

Роль трепонем в развитии болезни Мортелларо

Марина КОРЮКИНА

Вологодский филиал ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко

Болезнь Мортелларо — одна из наиболее распространенных патологий копыт крупного рогатого скота, наносящих серьезный экономический ущерб молочному скотоводству (ухудшаются показатели воспроизводства стада и конверсия корма, повышаются затраты на профилактику и лечение, увеличивается доля выбракованных животных). Болезнь Мортелларо широко распространена во всем мире, в том числе в странах Евросоюза. Российские сельхозпроизводители вынуждены закупать скот за границей, что приводит к учащению случаев выявления межпальцевого дерматита (на его долю приходится 14,17±5,15% от общего числа заболеваний копыт). В статье представлены обобщенные результаты научных исследований по патогенезу болезни Мортелларо за последние 20 лет.

В ходе поисковой работы были использованы материалы, опубликованные в Elsevier, ASM Journal, Irish Veterinary Journal, Thieme, American Dairy Science Association, Epidemics, Schweiz Arch Tierheilkd, Journal of Clinical Microbiology, eLIBRARY.RU и Google Scholar. Ориентиром для первоначального отбора служили заголовки и аннотации статей. Систематический поиск в библиографических базах данных позволил изучить статьи, опубликованные в период 2003—2023 г. Всего было отобрано 44 статьи, из которых в данный обзор вошли 33 как максимально релевантные заявленной тематике.

Болезнь Мортелларо известна также как межпальцевый дигитальный дерматит, волосатые бородавки, клубничная гниль, малиновый, или веррукозный дерматит, инфекционный папилломатоз, бородавчатый дерматит, контактный межпальцевый дерматит, папилломатозный межпальцевый дерматит, пролиферативный пододерматит. Это — острое инфекционное и (или) хрониче-

ское язвенное заболевание стоп, вызываемое бактериями. У крупного рогатого скота сопровождается гиперпластическим разрастанием сосочкового слоя основы кожи, чаще на плантарной либо пальмарной поверхности венечного или путового сустава. Эту болезнь впервые в 1974 г. описали итальянские ученые R. Cheli и C. Mortellaro.

Заболевание негативно влияет как на физиологическое состояние животных, так и на рентабельность предприятий. Экономический ущерб обусловлен повышением риска выбраковки заболевших коров, снижением их молочной продуктивности и воспроизводительной способности, а также значительными расходами на лечение, в том числе с применением антибиотиков. Данные исследований свидетельствуют о том, что каждый случай заболевания коров межпальцевым дигитальным дерматитом обходится фермерам в среднем в 133 долл. США из расчета на голову: затраты на лечение составляют 42%, а потери, связанные со снижением фертиль-

ности и молочной продуктивности, — соответственно 31 и 27% (Alsaad M., Locher I., Jores J. et al., 2019; Takci A., Mogulkoc M.N., Sancak T., Kivrak M.B., 2023).

Болезнь Мортелларо широко распространена в странах Евросоюза и Северной и Южной Америки. В России процент заражения скота ежегодно увеличивается, и сегодня на долю межпальцевого дерматита приходится около 15% от общего количества заболеваний копыт (Финогенова А.П., Иванова С.Н., Ермолаев В.А., Терентьева Н.Ю., 2021; Ковалев В.Ю., 2021). Это обусловлено тем, что отечественные сельхозпроизводители приобретают скот западной селекции для совершенствования собственных стад.

В этиологии пальцевого дерматита *Treponema* spp. играет ведущую роль. Результаты гистологического исследования показывают, что в пораженных участках копыт присутствуют трепонемы, проникающие в глубокие слои эпидермиса (Demirkan I., Erdoğan M., Çevik Demirkan A. et al., 2018). Род трепонем относится к семейству *Spirochaetales*. Спирохеты обнаружили еще в 1964 г. в мазках, полученных при разных вариантах проявления копытной гнили у крупного рогатого скота. Впоследствии ученые подтвердили, что эти бактерии вызывают межпальцевый дерматит (Gagarin E.M., Glazunova L.A., Ramikh P.M., Tsyganok V.O., 2021).

Спирохеты — строгие анаэробы. Установлено, что они не выдерживают даже кратковременного воздействия кислорода, требовательны к субстрату

и легко «обрастают» другими микроорганизмами, находящимися в очагах поражения (Pringle M., Bergsten C. et al., 2008). Род *Spirochaetales* включает в себя ряд разных видов, но относительный «вклад» каждого из них (по отдельности или в комбинации) в развитие патологии пока неизвестен. Для выявления возбудителя заболевания применяют метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) и матрично-активированной лазерной десорбции/ионизации (MALDI-TOF).

Виды *Treponema* представляют собой грамотрицательные анаэробные спирохеты, которые очень трудно культивировать. Тем не менее ограниченное число этих микроорганизмов успешно выделили из пораженных копыт коров. Полученные изоляты можно отнести к трем различным филогруппам, представленным видами *Treponema pedis*, *Treponema phagedenis* и *Treponema medium*. Присутствие одного вида *Treponema* или комбинации любых перечисленных видов ассоциировано с клиническими симптомами болезни Мортелларо, что подтверждено результатами нескольких исследований, проводившихся методом ПЦР (Alsaad M., Locher I., Jores J. et al., 2019).

Изоляты *T. pedis*, выделенные в Великобритании, в длину составляли 5–16 мкм, а в ширину — 0,2–0,3 мкм и имели шесть периплазматических жгутиков (по три на каждом конце), изоляты *T. pedis*, выделенные в США, — соответственно 0,23–0,46 мкм и 5,5–13,5 мкм и от 5 до 9 жгутиков на каждом конце. В Турции выделили изоляты, подобные *T. pedis* и *T. phagedenis*. Длина первых варьировала от 5 до 18,2 мкм, ширина — от 0,2 до 0,3 мкм, вторых — соответственно 7–12 и 0,3–0,5 мкм. У *T. pedis* на каждом конце было 4–5 жгутиков, а у *T. phagedenis* — 6–8 (Demirkan I., Erdoğan M., Çevik Demirkan A. et al., 2018).

Типовой штамм *T. phagedenis*, или трепонема Рейтера, выделили из сифилитической язвы человека. Изначально он был патогенен для кроликов, но затем утратил свою вирулентность и сейчас считается непатогенным комменсалом нормальной генитальной флоры человека и других приматов. Бычьи *T. phagedenis*-подобные спирохеты обнаружили только в пораженных конечностях быков. Было установлено, что эти микроорганизмы мигрируют глу-

боко в эпидермис и проникают в шиповатый слой (Trott D.J., Moeller M.R., Zuerner R.L. et al., 2003).

Ученые из Турции проводили исследования по выделению и идентификации микроорганизмов, ассоциированных с пальцевым дерматитом у крупного рогатого скота молочных пород. Образцы биопсии кожи конечностей с типичными клиническими поражениями были собраны на фермах и скотобойнях в пяти разных географических точках страны. Морфологические характеристики и типы жгутикования *Treponema* spp. определяли при помощи просвечивающего электронного микроскопа, а ферментативные профили бактерий — путем применения наборов для активации ферментов. Полученные результаты сопоставили с данными банка генов. Из выделенных и идентифицированных спирохет организмы группы 1 имели близкое сходство с *T. pedis* (99% генетической гомологии), в то время как организмы группы 2 были сходны с *T. phagedenis* (98% генетической гомологии). Это — первое сообщение о *Treponema* spp., выделенных на турецких фермах у зараженных межпальцевым дерматитом коров. Морфотипы оказались аналогичны тем, которые обнаруживают во всем мире в стационарных хозяйствах (Demirkan I., Erdoğan M., Çevik Demirkan A. et al., 2018).

В США изучали генетический фон межпальцевого дерматита, чтобы использовать улучшенную оценку клинического статуса животных в баллах. Специалисты учитывали динамику заболевания, то есть время его перехода из одной стадии в другую. Вновь выявленные признаки подвергли генетическому анализу для определения генетического фона предрасположенности крупного рогатого скота молочных пород к болезни Мортелларо. Было проведено 6444 клинических исследования и получены данные 729 телок голштинской породы из коммерческого стада на ферме в штате Висконсин (США). Общая продолжительность исследования составила 15 месяцев, среднее время наблюдения за одним животным — 175,6 дня. Задние копыта (их регулярно осматривали в специальном желобе) оценивали не менее трех раз за период исследования. На основе данных анализов (материал получили с 12 ферм) был сделан вывод о том, что *Treponema* spp. способна пре-

терпевать морфологические изменения (переход из спиральной в инцистированную форму). Трансформация в инцистированную форму может служить защитным механизмом для трепонем в организме хозяина, потому что за счет образования цисты бактерия получает возможность выжить в неблагоприятных условиях.

Анаэробная среда и температура 37 °С, как, например, в глубоких слоях эпидермиса, — оптимальные условия для перехода *Treponema* spp. в инцистированную форму. По этой причине очень сложно лечить пораженные конечности крупного рогатого скота. Авторы сделали вывод о том, что особое внимание следует уделять переболевшим животным с хронической формой пальцевого дерматита (Schöpke K., Gomez A., Dunbar K.A. et al., 2015).

В Швейцарии стремились усовершенствовать технологию культивирования *T. pedis*, *T. phagedenis* и *T. medium*. Для этого использовали селективный метод. Учитывая подвижность трепонем, применяли фильтрующую мембрану и селективную среду для выделения *Treponema* spp. из сторонней микрофлоры. Спирохеты имеют плохую способность к окрашиванию красителями и их можно увидеть только при правильном направлении света. Темнопольная микроскопия помогла на нескольких этапах процедуры культивирования обнаружить жизнеспособных трепонем. Вид *T. phagedenis* был наиболее многочисленным и легко изолируемым, за ним следовали *T. pedis* и *T. medium*, что согласуется с результатами предыдущих исследований.

Фактически *T. medium* на плотных средах росли медленнее, чем *T. phagedenis* и *T. pedis*. При наличии ассоциации этих микроорганизмов полноценного заживления пораженных стоп не происходило. До сих пор попытки выделить трепонемы из незаживающих ран не увенчались успехом, несмотря на то, что наличие спирохет было подтверждено данными микроскопии. В то же время метод с применением фильтрующей мембраны позволил выделить три чистых изолята непосредственно из раны, что объясняется селективной способностью фильтра, через который проходили подвижные трепонемы, а контаминирующие неподвижные посторонние бактерии задерживались (Brodard I., Alsaad M., Gurtner C. et al., 2021).

В Бернском университете (Швейцария) были проведены аналогичные исследования. Цель — путем использования метода ПЦР определить распространенность трех видов трепонем и *Dichelobacter nodosus* на пораженных участках стопы коров, а также в навозе. Для установления возможности передачи инфекции в окружающую среду взяли образцы навозной жижи на 21 ферме, где у животных диагностировали межпальцевый дерматит, и на одной ферме, свободной от этой патологии. Метод гнездовой ПЦР позволяет обнаружить *Treponema*, а метод ПЦР в реальном времени — *Dichelobacter nodosus*. Положительные результаты — выявление одного или нескольких видов трепонем у здоровых коров — получили соответственно в 50 случаях из 61 (82%) и в 9 из 25 (36%). Мелкоочаговые активные поражения оказались менее распространенными (14,8%), нежели другие стадии межпальцевого дерматита (67,2%, $p = 0,011$). *T. phagedenis* (65,1% клинических очагов) и *D. nodosus* (51,8%) выявили у коров на фермах, где у животных диагностировали межпальцевый дерматит. На фермах, свободных от этой патологии, также обнаружили *T. phagedenis* и *D. nodosus* (24,1% клинических очагов). Что касается проб навозной жижи, то в 3 образцах из 21 (14,3%) выявили один или несколько видов ассоциированных трепонем, а в 11 образцах из 21 (52,4%) — только *D. nodosus* (Alsaad M., Locher I., Jores J. et al., 2019).

Исследования методом секвенирования были проведены и в Великобритании на базе Ливерпульского университета. Ученые изучили образцы кожи с пораженных межпальцевым дерматитом участков стоп инфицированного крупного рогатого скота (51 проба). Было отмечено, что трепонемы группы 1 (*T. medium*/*T. vincentii*-подобные), группы 2 (*T. phagedenis*-подобные) и группы 3 (*T. putidum*/*T. denticola*-подобные) присутствовали соответственно в 96,1; 98 и 76,5% образцах. Все три филогруппы обнаружили в 74,5% образцов.

Анализы, проведенные методом ПЦР, позволили выделить дополнительные штаммы трепонем из ранее смешанных культур, вызвавших первичные поражения копыт. В этом случае представители каждой из трех различных филогрупп трепонем были впервые выделены из одного образца. На основе полученных данных авторы сделали вывод о том, что болезнь Мортелларо вызывают трепоне-

мы, и подтвердили важность определения политрепонемного характера заболевания (Evans N.J., Brown J.M., Demirkan I. et al., 2009).

Методами иммуногистохимии и электронной микроскопии было установлено, что в волосяных фолликулах и сальных железах содержится большое количество трепонем. Это указывает на потенциальный путь выхода патогенов из организма и (или) на способ проникновения в него. В Калифорнийском университете (США) методом секвенирования выделили *T. phagedenis* у больных межпальцевым дерматитом коров (десять проб взяли на ферме в штате Айова). Под микроскопом спирохеты обнаружили во всех образцах, но чистую культуру микроорганизмов выделили только из четырех. Примечательно, что на стадии активного инфицирования со стороны иммунной системы животных регистрируют ярко выраженный клеточный и сывороточный ответ на спирохеты, подобные *T. phagedenis*. Однако такой иммунный ответ носит кратковременный характер и быстро ослабевает, что может свидетельствовать о возможности повторного заражения выздоравливающих коров (Trott D.J., Moeller M.R., Zuerner R.L. et al., 2003).

Помимо описания болезни Мортелларо по клиническим признакам, есть описание заболевания по патоморфологическим и иммуногистохимическим признакам, что позволяет ответить на вопрос: теряются ли межклеточные адгезионные связи при пролиферации клеток? Чтобы ответить на него, срезы образцов тканей, полученных из копыт крупного рогатого скота голштинской ($n = 6$) и швейцарской коричневой ($n = 15$) окрашивали двумя способами — гематоксилином, эозином и методом Вартина — Старри.

Данные гистопатологического исследования показали, что в шиповатом слое количество клеток заметно выросло. Это привело к пальцеобразному расширению дермы. Окрашенные в черный цвет спирохеты обнаружили среди увеличенных кератиноцитов и воспалительных клеток. В клеточных мембранах эпителиальных клеток β -катенин дал положительную реакцию. Ядерный антиген пролиферирующей клетки (PCNA) также показал положительную реакцию умеренно ($n = 18$) и сильно ($n = 3$) в ядрах эпителиальных клеток. Было установлено, что при заболева-

нии межклеточные адгезионные связи β -катенина не нарушаются, а значит, прогноз болезни положительный. Высокая экспрессия PCNA говорит о митотической активности и объясняет образование бородавок (Tunç A.S., Çağatay S., Sağlam M., Kutsal O., 2021).

Российские ученые Д.А. Хузин, Х.Н. Макаев, А.И. Никитин и А.Н. Чернов считают, что в этиологии болезни Мортелларо ведущую роль играют следующие предрасполагающие факторы:

- снижение резистентности организма коров на фоне их несбалансированного кормления;
- нарушение параметров микроклимата в помещениях (повышенная влажность воздуха и сильная загазованность);
- контакты с больными животными;
- неудовлетворительная работа систем навозоудаления;
- пассивный моцион;
- отсутствие регулярных плановых профилактических мероприятий в отношении ортопедических заболеваний.

В первую и во вторую лактации доля животных, больных межпальцевым дерматитом, увеличивается. Данные зоотехнического анализа кормов показали, что в рационах для дойных коров содержание сухого вещества, переваримого протеина, сырой клетчатки, кальция, фосфора, каротина и витамина D не соответствовало норме. Было сделано предположение о том, что избыток крахмала и магния — вероятная причина развития межпальцевого дерматита у крупного рогатого скота (Финогенова А.П., Иванова С.Н., Ермолаев В.А., Терентьева Н.Ю., 2021).

Исследователи K. Klitgaard, M.W. Nielsen, H.-C. Ingerslev, M. Boye и T. Jensen (Национальный ветеринарный институт Датского технического университета) искали доказательства того, что находящиеся в окружающей среде трепонемы могут поражать здоровый скот. Согласно теории, межпальцевый дерматит развивается при содержании поголовья на полу, покрытом навозной жижей. Как же тогда болезнь Мортелларо передается внутри стада, а также между стадами? Используя специфические для трепонем праймеры, ученые идентифицировали ДНК из ассоциированных трепонем в образцах навозной жижи и коровьих фекалий (43 пробы из 64), собранных в шести географиче-

ских регионах страны. Виды, относящиеся к *T. denticola*/*T. pedis* и *T. phagedenis*, оказались наиболее распространенными среди трепонем, поражающих конечности животных на фермах.

Глобальные бактериальные исследования свидетельствуют о том, что в желудочно-кишечном тракте крупного рогатого скота есть несколько фило-типов трепонем, в том числе *T. bryanii* и *T. saccharophilum*, ранее выделенные из рубца коров. Эти микроорганизмы филогенетически существенно отличаются от трепонем, вызывающих межпальцевый дерматит. До сих пор из фекалий не смогли выделить ни одной бактерии, ассоциированной с пальцевым дерматитом. На основе полученных данных ученые Национального ветеринарного института Датского технического университета доказали, что трепонемы вида *T. denticola*/*T. pedis* и *T. phagedenis* не являются частью нормальной микробиоты желудочно-кишечного тракта крупного рогатого скота.

Очевидно, высокопроизводительное секвенирование гена 16S рПНК может быть достаточно чувствительным для обнаружения низких уровней спирохет в сложной загрязненной среде. В ходе анализов выявили и идентифицировали 12 разных вариантов. В образцах кожи и тканей коров, пораженных межпальцевым дерматитом, обнаружили спирохеты из группы *T. denticola*/*T. pedis*, *T. phagedenis*, *T. refringens* и *T. medium*/*T. vincentii* (Klitgaard K., Nielsen M.W., Ingerslev H.-C., Boye M., Jensen T., 2014).

Для подтверждения заболевания овец болезнью Мортелларо были проведены исследования на двух овцеводческих фермах, расположенных в низинах в разных регионах. На каждой из

них у животных диагностировали хромоту. Угольными анаэробными тампонами взяли пробы от десяти помесных овец с острым поражением венечного пучка. Образцы мазков извлекали из очагов поражения в месте соединения кожи с копытным рогом и немедленно доставляли в лабораторию.

Смешанные культуры спирохет типировали методом ПЦР для выявления таких ассоциаций, как *T. medium*/*T. vincentii*-like, *T. denticola*/*T. putidum*-подобные и *T. phagedenis*-подобные. Данные исследования показали, что все изучаемые культуры спирохет относились к роду *Treponema*. Два образца из семи представляли собой чистые культуры *T. phagedenis*-подобных и *T. medium*/*T. vincentii*-подобных микроорганизмов (Sayers G., Marques P.X., Evans N.J. et al., 2009).

Несмотря на то что в научной литературе опубликованы результаты многочисленных исследований, патогенез межпальцевого дерматита остается спорным. Ученые из Калифорнии (США) методом секвенирования гена 16S рПНК определили структуру и функции микробиома здоровых и больных животных. Было установлено, что болезнь Мортелларо — полимикробное заболевание и в его патогенезе *Treponema* spp., а именно *T. denticola*, *T. maltophilum*, *T. medium*, *T. putidum*, *T. phagedenis* и *T. paraluisuniculi* играют ведущую роль. Все эти виды, кроме одного, обнаружили в рубце и фекалиях жвачных животных. Специалисты сделали вывод о том, что кишечник может служить резервуаром для микробов, участвующих в патогенезе межпальцевого дерматита (Zinicola M., Lima F., Lima S. et al., 2015).

В Турции проводили исследование по изучению роли тучных клеток (тканевые

клетки миелоидного ряда, содержащие в цитоплазме базофильные гранулы с гистамином и гепарином) в патогенезе болезни Мортелларо. Образцы кожи крупного рогатого скота голштинско-фризской породы (25 проб от здоровых особей и 25 проб от животных со специфическими поражениями) были получены на бойнях в г. Бурсе. В ходе анализа сравнивали интактные и дегранулированные тучные клетки, а также определяли иммунофенотипы тучных клеток здоровых коров и аналогов с папилломатозными поражениями стоп.

В образцах, полученных от больных межпальцевым дерматитом животных, оказалось больше интактных и дегранулированных тучных клеток, чем в пробах, взятых у здоровых особей, соответственно в 2,02 и 4,2 раза. Это убедительно свидетельствует о том, что тучные клетки могут играть важную роль в патогенезе межпальцевого дерматита. Во всех изучаемых образцах объем фиброзной ткани превышал норму, а кератиноциты претерпели акантозные изменения (Ozguden-Akkoc C.G., Akkoc A., 2023).

Сам Карл-Мария Мортелларо сомневается в этиологии заболевания и задает вопросы: почему межпальцевый дерматит развивается при наличии нескольких видов трепонем, а не одного, и какую роль играют представители *Mycoplasma*, *Porphyromonas* и другие бактерии в патогенезе этого заболевания. Наука не стоит на месте. Во всем мире ученые проводят исследования, на основе полученных данных разрабатывают эффективные методы диагностики, профилактики и лечения болезни, а значит, в скором времени на все вопросы будут получены исчерпывающие ответы.

ЖР

Вологодская область

**Чтобы дойти до цели,
надо прежде всего идти.**

Оноре де Бальзак

