

ИНФЕКЦИОННЫЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

УДК 619:576.8.078:616-025

ЛЫСЕНКО А.П., доктор ветеринарных наук, РНИУП "ИЭВ им. С.Н. Вышелесского НАНБ"

**ВЛАСЕНКО В.В., доктор биологических наук, профессор,
Винницкий государственный аграрный университет,**

АГЕЕВА Т.Н., кандидат ветеринарных наук,

КРАСНИКОВА Е.Л., научный сотрудник,

ПОЛОЗ А.И., научный сотрудник,

РУМАЧИК И.И., доктор ветеринарных наук, РНИУП "ИЭВ им. С.Н. Вышелесского НАНБ",

ХОЛОД А.А., кандидат ветеринарных наук ГУ "Белгосветцентр",

ПРИТЫЧЕНКО А.Н., кандидат ветеринарных наук, Витебская госакадемия ветеринарной медицины,

ЯКОВЛЕВА Л.Ф., кандидат медицинских наук, ГУ "НИИ санитарии и гигиены МЗ РБ"

СТИМУЛЯТОР РОСТА И СРЕДА ВКГ ДЛЯ УСКОРЕННОГО ВЫДЕЛЕНИЯ МИКОБАКТЕРИЙ, КУЛЬТУРАЛЬНЫЕ, ПАТОГЕННЫЕ И АНТИГЕННЫЕ СВОЙСТВА ИЗОЛИРУЕМЫХ КУЛЬТУР

Существующие методы бактериологической диагностики туберкулеза с использованием твердых яичных сред сложились в начале 20-го века и были ориентированы на выявление достаточно тяжелых форм болезни.

Успехи в борьбе с туберкулезом привели к тому, что туберкулез протекает преимущественно как латентная инфекция, при которой защитные факторы макроорганизма сдерживают размножение возбудителя. При этом одним из способов длительной персистенции возбудителя является временная или постоянная потеря способности синтеза пептидогликанового скелета и образование L-форм (Земскова З.С., Дорожкова И. Р., 1984). Для L-форм характерны резко измененная морфология и пониженный метаболизм. Они неустойчивы во внешней среде и имеют низкую вирулентность (Дорожкова И.Р., 1974; Мусин А.Ж., 1985; Гертман М.И., 1988).

Менее изучены другие морфологические формы возбудителя туберкулеза, в том числе фильтрующиеся формы и их промежуточные стадии. По данным В.В.Власенко (1998), из фильтрующихся форм могут образовываться шаро-, грушеподобные формы, амёбоподобные и другие морфологические образования, способные при определенных условиях трансформироваться в классические палочки и вызывать клинические формы болезни. Нельзя исключить и возможности одновременного нахождения в организме разных морфологических форм возбудителя.

К сожалению, с помощью обычных питательных сред не удается обнаружить небольшие количества возбудителя, а также его трансформированные формы со сниженной жизнеспособностью и ферментативной активностью (В.В.Власенко, 1998). Это приводит к тому, что, несмотря на многократные бактериологические исследования патматериала, не удается выявить действительную причину реакций на туберкулин и объективно оценить и прогнозировать эпизоотическую ситуацию по туберкулезу. Как следствие этого — боязнь возникновения болезней и убой реагирующих на туберкулин коров.

В последнее время разработана оригинальная среда ВКГ и стимулятор роста для ускоренного выделения возбудителя туберкулеза (патент Украины №43467 от 17.12.2001, Власенко В.В., Багрий П.И). Сообщается, что с помощью указанной питательной среды, даже из олигобациллярного материала, удается в течение 2—4 суток выделить возбудитель туберкулеза, в том числе его трансформированные формы (В.В.Власенко, 1998). Учитывая,

что питательная среда ВКГ используется для диагностики туберкулеза у человека в Украине, целью работы было изучение диагностической ценности среды ВКГ в ветеринарной практике и исследование морфологических, культуральных, патогенных и антигенных свойств полученных изолятов.

Материалы и методы исследований

В работе использовали эталонные штаммы M.tuberculosis Academia, M.bovis БЦЖ, M.bovis 8, M.terrae 17522 ATCC, M.fortuitum 342, лимфатические узлы коров, больных туберкулезом, кровь морских свинок, зараженных M.bovis 8 (выращенным на среде Левенштейна-Иенсена и на ВКГ, по 1 мг подкожно).

Культуры, гомогенаты лимфатических узлов, кровь стерильно смешивали со стимулятором роста (221/00-3002 00 000): 5 мл стимулятора на каждые 5 мл суспензии или на 5—10 мг культуры. Смеси инкубировали 48 ч в термостате (37°C) и высевали на свежеприготовленную среду ВКГ, разлитую по 15 мл в чашки Петри (1,5 мл) или по 5 мл в пробирки (0,4 мл). Чашки и пробирки с посевами заклеивали скотчем и помещали в термостат (37°C).

С посевов делали мазки, которые окрашивали фуксином (1:5), по Цилю-Нильсену или обрабатывали для иммунолюминесценции кроличьей моноспецифической антисывороткой M.bovis или антителами, выделенными методом аффинной хроматографии на сефарозном иммуносорбенте из бычьей антисыворотки M.bovis с последующей инкубацией с антивидовыми ФИТЦ-конъюгатами (Sigma).

Изолированные культуры проверяли в пластинчатой реакции агглютинации на стеклах с бычьими антисыворотками к M.bovis и к смеси антигенов атипичных микобактерий.

Для исследования в ИФА суспензии изолятов в 0,9% растворе хлорида натрия несколько раз замораживали и оттаивали, разводили 1:10 в карбонат-бикарбонатном буфере pH 9,3 и наносили на иммунологические панели Sarstedt. Для непрямого варианта ИФА использовали бычью и кроличью антисыворотки, полученные на бациллярные антигены возбудителя туберкулеза и атипичных микобактерий (А.П.Лысенко, 1994). Реакцию ставили общепринятым методом с использованием антивидовых пероксидазных конъюгатов (Sigma).

Контролем при проведении иммунохимических тестов служила отрицательная сыворотка крупного рогатого скота для РСК Курской биофабрики и нормальная сыворотка крови кролика.

Результаты исследования

В таблице 1 суммированы результаты наблюдения за посевами на среде ВКГ и результаты микроскопии мазков. Установлено, что рост эталонных культур на среде ВКГ во всех случаях регистрировался через 24–48 ч в виде росинчатых колоний. В мазках обнаруживались ветвящиеся и шарообразные структуры, полиморфные палочки и кокки, не окрашивавшиеся по Цилю-Нильсену, очень редко встречались бациллярные формы рубиново-красного цвета (рис.1).

Рис. 1

M.bovis 8, рост на среде ВКГ, окраска по Цилю-Нильсену (90x7)



Среда ВКГ, изолят из крови морской свинки, зараженной M.bovis 8, окраска по Цилю-Нильсену (90x7)

Рис. 2



При посеве гомогенатов лимфатических узлов коров, больных туберкулезом, колонии появлялись на 2–3-и сутки в виде восковидного сплошного налета. Причем как из лимфатических узлов с макроскопическими изменениями, так и из неизмененных. В мазках обнаруживали такие же морфологические элементы, что и при посеве эталонных культур на среду ВКГ. Особенно интересны результаты, полученные на морских свинках, зараженных бациллярной формой M.bovis 8 и бакмассой этого штамма, выращенной на среде ВКГ. Оказалось, что слабо вирулентный штамм M.bovis 8 как в бациллярной, так и в трансформированной форме не вызвал образования макроскопических туберкулезных изменений. После 48 ч. обработ-

Таблица 1

Результаты микроскопии посевов на среде ВКГ

Наименование препарата	Результаты микроскопии		
	Окраска фуксином	По Цилю-Нильсену	Моноспецифическая а/с M.bovis, очищенные Ig M. bovis
Вакцина БЦЖ	Полиморфные палочки, кокки, ветвящиеся структуры с шарообразными включениями, шаровидные клетки, часто тетракокки	Синие полиморфные палочки и кокки, при длительном культивировании с примесью рубиново-красных палочек	Зеленые ветвящиеся нитевидные структуры, напоминающие тонкий бамбук с шариками в местах сочленения. Зеленоватые шары с ярко-зелеными точечными включениями, зеленые палочки
M.bovis 8	Некрупные шары, обширные участки зернистой массы, полиморфные палочки, дипло- и тетракокки	Синие полиморфные палочки и кокки, редко удлинённые рубиново-красные палочки при длительном культивировании	Зеленые палочки, часто сегментированные, конгломераты с зеленым свечением, почкующиеся зеленые шары
M.tuberculosis Academia	Полиморфные кокки и палочки	Синие полиморфные палочки и кокки	Зеленые палочки и кокки
M.fortuitum 342	Мелкие шары, полиморфные палочки и кокки	Редко рубиново-красные палочки	Зеленоватые полиморфные кокки и палочки
M.terrae 17522 ATCC	Полиморфные кокки и палочки	Синие тонкие длинные палочки, иногда рубиново-красные	Желтоватая масса и шары с отдельными зеленоватыми компонентами
Лимфатические узлы коровы, больной туберкулезом	Преимущественно палочки различной длины	Мелкие красные палочки, красная зернистость и полиморфные синие палочки и кокки, специфические структуры	Зеленые палочки и кокки
Кровь морских свинок, инфицированных M.bovis 8	Мелкие палочки, конгломераты зернистости, дипло- и тетракокки	Синяя зернистость и синие полиморфные палочки с зернистостью красного цвета, редко красные палочки	Зеленые палочки и кокки

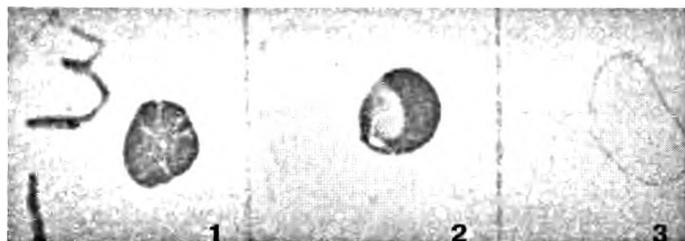
ки крови (взятой через 2 месяца после заражения) стимулятором роста в мазках обнаруживались палочки, содержащие кокковидные включения. После посева таких проб крови на среду ВКГ через 48 ч был получен типичный рост восковидных колоний. В мазках обнаруживались полиморфные синие палочки с красноватой зернистостью и такие же свободные лежащие красноватые кокковидные образования (рис. 2).

Из-за роста на среде ВКГ микрофлоры, отличающейся по морфологическим и тинкториальным свойствам от классических туберкулезных палочек, особый интерес представляли результаты иммунолюминесцентной микроскопии с моноспецифической антисывороткой *M. bovis* и аффинно-очищенными антителами к комплексу антигенов *M. bovis*. Как видно из таблицы 1, за исключением *M. terrae*, во всех случаях было получено специфическое зеленое свечение различных морфологических структур. Это свидетельствует о наличии у полученных изолятов антигенов, общих с антигенами классических форм возбудителя туберкулеза.

В пластинчатой реакции агглютинации установлено, что взвеси изолятов со среды ВКГ четко агглютинировались антисывороткой к *M. bovis* и гораздо слабее реагировали с антисывороткой к антигенам атипичных микобактерий (рис 3).

Рис. 3

Пластинчатая РА изолята с посева на среде ВКГ гомогената лимфатического узла коровы, больной туберкулезом



1 — в антисыворотке к *M. bovis*, 2 — в антисыворотке к антигенам атипичных микобактерий, 3 — в нормальной сыворотке крови (окраска фуксином).

При исследовании изолятов в непрямом ИФА установлено, что после нескольких циклов замораживания, оттаивания, разведения 1:10 в карбонат-бикарбонатном буфере pH 9,3 они давали водорастворимые антигены, фиксировавшиеся на иммунологической панели и реагировавшие с антисыворотками, полученными на разрушенные бацилляр-

ные формы микобактерий. В таблице 2 представлены результаты ИФА с культурами эталонных штаммов, выращенных на среде ВКГ и изолятами из крови и лимфатических узлов человека и животных, больных туберкулезом. Как видно из таблицы 2, изоляты достаточно интенсивно реагировали с антисыворотками к микобактериальным антигенам, давая превышения ОП в 2—6,7 раза больше, чем с нормальной бычьей сывороткой. Причем интенсивность реакций у штаммов возбудителей туберкулеза и изолятов из туберкулезного материала была большей с антисывороткой *M. bovis*, а у штаммов атипичных микобактерий — с гомологичной им антисывороткой. Индекс специфической активности (ИСА) у препарата, полученного из бациллярной формы *M. bovis*, возрастал с разведением антисывороток, а у изолятов, полученных на среде ВКГ, возрастал до разведений 1:400—1:1600, а затем снижался. Это указывает на меньшую концентрацию видоспецифических антигенов в изолятах со среды ВКГ, чем в бациллярных формах возбудителя, но не исключающую возможность серологической идентификации.

Обсуждение результатов

Практически все известные питательные среды для первичного выделения возбудителя туберкулеза обеспечивают его рост, как минимум, на 10—14-е сутки, а чаще через 30—90 суток. В наших опытах культуры микобактерий туберкулеза после обработки стимулятором роста обильно росли на среде ВКГ уже через 24 ч., а из патологического материала — через 24—48 ч, но преимущественно в виде измененных форм, резко отличающихся по морфологии от классического типа и не окрашивающихся по Цилю-Нильсену. По данным В.В. Власенко (1998), стимулятор роста состоит из компонентов, разрушающих пептидогликановый скелет возбудителя и активизирующей калий-натриевый "насос" клетки, что ускоряет процессы размножения клеток, но лишает их характерной морфологии. По нашим наблюдениям, при увеличении продолжительности культивирования до 30 суток и более в культурах нарастало количество клеток, положительно окрашивающихся по Цилю-Нильсену. С другой стороны, вероятно, питательная среда ВКГ обеспечивает и рост собственно трансформированного возбудителя, находящегося в патологическом материале.

Основной проблемой при использовании среды ВКГ является доказательство природы изолятов. На наш взгляд, результаты иммунолюминесценции, РА и ИФА убедительно свидетельствовали об антигенном родстве изолятов с возбудителем туберкулеза и возможности определения их видовой принадлежности по наличию видоспецифических антигенов.

Таблица 2

Результаты ИФА изолятов со среды ВКГ с антисыворотками к антигенам атипичных микобактерий и *M. bovis*

Разведения антисывороток	Превышения оптической плотности (ОП) с антисыворотками к антигенам атипичных микобактерий и <i>M. bovis</i> в сравнении с нормальной бычьей сывороткой крови											
	M. bovis Vallee, дезинтегра- бациллярной культуры (контроль)			M. tuberculosis Academia ВКГ			M. fortuitum 342 ВКГ			Изолят из лимфатических узлов коровы, больной туберкулезом ВКГ		
	I—IV [*]	МВ ^{**}	ИСА [‡]	I—IV	МВ	ИСА	I—IV	МВ	ИСА	I—IV	МВ	ИСА
1:50	5,6	3,4	0,61	5,3	6,7	1,3	2,8	1,9	1,5	1,7	2,3	1,4
1:100	3,4	3,5	1	4,2	4,2	1	2,2	1,2	1,8	1,4	2,1	1,5
1:200	3,6	4,1	1,1	4,4	5,6	1,3	2,7	1,9	1,4	1,6	3,2	2
1:400	3,5	4,8	1,4	3,3	6,5	2	1,8	1,5	1,2	1,8	3,7	2,1
1:800	3,3	5,3	1,6	2	3	1,5				1,6	2,7	1,7
1:1600	2,9	5,6	1,9	2,1	4	1,9				1,2	2,5	2,1
1:3200	2	4,1	2,1	1,5	2,1	1,4						
1:6400	1,8	4,4	2,4	1,4	1,8	1,3						

Примечания:

* — антисыворотка к смеси антигенов микобактерий I—IV группы по Раньону;

** — антисыворотка *M. bovis*;

‡ — ИСА — индекс специфической активности (отношение превышения ОП с гомологичной антисывороткой к превышению ОП с гетерологичной антисывороткой).

Интерес представляют и результаты применения среды ВКГ для прижизненной диагностики туберкулеза путем исследования крови. Полученные данные продемонстрировали очень высокую степень чувствительности метода. У всех инфицированных морских свинок удалось выявить в крови возбудитель туберкулеза при отрицательных результатах на обычных яичных средах.

Выводы

1. Возбудитель туберкулеза в культуре и находящийся в патологическом материале после инкубации в стимуляторе роста дает на среде ВКГ рост через 24—48 ч, преимущественно в трансформированной форме.

2. В иммунолюминесценции, РА и ИФА доказано антигенное родство бациллярной формы возбудителя туберкулеза и изолятов со среды ВКГ, что указывает на возможность идентификации их по наличию видоспецифических антигенов.

3. Стимулятор роста и питательная среда ВКГ позволяют выделять этиологические агенты из крови и патматериала и могут быть рекомендованы для ускоренной прижиз-

ненной и посмертной микробиологической диагностики туберкулеза.

Список литературы

Дорожкова И.Р. Формы персистенции микобактерий туберкулеза в организме человека.: Автореферат. дис. докт. мед. наук.— М., 1974.—41 с.

Земскова З.С., Дорожкова И.Р. Скрыто протекающая туберкулезная инфекция// М.:— Медицина. — 1984. — С. 49—63, 178—186.

Мусин А.Ж. Л-трансформация микобактерий туберкулеза в организме крупного рогатого скота// Автореф. дис. ... канд. вет. наук. — Алма-Ата. — 1985. — 19 с.

*Гертман М.И. Биологические свойства Л-форм *Mycobacterium bovis*// Автореф. дис. ... канд. вет. наук. — М.: — 1988. — 18 с.*

Власенко В.В. Туберкулез в фокусе проблем современности. Винница: Наука, 1998.— 350 с.