

## Изучение развития туберкулезного процесса на модели морских свинок, инфицированных мутантными по RD-1 региону микобактериями

Ю.М. Мясоедов<sup>1</sup>, В.В. Пузанова<sup>2</sup>

<sup>1</sup> – ФГУП «Курская биофабрика», Курск

<sup>2</sup> – ОБУЗ «Областная наркологическая больница», Курск

Контактная информация: Мясоедов Юрий Михайлович, [MyasoedovYurij@yandex.ru](mailto:MyasoedovYurij@yandex.ru)

---

В исследовании представлены результаты оценки развития туберкулёзного процесса на модели морских свинок, инфицированных микобактериями, мутантными по RD-1 региону. Установлено, что инфекционный процесс сопровождается частичным угнетением гемопоэтической функции костного мозга (тромбоцитов, лимфоцитов). А при инфицировании *M. avium* – также и лейкоцитов. Постановка туберкулинового теста после инфицирования морских свинок *M. bovis* характеризуется более выраженной эозинофильной реакцией, *M. avium* – ростом нейтрофилов и моноцитов при снижении уровня лимфоцитов.

**Ключевые слова:** морские свинки, мутантные микобактерии, туберкулиновая проба, гематологический анализ.

---

### Введение

Туберкулёз животных является инфекционным заболеванием, широко распространённым во всём мире, причиняющим значительный экономический ущерб животноводству и представляющим эпидемиологическую опасность для человека. Существующие методы борьбы с инфекцией направлены на предупреждение заноса возбудителя в хозяйства, формирование устойчивого к возбудителю поголовья, выявление инфицированных животных с последующим их уничтожением [11].

При этом меры борьбы с заболеванием базируются на результатах изучения патогенеза инфекционного процесса, в частности – механизмов, сопряженных с иммунными [8, 10]. Так, например, изучение иммунологических механиз-

мов при туберкулёзе привело к разработке аллергического метода диагностики и его вариантов, являющегося первым этапом при проведении скрининга [6]. Изучение патогенеза туберкулёза, в основном, осуществляется при использовании полевых или лабораторных изолятов микобактерий с различными вирулентностью и интенсивностью развития инфекции в период в период до 3 мес. [2], вследствие чего изучение начального этапа инфекционного процесса, имеющего ключевое значение в формировании защитных механизмов и дальнейшего развития заболевания по прогрессивному или регрессивному пути, является затруднительным [9].

Поэтому изучение начального этапа туберкулёзного процесса целесообразнее осуществлять на биомоделях с

низкой интенсивностью течения заболевания. В свою очередь, исследование туберкулезного процесса, характеризующегося низкой интенсивностью, возможно при использовании микобактерий, мутантных по RD-1 региону, например, *M. bovis* штамм BCG и *M. avium* штамм 2282. Принимая во внимание вышеизложенное, **целью** исследования было изучение развития туберкулезного процесса на модели морских свинок, инфицированных мутантными по RD-1 региону микобактериями.

### Материалы и методы

В работе были использованы микобактерии бычьего вида: *M. bovis* штамм BCG и микобактерии птичьего вида *M. avium* штамм 2282, мутантные по RD-1 региону [4]. Микобактерии культивировали на картофельной среде Павловского в течение 25 суток при температуре 37°C, после чего приготавливали суспензии на физиологическом растворе, для инфицирования морских свинок, в дозах: *M. bovis* – 0,2 мг/0,1 см<sup>3</sup>, внутрикожно; *M. avium* – 3 мг/0,5 см<sup>3</sup>, внутримышечно. Использование данных дозировок и путей введения микобактерий в организм лабораторных животных было отработано ранее, как обеспечивающее низкую интенсивность развития инфекционного процесса. Через 30 дней после инфицирования животных использовали в опытах.

В исследовании были использованы беспородные самки морских свинок массой 500±100 г, одновременно полученные из ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, филиал «Андреевка». Животных содержали в вольерах, на стандартном рационе кормления, с использованием гранулированного корма. Перед зара-

жением морских свинок тестировали на туберкулез аллергическим способом с использованием ППД туберкулина в дозе 5 IU [6].

Развитие туберкулезного процесса оценивали по гематологическим показателям с помощью анализатора Abacus Junior B 12, согласно инструкции производителя, по следующим критериям: содержание лейкоцитов, содержание эритроцитов, концентрация гемоглобина, гематокрит, средний объем эритроцитов, среднее содержание гемоглобина в эритроците, средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах, широта распределения эритроцитов, содержание тромбоцитов, тромбоцитрит, средний объем тромбоцитов, широта распределения тромбоцитов [1]. Содержание нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов, эозинофилов оценивали методом микроскопии, в мазках, окрашенных по Романовскому-Гимза [3]. Образцы крови для осуществления аппаратного анализа отбирали в пластиковые пробирки Microvette с ЭДТА в количестве 200 мкл из сердца, однократно, для исключения влияния многократного отбора крови на результат экспериментов. Интенсивность развития туберкулезного процесса оценивали аллергической пробой с использованием ППД туберкулина для млекопитающих и ППД для птиц, производства ФГУП «Курская биофабрика».

Аллергены вводили в дозах: ППД для млекопитающих – 25 IU/0,1 см<sup>3</sup> и 5 IU/0,1 см<sup>3</sup>; ППД для птиц – 100 IU/0,1 см<sup>3</sup> и 10 IU/0,1 см<sup>3</sup>. Разведения туберкулинов осуществляли на растворителе микобактериальных аллергенов.

Статистическую обработку результатов эксперимента проводили стандартными методами [5].

### Результаты и их обсуждение

Проведение исследования включало два этапа. При реализации первого этапа осуществлялся анализ развития туберкулёзного процесса у морских свинок, инфицированных *M. bovis* и *M. avium* по гематологическим показателям и интенсивности аллергической реакции. На втором этапе проводился сравнительный анализ результатов, полученных на морских свинках, инфицированных *M. bovis* и *M. avium*, между собой.

В исследовании всего было использовано 40 морских свинок, распределённых на 5 групп по 8 особей в каждой. Первая группа являлась контрольной, заражение которой не проводилось; вто-

рую и третью группы инфицировали микобактериями бычьего вида; четвёртую и пятую группы инфицировали микобактериями птичьего вида. Результаты изучения гематологических показателей у морских свинок, инфицированных микобактериями *M. bovis*, представлены в табл. 1.

Анализ гематологических показателей у морских свинок, инфицированных микобактериями *M. bovis*, продемонстрировал, что спустя 1 мес. после заражения количество лимфоцитов не отличается от контрольного значения, в то время как после последующей постановки аллергической пробы происходит достоверное сни-

Таблица 1  
Гематологические показатели морских свинок, инфицированных микобактериями *M. bovis* штамм ВСГ

Показатель	M±m		
	I группа	II группа	III группа
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	15,90±1,27	14,56±2,00	13,10±0,72*
Эритроциты, 10 <sup>12</sup> /л	5,57±0,13	5,91±0,11	5,63±0,25
Концентрация гемоглобина, г/л	143,86±1,43	150,29±2,97	145±5,40
Гематокрит, %	43,04±0,76	46,32±0,93	44,19±1,93
Средний объём эритроцитов, мм <sup>3</sup>	77,38±0,78	78,29±0,71	78,5±0,57
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	25,86±0,39	25,41±0,24	25,83±0,30
Средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах, г/л	334,63±2,71	324,43±1,15	328,3±3,64
Широта распределения эритроцитов	12,89±0,15	12,99±0,08	13,03±0,18
Тромбоциты, 10 <sup>9</sup> /л	156,0±12,0	125,0±15,0*	85,0±10,0*
Тромбокрит, %	0,81±0,061	0,65±0,03*	0,44±0,03*
Средний объём тромбоцитов, мм <sup>3</sup>	5,83±0,08	5,67±0,11	5,71±0,12
Широта распределения тромбоцитов	35,56±0,40	34,64±0,33	35,08±0,49
Нейтрофилы, %	40,88±6,40	52,38±2,25*	40,63±6,48
Моноциты, %	3,13±0,67	5,5±1,41*	4,63±1,34
Лимфоциты, %	54,75±6,67	39,88±2,92*	52,63±6,19
Эозинофилы, %	1,25±0,37	2,25±0,65*	2,13±0,58*

Примечание: I группа – не инфицированные животные; II группа – животные через 30 суток после инфицирования; III группа – инфицированные животные после постановки туберкулинового теста;

\* – разница достоверна при  $p < 0,05$ .

жение числа лейкоцитов. Изучение содержания тромбоцитов как через 30 суток после инфицирования, так и после постановки туберкулинового теста продемонстрировало достоверное снижение. Определение содержания нейтрофилов продемонстрировало их повышение спустя 1 мес. после инфицирования и соответствие контрольному уровню после постановки туберкулинового теста. При исследовании содержания моноцитов было выявлено их увеличение по сравнению с контрольным значением через 30 суток после инфицирования и соответствие контрольному значению после последующей постановки теста ГЗТ. Изучение содержания лимфоци-

тов продемонстрировало снижение их количества через 1 мес. после заражения и соответствие контрольному значению после постановки аллергического теста. Определение содержания эозинофилов показало их повышение после инфицирования на 30 сутки и постановки аллергической пробы.

Изучение остальных гематологических показателей у морских свинок, инфицированных *M. bovis*, не продемонстрировало достоверных изменений как после инфицирования, так и после постановки туберкулиновой пробы.

Результаты изучения гематологических параметров крови морских свинок, инфицированных микобактериями *M. avium*, представлены в табл. 2.

Таблица 2  
Гематологические показатели морских свинок, инфицированных микобактериями *M. avium* штамм 2282

Показатель	M±m		
	I группа	IV группа	V группа
Лейкоциты, 10 <sup>9</sup> /л	15,90±1,27	13,09±1,29*	13,55±1,27*
Эритроциты, 10 <sup>12</sup> /л	5,57±0,13	5,67±0,11	4,94±0,28
Концентрация гемоглобина, г/литр	143,86±1,43	144,25±1,71	130,86±5,94
Гематокрит, %	43,04±0,76	43,98±0,57	38,85±1,87
Средний объём эритроцитов, мм <sup>3</sup>	77,38±0,78	77,75±0,94	79,14±1,45
Среднее содержание гемоглобина в эритроците, пг	25,86±0,39	25,49±0,35	26,64±0,47
Средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах, г/литр	334,63±2,71	328,25±1,73	337,29±2,46
Широта распределения эритроцитов	12,89±0,15	12,86±0,12	13,01±0,10
Тромбоциты, 10 <sup>9</sup> /л	156,0±12,0	87,0±10,0*	90,0±12,0*
Тромбокрит, %	0,81±0,061	0,34±0,02*	0,37±0,01*
Средний объём тромбоцитов, мм <sup>3</sup>	5,83±0,08	5,54±0,05	5,46±0,10
Широта распределения тромбоцитов	35,56±0,40	34,43±0,32	33,8±0,15
Нейтрофилы, %	40,88±6,40	50,71±6,30*	57,86±5,17*
Моноциты, %	3,13±0,67	5,71±0,84*	5,86±1,10*
Лимфоциты, %	54,75±6,67	41,57±6,89*	43,57±6,20*
Эозинофилы, %	1,25±0,37	2,00±0,62*	1,71±0,36

Примечание: I группа – не инфицированные животные; IV группа – животные через 30 суток после инфицирования; V группа – инфицированные животные после постановки туберкулинового теста;

\* – разница достоверна при p < 0,05.

Анализ гематологических показателей морских свинок, инфицированных *M. avium*, продемонстрировал, что через 1 мес. после заражения и постановки аллергической пробы происходит достоверное снижение уровня лейкоцитов. Анализ содержания тромбоцитов продемонстрировал их достоверное снижение через 1 мес. после инфицирования и постановки туберкулинового теста. Определение количества нейтрофилов через 30 суток после инфицирования и последующей постановки аллергической пробы выявило их увеличение. Исследование содержания моноцитов после инфицирования животных и постановки туберкулинового теста показало их увеличение. Анализ содержания лимфоцитов показал их снижение как после инфицирования, так и после постановки аллергической пробы. Изучение содержания эозинофилов выявило их повышение через 1 мес. после инфицирования и снижение до контрольного уровня после постановки аллергической пробы.

Изучение остальных гематологических показателей не продемонстрировало достоверных изменений как после инфицирования, так и после постановки туберкулиновой пробы.

Результаты постановки аллергической пробы с ППД туберкулинами в

группах морских свинок, инфицированных *M. bovis* и *M. avium*, представлены в табл. 3.

Из результатов постановки аллергической пробы, полученных в группах морских свинок, инфицированных *M. bovis* и *M. avium*, видно, что интенсивность аллергических реакций на используемые дозы ППД туберкулинов превышает 5 мм, что свидетельствует о развитии туберкулёзного процесса [6], в то же время размер реакций соответствовал интервалу 8-25 мм, при наличии достоверного различия между большими и малыми дозировками, что является показателем развития заболевания без прогрессирования [1].

Анализ развития туберкулёзного процесса у морских свинок, инфицированных *M. bovis* и *M. avium*, продемонстрировал как сходства, так и различия по гематологическим критериям. Так, в опытах на морских свинках, инфицированных *M. bovis* и *M. avium*, выявлено достоверное снижение количества лейкоцитов в крови после постановки аллергической пробы, в то время как снижение числа лейкоцитов после инфицирования на 30 сутки было выявлено только у морских свинок, заражённых *M. avium*. Определение содержания тромбоцитов показало их снижение на

Таблица 3

Результаты аллергической пробы с использованием ППД туберкулинов на морских свинках, инфицированных *M. bovis* и *M. avium*

Показатель	Животные инфицированные			
	<i>M. bovis</i>		<i>M. avium</i>	
Аллерген	ППД для млекопитающих		ППД для птиц	
Дозы туберкулина, IU	25	5	100	10
M±m	18,75±0,76	16,13±0,68*	16,64±0,62	10,36±1,80*

Примечание: \* – разница достоверна при  $p < 0,05$ .

30 день после инфицирования и постановки аллергической пробы у морских свинок, инфицированных как *M. bovis*, так и *M. avium*. Исследование содержания нейтрофилов у животных, инфицированных *M. bovis* и *M. avium*, показало достоверное их увеличение через 30 суток после инфицирования, при этом увеличение числа нейтрофилов у морских свинок, инфицированных *M. avium*, также выявлено и после постановки туберкулинового теста.

Анализ содержания моноцитов продемонстрировал их увеличение через 1 мес. после инфицирования у морских свинок, инфицированных *M. bovis* и *M. avium*, в то время как после постановки аллергической пробы увеличение было зарегистрировано лишь в группе морских свинок, инфицированных *M. avium*. Сопоставление содержания лимфоцитов у морских свинок, инфицированных *M. bovis* и *M. avium*, на 30 день после инфицирования выявило их снижение, при этом достоверно низкий уровень также был выявлен после постановки туберкулинового теста в группе морских свинок, инфицированных *M. avium*.

Исследование содержания эозинофилов показало их достоверное увеличение через 1 мес. после инфицирования в обеих экспериментальных группах (как *M. bovis*, так и *M. avium*), в то время как после постановки туберкулинового теста увеличение числа эозинофилов было выявлено только у морских свинок, инфицированных *M. bovis*.

На основании полученных данных можно судить как о сходстве, так и о различиях гематологических характеристик морских свинок, инфицированных *M. bovis* и *M. avium* через 30 суток после инфицирования и последующей

постановки аллергической пробы, что обусловлено использованием разных видов мутантных микобактерий. Так, известно, что морские свинки чувствительны к полевым изолятам микобактерий *M. bovis*, не содержащих мутацию в регионе RD-1 и вызывающих патологический процесс с системным поражением организма, но относительно устойчивы к микобактериям *M. avium*, что, вероятно, обусловлено молекулярными рецепторными механизмами, обуславливающими взаимодействие макрофагов и поступивших микобактерий [4]. Вместе с тем, независимо от степени патогенности микобактерий, в организме лабораторных животных развивается воспалительный процесс, сопровождающийся формированием классического иммунного ответа IV типа, что, в свою очередь, возможно, обусловлено наличием общих родовых антигенов у микобактерий *M. avium* [7].

### Выводы

Инфицирование морских свинок микобактериями *M. bovis* и *M. avium*, мутантными по RD-1 региону, сопровождается развитием инфекционного процесса и состояния гиперчувствительности замедленного типа с различными гематологическими изменениями. Через 1 мес. после заражения животных микобактериями *M. bovis* и *M. avium* происходит достоверное увеличение числа нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов. При этом у морских свинок, инфицированных *M. bovis* и *M. avium*, выявлено достоверное снижение тромбоцитов, лимфоцитов, а у морских свинок, зараженных *M. avium*, – лейкоцитов. После постановки туберкулинового теста в группе морских свинок, инфицированных *M. bovis*,

достоверно увеличивается количество эозинофилов; в группе морских свинок, инфицированных *M. avium*, – нейтрофилов и моноцитов. У морских свинок, инфицированных микобактериями *M. bovis* и *M. avium*, после постановки туберкулинового теста достоверно уменьшается число лейкоцитов и тромбоцитов, а у животных, заражённых *M. avium*, понижается число лимфоцитов.

### Список литературы

1. Гематологический анализатор Abacus Junior B12. Руководство пользователя. Версия 1.1. 60 с.
2. Гращенкова О.В., Зыков М.П. Оценка вирулентности микобактерий туберкулёза с помощью внутримозгового заражения морских свинок // Проблемы туберкулёза. 1985. № 8. С. 56-59.
3. Кондрахин И.П., Архипов А.В., Левченко В.И. и др. // Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики. - М.: Колос. 2004. С. 52-55.
4. Литвинов В.И. Латентная туберкулёзная инфекция – миф или реальность? // Туберкулёз и болезни лёгких. 2011. № 6. С. 3-9.
5. Лакин Г.Ф. Биометрия. - М.: Высшая школа. 1990. С. 50-51.
6. Наставление по диагностике туберкулёза животных. Утверждено Департаментом ветеринарии Минсельхоза РФ 18 ноября 2002 г. - М. 2002. 63 с.
7. Фрадкин В.А. Диагностические и лечебные аллергены. - М.: Медицина. 1990. С. 52-53.
8. Шепелькова Г.С., Евстифеев В.В., Ант А.С. Исследование молекулярных механизмов патогенеза туберкулёза на экспериментальных моделях // Туберкулез и болезни лёгких. 2012. № 7. С. 3-11.
9. Frank J.T. Griffin, Colin G. Mackintosh, Glenn S. Buchan. Animal models of protective immunity in tuberculosis to evaluate candidate vaccines // Trends in Microbiology. Vol. 3. N 11. November 1995.
10. John B. Kaneene, Charlos O. Thoen. Tuberculosis // Vet. Med. Today: Zoonosis Update. JAVMA. Vol. 224. N 5. March 1. 2004. P. 685-691.
11. OIE Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. - Paris. 2010.

## The study of development of tubercular process on model of guinea pigs infected with mycobacterium with mutated RD-1 region

Y.M. Myasoedov, V.V. Puzanova

The results of this study are shown an estimation of the development of tubercular process on the model of guinea pigs infected mycobacterium submitted to mutations on the RD-1 region. It was established, that the infectious process, based on the hematological parameters, differs from animals infected with *M. bovis* to animals infected with *M. avium*.

**Key words:** guinea pigs, mutant mycobacterium, tuberculin test, hematological analysis.