УДК 619:616.579.873.211

**Новик Т.П.,** ассистент кафедры биологии
УО «Белорусский государственный медицинский университет»
**Лысенко А.П.,** доктор ветеринарных наук, профессор
**Лемиш А.П.,** кандидат ветеринарных наук
**Архипов И.Н.,** младший научный сотрудник
РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»
**Притыченко А.Н.,** кандидат ветеринарных наук, доцент
УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины»
**Власенко В.В.,** доктор ветеринарных наук, профессор
**Власенко И.Г.**
Винницкий аграрный университет

# БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТОВ ТУБЕРКУЛИНОВ, ПРИГОТОВЛЕННЫХ РАЗНЫМИ МЕТОДАМИ

*Аллергическая активность ППД ВКГ, приготовленного из измененных форм МБТ, оказалась существенно ниже (более чем в 3,5 раза), чем у ППД туберкулина из бактериальной формы возбудителя. Различия в диагностической ценности обычного ППД туберкулина и приготовленного из искусственно L-трансформированных МБТ были отмечены ранее [8], но они не были столь существенными и зависели от того, была ли у животных активная или латентная туберкулезная инфекция.*

*При сопоставлении активности ТО и СТО в кожном тесте и в ИФА, несмотря на равное содержание туберкулопротеинов в препаратах, полная стерилизация ТО на 33-60% снижала аллергическую, но несколько повышала серологическую активность СТО. Известно, аллергическая активность туберкулинов не снижается при автоклавировании, в то время как серологическая активность уменьшается [4]. Следовательно, можно предположить, что какая-то часть аллергической активности связана не с аллергеноактивными веществами (туберкулопротеинами), а с присутствием в туберкулине жизнеспособных форм микобактерий.*

*Allergic activity of PPD VKG, prepared from the changed forms of MBT, appeared substantially below (more than in 3,5 time), than at PPD of tuberculin from the bacterial form of exciter. Distinctions in the diagnostik value of the ordinary PPD tuberculin and prepared from artificially L-transformation MBT were marked before [8], but they were not so substantial and depended on that, whether animals had an active or latent tubercular infection..*

*At comparison of activity TC and STC in a skin test and in IFA, on equal maintenance of tuberculins in preparations, complete sterilization TC on 33-60% reduced allergic, but some promoted serological activity STC. It is known, allergic activity of tuberkulins does not go down at autoclaved of tuberkulinoproteiny, while serological activity diminishes [4]. Consequently, it is possible to suppose that part of allergic activity is related not to allergic matters, and with being in the tuberculin of low ability forms of mikobakterium.*

Более ста лет для диагностики туберкулеза у человека и животных применяют туберкулин. Важным этапом его приготовления является автоклавирование для инактивации патогенного штамма продуцента при температуре 121 °С 30-60 мин. В последнее время появились сообщения о том, что из туберкулинов удается выделять жизнеспособные, измененные формы микобактерий туберкулеза (МБТ) [1,5]. В препаратах туберкулинов обнаружены светопреломляющие некислотоустойчивые зерна и другие морфологические формы, которые, вероятно, терморезистентны и содержат жизнеспособные элементы МБТ [6,7].

Изоляты из туберкулинов, полученные с использованием стимулятора роста и питательной среды ВКГ [1], скорее всего можно рассматривать, как CWDB (cell wall-deficient/defective bacteria, труднокультивируемые бактерии с отсутствующей или дефектной клеточной стенкой) [2], которые вырастают при активации терморези-

стентных структур МБТ. Они не обладают выраженной патогенностью, но способны персистировать в организме морских свинок [ ]. Восстановление CWDB МБТ удалось зарегистрировать не только на среде ВКГ [ ], но и у животных после введения туберкулина в диагностической дозе. Значение этих фактов трудно оценить без изучения феноменов, возникающих после введения туберкулина, с точки зрения наличия в препарате жизнеспособных структур. Кроме того, важной задачей становится разработка методов получения полностью стерильного диагностикума.

Целью исследований явилось изучение аллергической и антигенной активности образцов туберкулинов, приготовленных разными методами, содержащих жизнеспособные формы МБТ и с максимальной степенью инактивации.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали:

- стандартный раствор ППД туберкулина для млекопитающих Курской биофабрики серии 11 (50000МЕ/мл);
- ППД туберкулин для млекопитающих, приготовленный из измененных форм M.bovis 8, выращенных на питательной среде ВКГ (ППД ВКГ);
- туберкулин очищенный (ТО) для млекопитающих УП «Витебская биофабрика» серии 28 (50000МЕ/мл);
- туберкулин очищенный для млекопитающих УП «Витебская биофабрика» серии 28, подвергнутый специальной обработке для полной инактивации жизнеспособных форм МБТ (СТО).

Для получения ППД туберкулина из измененных форм M.bovis 8 (ППД ВКГ), бактериальную массу M.bovis 8 суспендировали в стимуляторе роста ВКГ, инкубировали 24 ч при 37$^0$С и высевали на питательную среду ВКГ (*HANSA*, Украина), разлитую в вирусологические матрасы. Посевы инкубировали при 37$^0$С 5 суток. Выросшую культуру смывали стерильным изотоническим раствором и отмывали центрифугированием при 3000g. Осадок ресуспендировали в изотоническом растворе и автоклавировали 30 мин при 121$^0$С. Автоклавированную суспензию дезинтегрировали на УЗДН 1 при 15 кгц, 20 мин. Дезинтеграт подвергали грубой и стерилизующей фильтрации. Протеины осаждали 7% ТХУ и переосаждали сульфатом аммония при 70% насыщении, осадок растворяли в 0,9% растворе хлорида натрия и диализировали против этого раствора. Содержание туберкулопротеинов в образцах определяли по Bredford (1972) и доводили до 1 мг/мл.

Для выявления жизнеспособных форм в туберкулинах готовили мазки препаратов, которые окрашивали по Циль-Нильсену, кроме того, туберкулины смешивали со стимулятором роста ВКГ (1:1), 24 ч. инкубировали при 37 °С и по 700 мкл высевали на свежеприготовленную среду ВКГ. Посевы инкубировали при 37 °С 5 суток, из выросших колоний делали мазки для окраски по Циль-Нильсену. Микроскопию и фиксацию результатов проводили на цифровом микроскопе «Olimpus» BX-51.

Аллергическую активность туберкулинов изучили на 24 морских свинках весом 450-550 г, инфицированных M.bovis 8. Для заражения культуру M.bovis 8, выращенную на среде Гельберга суспендировали в стерильном 0,9% растворе хлорида натрия. Суспензию довели до гомогенного состояния центрифугированием при 500 об/мин 5 мин и вводили животным внутримышечно по 0,1 мг. При таком способе заражения у животных развивалась латентная инфекция с хорошо выраженной гиперчувствительностью к туберкулину. Контролем служили 5 клинически здоровых морских свинки.

Для изучения антигенной активности и видовой специфичности туберкулинов использовали непрямой вариант иммуноферментного анализа (ИФА). В лунках иммунологических панелей Sarstedt сорбировали образцы туберкулинов (10мкг\мл). В оди-

наковых условиях (на одной панели) они испытывались с нормальной сывороткой крови барана (К-) и с бараньими антисыворотками к смеси соникатов 7 видов нетуберкулезных микобактерий (НТМБ) и к соникату M.bovis Vallee (1:100-1:1280). Непрямой вариант ИФА ставили общепринятым способом с использованием конъюгата кроличьих IgG к IgG барана (НИИ им. Гамалеи) и субстрата ТМБ (IDEXX), результаты учитывали при 450 нм.

Для каждого туберкулина, разведения и вида антисыворотки рассчитывали превышение оптической плотности (ΔОП) антисыворотки относительно ОП нормальной сыворотки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Установлено, что при посеве на среду ВКГ образцы ППД туберкулина для млекопитающих Курской биофабрики, ППД ВКГ и ТО дали характерный рост «парафиновых» колоний и микроколоний, кокковых, шаровидных форм, а также палочек, в том числе, имевших рубиново-красную окраску по Циль-Нильсену (рис.1).

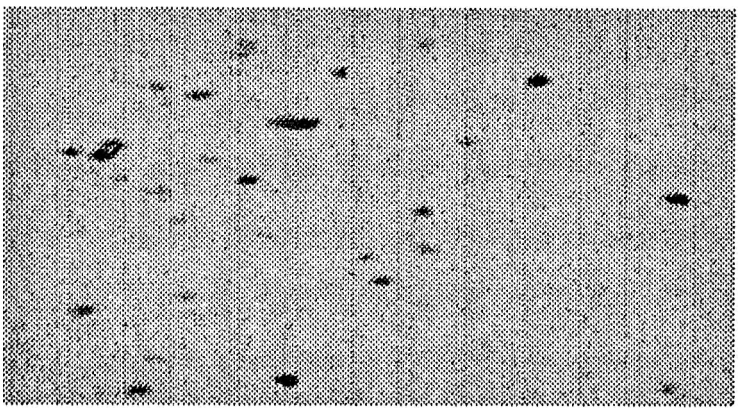

**Рисунок 1 — Микроскопия мазков колоний посевов ТО на среду ВКГ. Окраска по Циль-Нильсену. Слева вверх от центра мазка рубиново-красная палочка**

При микроскопии мазков СТО видимых форм МБТ не обнаружено. Посев препарата на среду ВКГ дал отрицательный результат.

Аллергическую активность ППД ВКГ изучили в сравнении с ППД серии №11 Курской биофабрики, который вводили внутрикожно по 100 и 10 МЕ\0,2мл. ППД ВКГ вводили в эквивалентных разведениях по 0,2 мл. Результаты испытаний представлены в таблице 1.

Исходя из данных, приведенных в таблице 1, при расчете методом прямой пропорции, активность ППД ВКГ составила (72:256) x50000МЕ/см$^3$ = 14100 МЕ/см$^3$, что в 3,5 раза ниже, чем у ППД туберкулина из бактериальной формы МБТ, приготовленного по традиционной технологии.

При оценке по зависимости эффекта от логарифма дозы различия в активности сравниваемых туберкулинов были существеннее, и не поддавались корректному расчету (рис.1).

Таблица 1-Диаметр папул у морских свинок, зараженных M.bovis через 24 часа после введения туберкулинов

| Морские свинки n=10 | Диаметр папул в мм | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ППД серии 11 | | ППД ВКГ | |
| | 100 МЕ | 10 МЕ | 1-ое разведение | 2-ое разведение |
| M±m | 14,6±0,7 | 11,0±0,5 | 4,3±0,18 | 2,9±0,12 |
| Сумма диаметров | 256 | | 72 | |

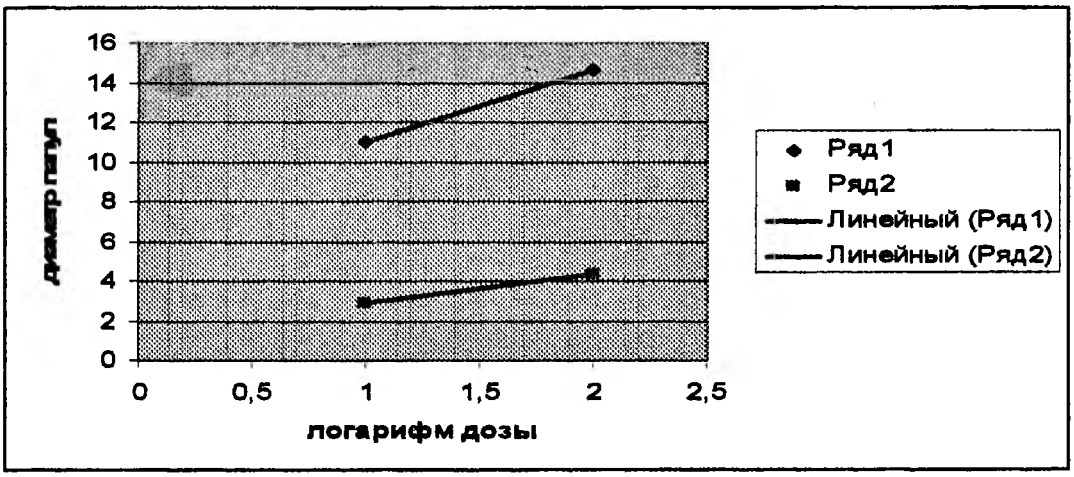


**Рисунок 2 — Зависимость эффекта от логарифма дозы сравниваемых туберкулинов**

Примечания: Нижняя линия – прямая активности ППД ВКГ, верхняя линия –ППД туберкулина Курской биофабрики

Аллергическую активность ТО и СТО сравнили на 14 морских свинках зараженных M.bovis (табл. 2).

Таблица 2 - Сравнение аллергической активности ТО и СТО на морских свинках, зараженных M.bovis

| Морские свинки | Диаметр папул в мм на введение разведений туберкулинов | | | |
|---|---|---|---|---|
| n=14 | ТО 1:200 | ТО 1:500 | СТО 1:200 | СТО 1:500 |
| M= | 14,9±0,37 | 12,4±0,3 | 12,1±0,3 | 9,5±0,22 |
| Сумма диаметров | 382,5 | | 302 | |

При расчете методом прямой пропорции активность СТО относительно ТО составила (302:382,5) x 50000МЕ/см$^3$ = 33500 МЕ/см$^3$, т.е. после полной инактивации она снижалась у СТО, как минимум, на 33%.

На рисунке 2 по данным таблицы 2 представлена зависимость интенсивности аллергических реакций на ТО и СТО от логарифма дозы. Как видно, линии активности располагались параллельно друг другу на расстоянии 0,4 lg. Антилогарифм 0,4 =2,51, следовательно, активность СТО в 2,51 раза (на 60,1%) меньше, чем у исходного препарата (50000 МЕ/см$^3$ : 2,51=19920 МЕ/см$^3$).

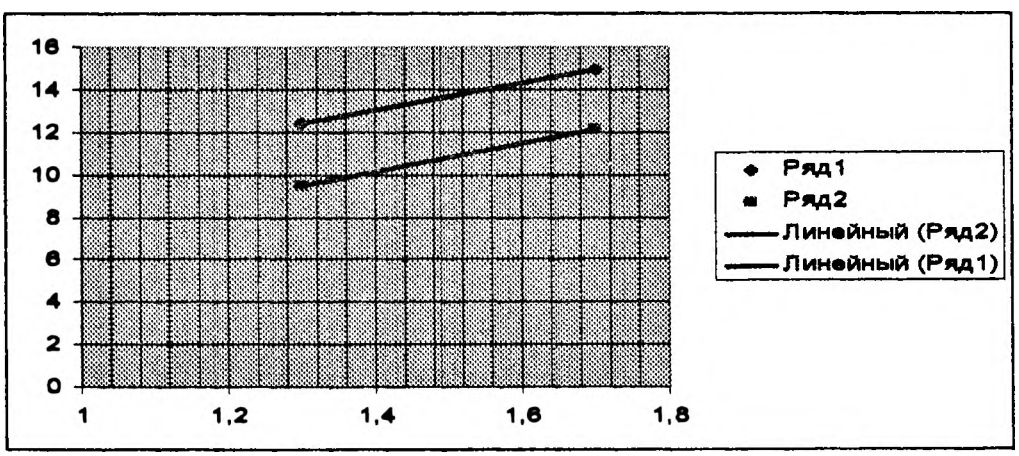


**Рисунок 3— Зависимость интенсивности реакций на ТО (верхняя линия) и на СТО от логарифма их дозы у морских свинок, зараженных M.bovis**

При исследовании антигенной активности туберкулинов в ИФА (табл. 3, рис.3,4) установлено, что ППД ВКГ достаточно интенсивно реагировал с антисывороткой M.bovis, хотя заметно слабее, чем туберкулины из бактериальной формы МБТ (титры соответственно 1:800 и 1:3200-1:12800).

Активность ТО и СТО была выше (титры 1:12800), чем у ППД туберкулина, причем реакции с антисывороткой M.bovis у СТО были интенсивнее, чем у ТО (табл. 3, рис.3).

Показатели ИФА с антисывороткой к антигенам НТМБ характеризовали концентрацию общеродовых антигенов в туберкулинах (табл. 3, рис.4). Оказалось, что наименьшая перекрестная активность была у ППД ВКГ (1:100). У ППД туберкулина Курской биофабрики (из бактериальной формы МБТ), перекрестные реакции наблюдались при разведении антисыворотки к НТМБ до 1:800, включительно.

Перекрестная активность у ТО наблюдалась до разведения 1:3200. У СТО она была выше на одно разведение (1:6400).

Индекс специфической активности (отношение суммы показателей ОП с разведениями антисыворотки M.bovis к такому показателю с разведениями антисыворотки к НТМБ) был, примерно, одинаковым у всех исследованных туберкулинов-1,6-1,7.

Перекрестная активность у ТО наблюдалась до разведения 1:3200. У СТО она была выше на одно разведение (1:6400).

Индекс специфической активности (отношение суммы показателей ОП с разведениями антисыворотки M.bovis к такому показателю с разведениями антисыворотки к НТМБ) был, примерно, одинаковым у всех исследованных туберкулинов-1,6-1,7.

Таблица 3 - Превышение оптической плотности в ИФА туберкулинов с антисыворотками к НТМБ и M.bovis в сравнении с нормальной сывороткой крови барана

| Разведения антисывороток | ППД сер. 11 | | ППД ВКГ | | ТО | | СТО | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | а.с. НТМБ | а.с. M.bovis | а.с. НТМБ | а.с. M.bovis | а.с. НТМБ | а.с. M.bovis | а.с. НТМБ | а.с. M.bovis |
| 1:100 | 2,6 | 4,9 | 2,8 | 5,6 | 4,2 | 8,1 | 4,8 | 8,0 |
| 1:200 | 3,7 | 7,9 | 1,9 | 3,6 | 4,3 | 7,5 | 4,6 | 9,1 |
| 1:400 | 2,7 | 4,7 | 1,8 | 3,7 | 4,3 | 8,6 | 4,6 | 8,7 |
| 1:800 | 2,1 | 2,7 | 1,5 | 2,6 | 3,6 | 4,6 | 5,0 | 7,5 |
| 1:1600 | 1,7 | 3,0 | 1,2 | 1,4 | 3,1 | 4,0 | 3,0 | 5,3 |
| 1:3200 | 1,1 | 2,0 | 1,2 | 1,7 | 2,6 | 3,5 | 2,1 | 3,3 |
| 1:6400 | 1,1 | 1,1 | 1,4 | 1,6 | 1,7 | 2,3 | 2,2 | 3,7 |
| 1:12800 | 1,1 | 1,7 | 1,1 | 1,4 | 1,9 | 2,2 | 1,6 | 2,3 |
| D= | 18,1 | 28,0 | 12,9 | 21,6 | 25,7 | 25,7 | 27,9 | 47,9 |
| ИСА | 1,6 | | 1,6 | | 1,6 | | 1,7 | |

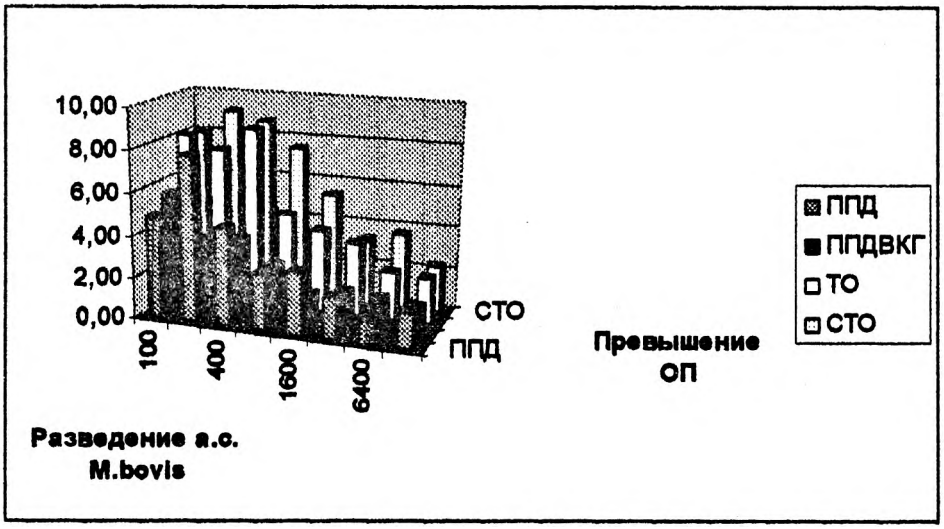


**Рисунок 4 — Показатели превышения ОП в сравнении с К- в ИФА ППД туберкулина Курской биофабрики, ППД ВКГ, ТО и СТО с разведениями антисыворотки M.bovis**

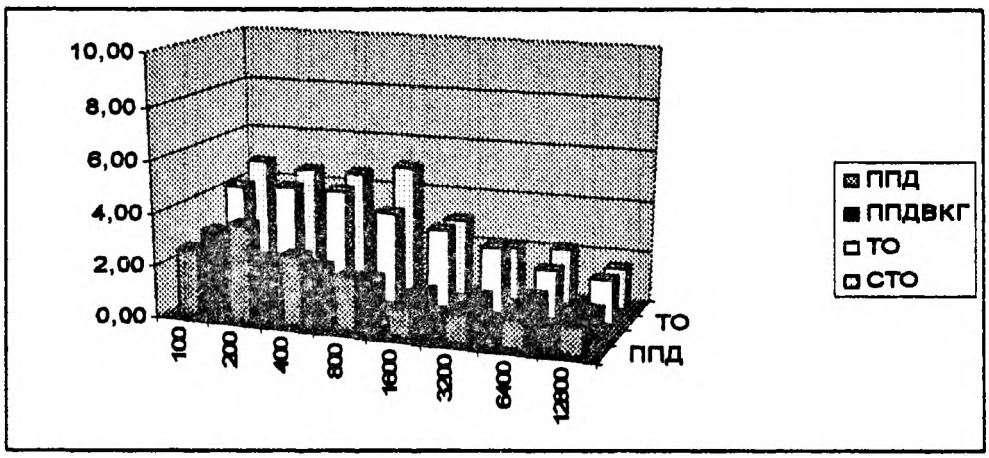


**Рисунок 5 — Показатели превышения ОП в сравнении с К- в ИФА ППД туберкулина Курской биофабрики, ППД ВКГ, ТО и СТО с разведениями антисыворотки к НТМБ**

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Аллергическая активность ППД ВКГ, приготовленного из измененных форм МБТ, оказалась существенно ниже (более чем в 3,5 раза), чем у ППД туберкулина из бактериальной формы возбудителя. Различия в диагностической ценности обычного ППД туберкулина и приготовленного из искусственно L-трансформированных МБТ были отмечены ранее [8], но они не были столь существенными и зависели от того, была ли у животных активная или латентная туберкулезная инфекция.

Объяснение низкой аллергической активности ППД туберкулина из измененных форм МБТ представляет определенные трудности, так как серологическая активность этих препаратов в ИФА отличалась не столь разительно. С небольшими разведениями антисыворотки M. bovis (1:100-1:800) интенсивность реакций была вполне сопоставима. Это указывает на достаточно близкий набор специфических антигенов в ППД ВКГ и в обычном ППД туберкулине, хотя и в меньшей концентрации.

Необходимо отметить, что ППД ВКГ содержал гораздо меньше общеродовых антигенов (судя по титрам с антисывороткой к НТМБ, в 4 раза), чем ППД из бактериальной формы МБТ. Известно, что в антигенном составе ППД туберкулина превалируют антигены, в той или иной степени, ассоциирующиеся с клеточной стенкой (d-арабино-d-маннан, d-арабино-d-галактан, 60, 89) Именно эти антигены обладают выраженной аллергической активностью [3,4,9]. Вероятно, более низкая аллергическая активность ППД ВКГ связана с отсутствием синтеза полноценной клеточной стенки у измененных форм МБТ и, следовательно, аллергеноактивных антигенов.

Достаточно парадоксальные результаты были получены при сопоставлении активности ТО и СТО в кожном тесте и в ИФА. Несмотря на равное содержание туберкулопротеинов в препаратах, полная стерилизация ТО на 33-60% снижала аллергическую, но несколько повышала серологическую активность СТО. Известно, аллергическая активность туберкулинов не снижается при автоклавировании, в то время как серологическая активность уменьшается [4]. Следовательно, можно предположить, что какая-то часть аллергической активности связана не с аллергеноактивными веществами (туберкулопротеинами), а с присутствием в туберкулине жизнеспособных форм микобактерий.

## ВЫВОДЫ

1. ППД туберкулин, приготовленный из измененных (адаптивных) форм M.bovis, выращенных на питательной среде ВКГ, имеет достоверно более низкую аллергическую активность (более чем в 3,5 раза меньше), чем ППД туберкулин из бактериальной формы микобактерий туберкулеза.

2. Полная инактивация туберкулина, приготовленного из бактериальной формы микобактерий туберкулеза, приводит к 33-60% потере аллергической активности, несмотря на сохранение исходной концентрации туберкулопротеинов и антигенов, реагирующих со специфическими антителами в иммуноферментном анализе.

Способность микобактерий туберкулеза образовывать формы, устойчивые к действию высокой температуры, вызывает необходимость разработки новых подходов к процессу инактивации патогенных штаммов, используемых при изготовлении туберкулинов.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Власенко В.В. Туберкулез в фокусе проблем современности // Винница: Наука, 1998.- 350 с.

2. Елисеева И.В., Бабич Е.М., Волянский Ю.Л., Скляр Н.И., Белозерский В.И. Роль латентных, труднокультивируемых и некультивруемых персистентных бактерий в патологии человека // Аналы Мечниковского Института (Институт микробиологии и иммунологии им. И.И.Мечникова АМН Украины).- 2006.- N 1.

3. Лысенко А.П. Антигенный состав ППД туберкулина для млекопитающих // Ветеринария.-1989.-№5.- с.32-34

4. Лысенко А.П. Антигены Mycobacterium bovis и атипичных микобактерий, изучение и применение для дифференциальной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота: Автореф. дисс.... докт. вет. наук. - Минск.-1994.- 35С.

5. Лысенко А.П., Лемиш А.П.. Красникова Е.Л., Архипов И.Н., Власенко В.В.,. Власенко И.Г., Garbaccio S., Васильев А.Н., .Петрик О.А, Сапсай В.И., Васильева И.Г., Притыченко А.Н., Рубникович Т.П. Изучение термической устойчивости микобактерий туберкулеза // Проблемы туберкулеза и болезней легких. -2007. - №2 .- с.42-46

6. Лысенко А.П., Лемиш А.П., Т.П. Новик, Архипов И.Н., Притыченко А.Н., Власенко И.Г. Выявление адаптивных форм микобактерий в туберкулинах // Современные проблемы инфекционной патологии человека. Сборник научных трудов.- Выпуск 1.- Минск.-«Белпринт».-2008.- с.227-230.

7. Николаева Г.М., Дорожкова И.Р. Морфология измененных форм микобактерий туберкулеза // Проблемы туберкулеза .-1988.-№4.-с.57-59.

8. Сырым Н.С. Аллерген из Л-форм микобактерий бычьего вида для диагностики скрытой формы туберкулеза: Автореф. дисс. ... канд. вет. наук.- Алматы.- 2004.- 19 С.

9. Harboe M. Antigens of old tuberculin and autoclaved Mycobacterium bovis BCG// Amer.Rev.Resp.Dis.-1984.-124.-1.- p.124-127.