исследованы ППД-туберкулином для млекопитающих в дозе 25 МЕ в 0,1 мл внутрикожно, читку реакции осуществляли через 72 ч. Животных, отрицательно реагирующих на ППД-туберкулин, заражали 3–4-недельными культурами атипичных микобактерий внутримышечно в область паха в дозе 40 мг/мл (табл. 1).

Эксперимент проводился в соответствии с санитарно-эпидемическими правилами (СП 1.3.2322-8) «Безопасность работы с микроорганизмами 3–4 группы патогенности и возбудителями паразитарных болезней», 2008-05-01; Инструкцией по унифицированным методам микробиологических исследований при выявлении, диагностике и лечении туберкулеза, приложение № 11 к приказу «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий в РФ» № 109 от 21 марта 2003 г.; санитарно-эпидемическими правилами (СП 1.3.2322-08) «Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов 3–4 группы патогенности»; рекомендациями «Лабораторная диагностика туберкулеза», 1988; МУ 1.3.1888-04.

Исследование проведено на морских свинках в соответствии с «Правилами работы с использованием экспериментальных животных» (Приложения к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12 августа 1977 г. № 755). Лабораторных животных содержали в условиях вивария, кормление осуществляли согласно нормам рациона для лабораторных животных [6, 7, 8]. Протокол экспериментов в разделах выбора, содержания животных, моделирования патологических процессов и выведения их из

опыта был составлен в соответствии с принципами биоэтики, правилами лабораторной практики (GLP) и приказом МЗ РФ № 267 от 19 июня 2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики». Отбор и содержание животных, формирование групп проводилось по общепринятым схемам.

Через 7, 14, 28, 45, 60 суток после инфицирования животных выводили из эксперимента путем декапитации (под эфирным наркозом) и подвергали тотальному обескровливанию. Материалом для гистологического исследования служили печень, селезенка, легкие и паховые лимфатические узлы от экспериментальных морских свинок.

При проведении гистологических исследований использовали стандартные методы [5, 6, 7]. Кусочки органов и тканей фиксировали в 10 %-м нейтральном растворе формалина на фосфатном буфере. Гистологические препараты были изготовлены методом заливки в парафин с использованием станции пробоподготовки STP-120 и станции заливки парафином ЕС-350. На микротоме санного и роторного типа готовили срезы толщиной 3–5 мкм, размещали на стандартных по толщине предметных стеклах с последующей окраской по классической методике гематоксилином и эозином. После окраски срезы заключали в синтетическую заливочную среду BioMount и покрывали стандартными по толщине покровными стеклами.

Микрофотосъемку гистологических препаратов и их оцифровку проводили на микроскопе Axio-Imager A1 с использованием компьютерного программного комплекса Axiovision ver-4.7.

Результаты исследований

У морских свинок, зараженных *M. phlei*, на 7-е сутки после заражения регистрировали реакцию со стороны лимфатических узлов, характеризующуюся появлением герминативных центров размножения лимфоцитов в лимфоидных фолликулах. В печени начальные дистрофические процессы. Микроскопическая картина в легких и селезенке соответствовала норме. У животных, зараженных *M. smegmatis*, отмечали в печени дистрофические процессы в гепатоцитах и сосудистые нарушения, проявляющиеся расширением синусоидных капилляров и незначительной гиперемией органа. Лимфатические

Таблица 1
Количество животных и сроки убоя их для гистологических исследований
Table 1

The number of animals and timing of slaughtering its for histological studies

Группа <i>Group</i>	Количество голов <i>Number of heads</i>	Чем заражены <i>Than they are infected</i>	Количество и сроки убоя животных для гистологических исследований <i>The number and timing of slaughter of animal for histological studies</i>				
			7-е сутки <i>7 days</i>	14-е сутки <i>14 days</i>	28-е сутки <i>28 days</i>	45-е сутки <i>45 days</i>	60-е сутки <i>60 days</i>
1	15	<i>M. smegmatis</i>	3	3	3	3	3
2	15	<i>M. phlei</i>	3	3	3	3	3
3	15	Интактные <i>Intact</i>	3	3	3	3	3

узлы в редких случаях были увеличены, не во всех лимфоидных узелках регистрировали герминативные центры просветления. Морфология селезенки соответствовала нормальному состоянию органа, иногда встречали единичные участки белой пульпы с центрами бласттрансформации лимфоцитов.

На 14-е сутки после заражения у морских свинок, зараженных атипичными видами микобактерий *M. phlei* и *M. smegmatis*, усиливались реакции со стороны лимфатических узлов, которые характеризовались гиперплазией лимфоидных фолликулов, увеличением площади герминативных центров (до 95 %), гиперемией, начальными пролиферативными процессами в интерстициальной ткани. В легких наблюдали гиперемию, десквамацию альвеолярного эпителия, а также лимфоцитарные пролиферации.

В печени при заражении *M. phlei* регистрировали обширные неорганизованные очаги некроза, гепатоциты в области этих очагов в состоянии некроза и некробиоза, в отдаленных дольках в разной степени дистрофии и некробиоза, большинство ядер пикнотичны. Встречаются единичные лимфоцитарные инфильтраты в паренхиме органа.

У животных, зараженных *M. smegmatis*, в печени наблюдали нарастание дистрофических процессов, протекающих по типу зернисто-жировой дистрофии гепатоцитов, в редких случаях некроз, при этом ядра их пикнотичные или подвержены лизису. Нередко в паренхиме органа наблюдали наличие мелких лимфоцитарных инфильтратов.

У морских свинок, зараженных как *M. phlei*, так и *M. smegmatis*, на 28-й день на месте заражения наблюдался небольшой участок уплотнения, паховые лимфатические узлы были немного увеличены. При гистологическом исследовании отмечали: в печени нерезко выраженную пролиферацию гистиоцитов и лимфоидных клеток по триадам, в селезенке – гиперплазию фолликулов. В легких отмечалось утолщение стенки альвеол за счет пролиферации ретикулярного и лимфоидного типа клеток, около сосудов встречались небольшие очаги лимфоидной инфильтрации с единичными клетками макрофагального типа.

На 45-й день инфицирования *M. phlei* и *M. smegmatis* гистологические изменения в органах у морских свинок были сходными. Рисунок дольчатого и балочного строения печени сохранен. Хорошо выражены признаки склерозирования органа. В междольковой и периваскулярной соединительной ткани выявлялись очаговые скопления мононуклеарных клеток. В паренхиме органа отмечались незначительные кровоизлияния. Гепатоциты с явлениями зернистой дистрофии, среди них заметно увеличение числа клеток, имеющих гиперхромные и диплоидные ядра.

В селезенке некоторые фолликулы имеют расширенные герминативные центры. Лимфоидная ткань

периартериальных гильз умеренно гиперплазирована, с образованием в них фолликулов с герминативными центрами. В герминативных центрах обнаруживались незначительные количества бластных клеток и фигур митоза.

При гистологическом исследовании лимфатических узлов отмечалось незначительное расширение герминативных центров фолликулов, гиперплазия лимфоидной ткани и инфильтрация мякотных тяжей клетками плазмоцитарного ряда. Отдельные сосуды лимфоузла были с явлениями суживания эндотелия.

Легкие не спавшиеся, воздушны, светло-красного цвета. Наряду с сохранившейся неизменной легочной тканью обнаруживаются фокусы дистелектаза и ателектаза с утолщением межальвеолярных перегородок. В местах утолщения отмечается инфильтрация лимфоидно-гистиоцитарных клеток, а также расширение и кровенаполнение капилляров. Эпителий крупных бронхов набухший, местами слущен, подслизистая ткань отекает, содержит небольшое количество мононуклеарных клеток. Сосуды артериовенозных анастомозов в состоянии расширения. Количество альвеолярных макрофагов как в сохранившихся участках легких, так и в местах ателектазов и дистелектазов незначительно.

На 60-е сутки исследований изменения у морских свинок, зараженных атипичными штаммами *M. phlei* и *M. smegmatis*, не отмечались.

Выводы

Как показали наши исследования, патоморфологические изменения, вызываемые *M. smegmatis* и *M. phlei*, незначительны для организма лабораторных животных. Это говорит о практически полной утрате патогенных качеств у этих микобактерий.

Также установлена однотипная клеточная воспалительная реакция на ранних сроках заражения у морских свинок при инфицировании разными видами микобактерий в месте введения культуры, регионарных лимфатических узлах и паренхиматозных органах, выраженная в развитии катарально-гнойного воспаления в месте введения культуры, пролиферации ретикуло-эндотелиальных элементов стромы в лимфатических узлах, селезенке, легких, печени. К 60-м суткам изменения в органах морских свинок не регистрируются. Наблюдаются процессы регенерации в органах.

Таким образом, можно заключить, что атипичные микобактерии не обладают достаточной вирулентностью для развития генерализованного туберкулезного процесса у лабораторных животных, однако микобактериозы, вызываемые ими, сходны с начальным процессом туберкулезного процесса.

Для дифференциации начального туберкулезного процесса от микобактериозов необходимо проводить гистологические исследования, что особенно актуально при постановке биопробы на туберкулез.

Литература

1. Таланова О. С., Кузьмина О. А., Холева А. О., Савоненкова Л. Н., Арямкина О. Л. Туберкулез печени и селезенки // *Мат. рос. науч.-практ. конф. с междунар. участием (Ульяновск, 15–16 декабря 2010 г.)*. Ульяновск, 2010. С. 137–142.
2. Таллер Л. А. Изучение динамики инфекционного процесса, вызванного патогенными и атипичными микобактериями в эксперименте на лабораторных животных / Л. А. Таллер, Г. М. Дюсенова, Е. Ю. Секин, А. Д. Слепченко // *Современные проблемы анатомии, гистологии и эмбриологии животных*. Казань, 2013. С. 162–167.
3. Мингалеев Д. Н. Химиопрофилактика туберкулеза у телят молочного периода с использованием линарола / Д. Н. Мингалеев, Р. А. Хамзин // *Учен. зап. Казань*, 2014. С. 171–175.
4. Галинская Л. А. Туберкулез: профилактика и лечение / Л. А. Галинская. Ростов н/Д : Феникс, 2013. С. 192.
5. Таллер Л. А. Выделение атипичных микобактерий из биоматериала от лабораторных животных на модифицированной питательной среде / Л. А. Таллер, Г. М. Дюсенова, Т. А. Янченко // *Достижения науки и техники АПК*. 2015. Т. 29. № 4. С. 56–57.
6. Боганец Н. С. Лабораторная диагностика туберкулеза и ее совершенствование / Н. С. Боганец, Л. А. Таллер, Н. А. Свириденко, Л. Н. Гордиенко // *Аграрная наука – сельскохозяйственному производству Сибири, Монголии, Казахстана и Болгарии* : сб. науч. докладов XVII Междунар. науч.-практ. конф. Новосибирск, 2014. С. 85–88.
7. Ощепков В. Г. Комплекс ускоренной дифференциальной диагностики туберкулиновых реакций крупного рогатого скота в благополучных хозяйствах / В. Г. Ощепков, Н. С. Боганец, Л. А. Таллер, Н. А. Свириденко, Г. М. Дюсенова, А. Д. Панкратова, Л. Т. Аппельганц, Т. А. Вассимирская, А. Д. Слепченко, Л. М. Каримова, И. Н. Каликин // *Методические рекомендации*. Омск, 2010. С. 15.
8. Власенко В. С. Иммунные и морфологические изменения у инфицированных микобактериями морских свинок под действием препарата ким-м2 / В. С. Власенко, Е. А. Гуляева, М. А. Бажин // *Ветеринария*. Т. 151. № 3. М., 2017. С. 62.
9. Найманов А. Х. Проблема неспецифических реакций на туберкулин и совершенствование симульганной пробы для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота / А. Х. Найманов, Г. И. Устинова, Н. Г. Толстенко, Е. П. Вангели, О. Д. Кучерук // *Ветеринария*. № 6. М., 2015. С. 20–25.

References

1. Talanova O. S., Kuzmina O. A., Kholeva A. O., Savonenkova L.N., Aryamkina O. L. Tuberculosis of the liver and spleen // *Materials of the Russian scientific-practical conference with international participation (Ulyanovsk, December 15–16, 2010)*. Ulyanovsk, 2010. P. 137–142.
2. Taller L. A. Study of the dynamics of the infectious process caused by pathogenic and atypical mycobacteria in an experiment on laboratory animals / L. A. Taller, G. M. Dyusenova, E. Yu. Sekin, A. D. Slepchenko // *Modern problems of anatomy, histology and embryology of animals*. Kazan, 2013. P. 162–167.
3. Mingaleev D. N. Chemoprophylaxis of tuberculosis in calves of the milk period using linarol / D. N. Mingaleev, R. A. Khamzin // *Scientists notes*. Kazan, 2014. P. 171–175.
4. Galinskaya L. A. Tuberculosis: prevention and treatment / L. A. Galinskaya. Rostov on the Don : Phoenix, 2013. P. 192.
5. Taller L. A. Isolation of atypical mycobacteria from biomaterial from laboratory animals on a modified nutrient medium / L. A. Taller, G. M. Dyusenova, T. A. Yanchenko // *Achievements of science and technology of agro-industrial complex*. 2015. Vol. 29. № 4. P. 56–57.
6. Boganets N. S. Laboratory diagnostics of tuberculosis and its improvement / N. S. Boganets, L. A. Taller, N. A. Sviridenko, L. N. Gordienko // *Agrarian science to the agricultural production of Siberia, Mongolia, Kazakhstan and Bulgaria* : Collection of scientific reports of the XVII international scientific and practical conference. Novosibirsk, 2014. P. 85–88.
7. Oschepkov V. G. Complex accelerated differential diagnosis of tuberculosis reactions of cattle in well-off farms / V. G. Oschepkov, N. S. Boganets, L. A. Taller, N. A. Sviridenko, G. M. Dyusenova, A. D. Pankratova, L. T. Appelgants, T. A. Vassimirskaia, A. D. Slepchenko, L. M. Karimova, I. N. Kalikin // *Methodical recommendations*. Omsk, 2010. P. 15.
8. Vlasenko V. S. immune and morphological changes in guinea pigs infected with mycobacteria under the action of the preparation of kim-m2 / V. S. Vlasenko, E. A. Gulyaeva, M. A. Bazhin // *Veterinary Medicine*. Vol. 151. No. 3. М., 2017. P. 62.
9. Naimanov A. Kh. The problem of nonspecific reactions to tuberculin and improvement of the simultaneous test for the diagnosis of bovine tuberculosis / A. Kh. Naimanov, G. I. Ustinova, N. G. Tolstenko, E. P. Vangeli, O. D. Kucheruk // *Veterinary Medicine*. No. 6. М., 2015. P. 20–25.