

УДК 619:616.98:579.873.21:616-07

Власенко И.Г. к.б.н., доцент ©

Винницький торгово-економічний інститут КНТЕУ

## ИДЕНТИФИКАЦИЯ АДАПТИВНЫХ ФОРМ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕАКЦИЙ ПЦР

*В работе обосновано использование реакций ПЦР и агглютинации при идентификации адаптивных форм возбудителя туберкулеза. Доказано, что инкубирование адаптивных форм возбудителя туберкулеза в стимуляторе роста ВКГ и посев на питательные среды ВКГ или Влакон обеспечивает прорастание в вегетативные формы, имеющие общие антигены и участки ДНК идентичные таковым у бациллярных форм возбудителя туберкулеза. Перспективами нашей разработки есть использование полученных результатов для ранней диагностики туберкулеза.*

**Ключевые слова:** идентификация культур адаптивных форм микобактерий. применение реакций ПЦР и агглютинации, питательные среды Влакон и ВКГ.

**Актуальность.** Туберкулез является общим заболеванием для человека и животных. Он был и остается проблемой номер один среди хронических инфекций крупного рогатого скота на всех континентах мира [1,2,3,4]. Напряженность эпизоотической ситуации с туберкулезом среди крупного рогатого скота в мире намного выше, чем эпидемическая. Так, ежегодно, выявляется больных туберкулезом 8-10 млн. человек, а среди крупного рогатого скота – 6 млн. голов [5], соответственно 1,75 больных на 1 млн. населения и 5 тысяч на 1 млн. животных в мире.

Несмотря на широкомасштабную профилактику, третья часть населения мира инфицирована микобактериями туберкулеза и умирают от этого заболевания 2,6-2,9 млн. человек, что составляет около 5 % от всех случаев смертности во всем мире. Ежегодный прирост заболеваемости составляет 4 %. Каждый больной с активным бациллярным туберкулезом способен заразить 10-15 человек [6,7].

В Украине ежегодно выявляется более 30 тыс. больных с впервые диагностированным туберкулезом и его рецидивами, из них туберкулез с бактериовыделением составляет около 1/3. Это говорит о недостаточно поставленной проблеме микробиологической диагностики туберкулеза. Причиной такого положения микробиологической диагностики туберкулеза стало появление адаптивных форм возбудителя, которые традиционным методом выявить не представляется возможным.

Подавляющая часть людей, инфицированных адаптивными формами возбудителя туберкулеза, клинических форм заболевания могут не иметь, и туберкулез протекает у них в неактивной форме. Воздействие различных

факторов риска в определенный момент может привести к разбалансировке защитных сил организма и к переходу туберкулеза в активную форму.

Только в этот период, такие рутинные методы микробиологической диагностики туберкулеза, как трехразовая микроскопия мазка по Циль-Нильсену, посев на среду Левенштейна - Йенсена и Финна -2 могут выявить возбудитель туберкулеза, но и эти методы имеют ряд недостатков. Так, микроскопия мазка по Циль - Нильсену позволяет выявить только кислотоустойчивые микобактерии, не идентифицируя их, а выделение культуры на указанных питательных средах позволяет получить результат исследований от 3-4 недель до 2-3 месяцев [ 8].

На существование адаптивных форм возбудителя туберкулеза указывал еще Straus, Gamaleia (1891) которые обнаружили, что автоклавированные бациллы могут вызывать у животных «некротуберкулёз» - казеозные поражения и перитонит [9]. Grancher, Ledoux - Lebard (1901) установили высокую устойчивость возбудителя туберкулеза в высушенном состоянии к нагреванию при 100°C [10]. О выделении микобактерий из автоклавированных препаратов туберкулина, сообщает ряд ученых [11,12].

Разработка новых средств бактериологической диагностики туберкулеза, в частности питательной среды ВКГ и Влакон, обеспечивающей исключительно высокую чувствительность при выращивании МБТ, существенно расширила возможности изучения адаптивных форм возбудителя туберкулеза и его устойчивости к различным факторам [13].

**Целью исследований** явилось изучение адаптивных форм возбудителя туберкулеза путем посева на питательные среды ВКГ и Влакон, а также исследование свойств полученных культур микроорганизмов.

**Материалы и методы исследования.** Для изучения адаптивных форм возбудителя туберкулеза мы использовали штамм *M. bovis* 8 (ВГНКИ) выращивали на среде Сотона при 37°C и автоклавировали при 120 °С в течении 30 мин. Для исследования использовали автоклавированную культуральную жидкость и образцы туберкулинов разных производителей (табл. 1). Питательную среду ВКГ и Влакон (\*HANSA\*, Ukraine) готовили по прописи изготовителя и разливали в разовые чашки Петри («Бион»).

Автоклавированную культуральную жидкость и туберкулины смешивали (1:1) со стимулятором роста ВКГ, инкубировали при 37 °С в течении 48 ч и высевали (по 0,5-0,7 мл) на среду ВКГ и Влакон. Чашки с посевами заклеивали скотчем и инкубировали при 37 °С. Контролем служили посева на среду ВКГ стимулятора роста ВКГ и его смеси со стерильной дистиллированной водой и с 0,3 % раствором фенола (1:1).

Из выросших колоний готовили мазки (окраска по Циль-Нильсену). Бактериальную массу исследовали в реакции агглютинации (РА) на стекле с антисывороткой к негретому соникату *M.bovis*, адсорбированной *Staphaureus*, *E.coli* и антигенами атипичных микобактерий [14].

Часть изолятов исследовали путем применения полимеразной цепной реакции (ПЦР) с набором «Biokom», по протоколу изготовителя. Для

определения патогенности морским свинкам подкожно вводили изолят из ППД туберкулина для млекопитающих (1 мг в 1 мл. минерального масла). Через 1 месяц у животных стерильно брали кровь для посева на среды Влакон и ВКГ. Через 2 месяца провели пробу с ППД туберкулином (25 МЕ), а через 2,5 месяца - эвтаназию и посев внутренних органов на среду ВКГ и Левенштейна-Иенсена (деконтаминация материала 5 % серной кислотой).

**Результаты исследований.** В мазках исходной автоклавированной культуральной жидкости *M. bovis* 8 были обнаружены характерные рубиново-красные палочки, а в результате компьютерной и электронной микроскопии было установлено, что в фильтрате обнаружены адаптивные формы - артроспоры возбудителя туберкулеза диаметром 0,12-0,15 мкм.

При электронной микроскопии, на сагиттальном разрезе артроспоры, обнаружены миксамебы, которые выходят из артроспоры после её созревания (рис. 1). Они не имеют клеточной стенки, поэтому их называют молекутами, в дальнейшем они синтезируют стенку и образуется коккообразная адаптивная форма. Некоторые авторы отождествляют молекуты с L-формами, тогда как молекуты - это стадия развития возбудителя туберкулеза.

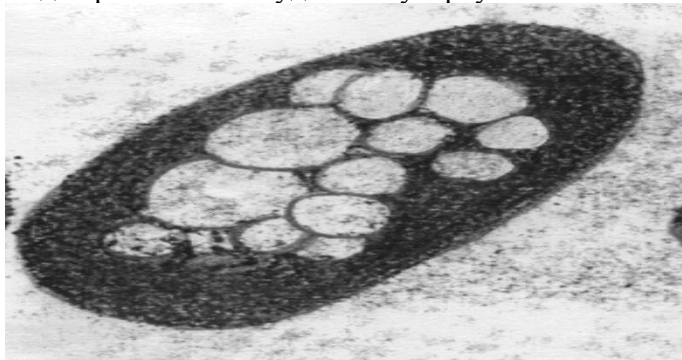


Рис.1. Стадия развития возбудителя туберкулеза - миксамебы в артроспоре (электронная микроскопия-50 тис.)

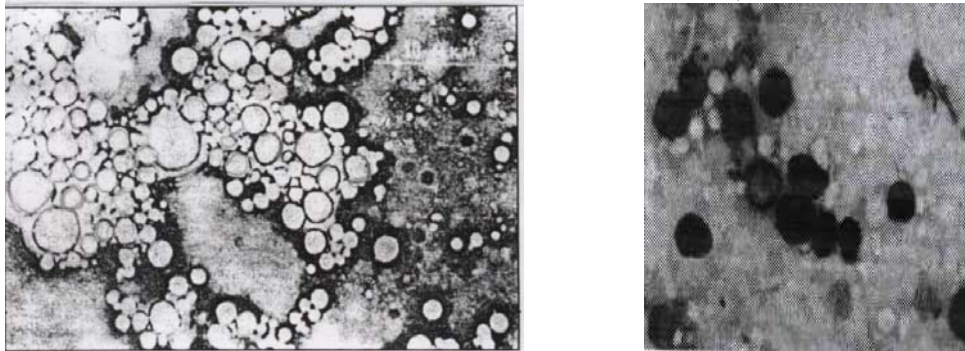


Рис. 2. Адаптивные формы (молекуты и коккообразные клетки), Ув. 10 X 90

Особенности роста артроспор изучали на различных питательных средах. После инкубации артроспор со стимулятором роста ВКГ и посева на среду ВКГ или Влакон через 48 часов появились «восковидные» колонии, при

микроскопии мазков с этих колоний, окрашенных по Циль-Нильсену, были обнаружены кокки и палочки, не окрашивающиеся в рубиново-красный цвет, но изредка встречались коккообразные формы рубиново-красного цвета. Если смыть «восковидные» колонии и провести автоклавирование, то при микроскопии мазков с этой суспензии, окрашенных по Циль-Нильсену, были обнаружены кокки и палочки, окрашивающиеся в рубиново-красный цвет (рис. 3-5). Возможно, что при фиксации мазка микобактерии не гибнут и поэтому не воспринимают краску, а дополнительное автоклавирование способствует гибели вегетативных форм и усиливает положительное окрашивание по Циль-Нильсену. Все образцы туберкулинов, несмотря на наличие в них 0,3-0,5 % раствора фенола, после инкубации в стимуляторе роста и посева на питательную среду ВКГ так же через 48-72 часа дали рост «восковидных» колоний, сливавшихся в сплошной «газонный» рост. В мазках при микроскопии были обнаружены темно-красные палочки, опалесцирующие кокки.

При пересеве колоний со среды Влакон и ВКГ на среду Левенштейна-Иенсена без малахитового зеленого культуры приобретали палочковидную форму, а в мазках возрастало количество рубиново-красных форм (табл. 1).

Посев на среды Влакон и ВКГ показал присутствие жизнеспособных адаптивных форм возбудителя туберкулеза в автоклавированных препаратах, в том числе, консервированных фенолом, а при пересеве на среду Левенштейна-Иенсена без малахитового зеленого, изоляты частично восстанавливали кислотоустойчивость.

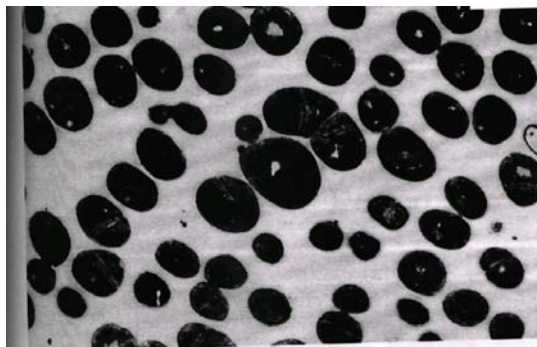


Рис. 3. Адаптивная коккообразная форма



Рис.4 Начало образования палочки з коккообразной формі

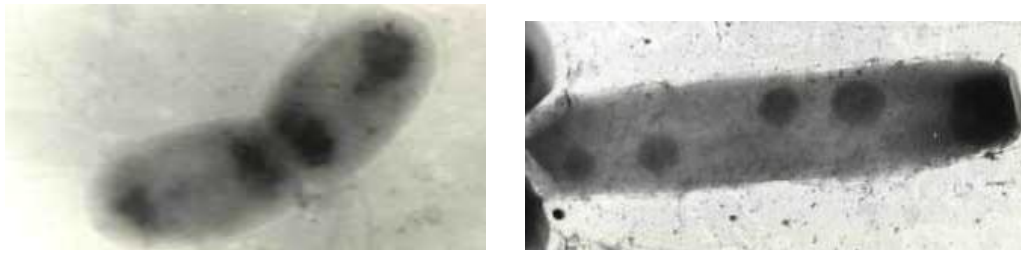


Рис.5. Развитие адаптивной формы в палочку Коха

Бактериальная масса культур, выращенных на среде Влакон и ВКГ, давала стойкую суспензию, что позволило использовать реакцию агглютинации (РА) для изучения их поверхностных антигенов. Установлено, что все изоляты из автоклавированных препаратов возбудителя туберкулеза агглютинировались антисывороткой к соникату «бациллярной» культуры *M.bovis* Vallee, но в нормальной сыворотке крови и в 0,9 % растворе хлорида натрия агглютинации не наблюдалось (табл.1).

Вместе с тем, положительный результат ПЦР (см. табл. 1) однозначно подтверждал генетическое родство изолятов с возбудителем туберкулеза бычьего вида.

Таблица 1

**Результаты посева автоклавированных препаратов возбудителя туберкулеза на питательную среду ВКГ**

Препараты	Рост на среде ВКГ КП/НР *	Мазки по Циль-Нильсену	РА** с антисывороткой <i>M.bovis</i>	ПЦР***«Биоком» комплекс tuberculosis-bovis
Автоклавированная культуральная жидкость <i>M.bovis</i> 8	5/5	Рубиново-красные палочки, опалесцирующие кокковидные формы	++++	+
ППД для млекопитающих, с. 19, Курская биофабрика	8/8	Голубые палочки, опалесцирующие кокки	++++	+
PPD для млекопитающих AN5 batch 5, DILAB (Argentina)	6/6	Голубые палочки, опалесцирующие кокки	++++	+
ППД для млекопитающих, с. 45, Биолик, Украина	16/16	Голубые палочки, опалесцирующие кокки	++++	+
Туберкулин HCSM (Miffa Merieux)	5/5	Синие и красно-черные опалесцирующие кокки	++++	Не исслед.
Контроль: стимулятор роста ВКГ, вода с 0,3% фенола (1:1)	Нет	-	-	-

Примечание: 1. \* - КП (количество посевов, чашек) числитель, пг (наличие роста на засеянной чашке)знаменатель; 2 \*\* ра реакция агглютинации; 3. \*\*\* - ПЦР - полимеразная цепная реакция.

При зараженні морських свинок, ізоляти оказались способними к длительной персистенции в организме животных. В процессе опыта установлено, что через 1 месяц после введения изолята из крови с помощью питательной среды Влакон и ВКГ удалось выделить культуры, подобные исходной по морфологии и свойствам. Через 2 месяца у половины морских свинок была отмечена аллергия к туберкулину (диаметр эритем 10-14 мм). В зависимости от диаметра эритем животные были распределены на группы.

При аутопсии у морских свинок были выявлены узелки в печени и легких. Посев этого материала на среду Левенштена-Иенсена с малахитовым зеленым дал отрицательный результат, но на питательных средах Влакон, ВКГ и среде Левенштена-Иенсена без малахитового зеленого были выделены культуры, подобные заражающему штамму и изолятам из крови (табл.2).

Таблица 2

**Результаты заражения морских свинок изолятами из ППД туберкулина (серия 45), полученные на среде Влакон**

Аутопсия через 2 месяца	Посев крови и органов на среду ВКГ/Влакон	Микроскопия по Циль-Нильсену	РА с А/С*М. bovis	Эритемы на туберкулин (мм) через 2 мес.
В печени и легких узелки, диаметром 1-2 мм (n=5)	15/15	Синие и красные кокки, палочки, дипло - и тетракокки	++++	13-14
В печени узелки, диаметром 1-2 мм (n=3)	9/9	Синие и красные кокки, палочки, дипло — и тетракокки	++++	10-12
В печени узелки, диаметром 1-2 мм (n=6)	17/18 1/0 *.* (Т/Б)	Синие и красные кокки, палочки, дипло - и тетракокки	++++	7-9
В печени узелки, диаметром 1-2 мм (n=2)	6/5 0/1 *.* (Т/Б)	Синие и красные кокки, палочки, дипло - и тетракокки	++++	5-6

Примечание: \* - А/С (антисыворотки); \*.\* - Т/Б (технический брак)

Без сомнения, исследованные туберкулины строго контролируются. Однако применение новых питательных сред (Влакон и ВКГ) показало наличие в них жизнеспособных структур, имеющих генетическую связь с возбудителем туберкулеза.

Автоклавирование, безусловно, вызывало гибель вегетативных форм МБТ, но не уничтожало защитные формы артроспор, выдерживающих высокую температуру и проходящих через стерилизующие фильтры.

Считается, что стимулятор роста ВКГ активизирует натрий - калиевые насосы и некоторые ферменты микобактерий [11], что активизирует адаптивные структуры и способствует быстрому «прорастанию» с образованием полиморфных некислотоустойчивых клеток, имеющих общие антигены с

бациллярными формами возбудителя туберкулеза и идентичные участки ДНК, по которым была проведена их точная идентификация.

Вероятно, следует признать, что ранее известные ультрамелкие, L-трансформированные, ветвящиеся, кокковидные, некислоустойчивые и другие формы - не только результат адаптации возбудителя к факторам иммунной системы, или действию химиотерапевтических средств, но и - закономерные этапы развития, в котором классическая «бацилла Коха» - лишь одна из стадий жизненного цикла возбудителя туберкулеза. Традиционная микробиологическая диагностика туберкулеза с помощью посева на плотные яичные среды (типа Левенштейна-Йенсена) дает визуальный результат через 6-12 недель, а с учетом определения лекарственной резистентности микобактерий туберкулеза - через 10-14 недель при наличии в посеянном материале не менее 100 жизнеспособных клеток.

Кроме того, микробиологические анализы на туберкулез имеют низкую чувствительность (выявление положительных проб не превышает 50% в случае легочного туберкулеза у детей и престарелых лиц). Эти методы по срокам детекции в настоящее время никак не могут удовлетворять клиницистов. В настоящее время разработаны питательные среды, компьютерные системы и реакции агглютинации и ПЦР для выявления микобактерий, что дает возможность получить результаты исследований, начиная с 2-х часов до 5 суток после поступления диагностического материала. Среднее время детекции микобактерий на питательных средах ВКГ и Влакон составляет 2-4 суток. для ускоренной диагностики туберкулеза целесообразно использовать питательные среды Влакон и ВКГ, а для идентификации полученных культур использовать реакции ПЦР и агглютинации, что является специфичным, быстрым и надёжным методом диагностики.

#### **Выводы и перспективы дальнейших исследований**

1. Автоклавирование при 120 °С на протяжении 30 мин убивает патогенную форму возбудителя туберкулеза, но не обезвреживает адаптивные формы - артрспоры, выдерживающие этот экстремальный фактор.
2. Инкубирование автоклавированных препаратов возбудителя туберкулеза в стимуляторе роста ВКГ и посев на питательную среду ВКГ обеспечивает проростание адаптивных форм, имеющих общие антигены и участки ДНК идентичные таковым у бациллярных форм возбудителя туберкулеза.
3. Изоляты, выделенные из образцов туберкулинов способны длительно персистировать в организме морских свинок и вызывать реакции гиперчувствительности замедленного типа к туберкулину.
4. Перспективами нашей разработки есть использование полученных результатов для ранней диагностики туберкулеза.

#### **Литература**

1. Овдиенко Н.П. Эпизоотология крупного рогатого скота за рубежом // Ветеринария. - 1989. - № 8. - С. 7-10.
2. Ткаченко О.А. Туберкульоз і мікобактеріозна інфекція великої рогатої худоби // Автор. дис. докт. вет. наук. - Київ - 1999. - 35 с.

3. Туберкулез животных и меры борьбы с ним / Ю.Я. Кассич, А.Т. Борзяк, А.Ф. Кочмарский, О.В. Мартма и др.: Под ред. Ю.Я. Кассича.- К.: Урожай, 1990.-304с.
4. Юсковец М.К. Туберкулез сельскохозяйственных животных и птиц.- Минск, 1963.-450 С.
5. Кузин А.И. Туберкулез сельскохозяйственных животных и его профилактика. -М.: Росагропомиздат, 1992.-189 с.
6. Raviglione M. //Intern.J.Tubercl.and Lung Dis.- 2001.-V.5.-N11.- Suppl.1 1.-P. 7-8.
7. WHO Report-Geneva, 2002. - 175 p.
8. Фещенко Ю.І., Мельник В.М., Турченко Л.В., Власенко В.В. Клінічна Оцінка швидкого виявлення мікобактерій на живильному середовищі ВКГ// Український пульмонологічний журнал 2003 №2 с. 15-18.
9. Straus et Gamaleia /Archives de medecini experim, 1891.-P.- 705.
10. Grancher, Ledoux - Lebard цит. по Э. Нокард, Э. Легланч Микробные болезни животных. - Санкт-Петербург, 1908. - С. 124.
11. Власенко В.В. Туберкулез в фокусе проблем современности. - Винница: Наука, 1998.-350с.
12. Колос Ю., Стець В., Титаренко В., Зелінський М., Якубчак О., Хоменко В. До питання діагностики туберкульозу в тварин// Ветеринарна медицина України - 2006- №11-С. 10-12
13. Власенко В.В., Власенко І.Г., Лисенко А. П. и друг. Изучение термической устойчивости возбудителя туберкулеза в автоклавированных препаратах// Научно-технический бюллетень, Харьков 2006. С.71-77
14. Лысенко А.П. Антигены *Mycobacterium bovis* и атипичных микобактерий, изучение и применение для дифференциальной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота: Автреф. дисс. д-ра вет.наук. - Минск. - 1994.-35с.

### Summary

*In this work use reactions PCR and agglutination for identification, mycobacterium tuberculosis is founded. In is poured, that incubation of adaptation forms of mycobacterium tuberculosis in stimulation VKG growing and sowing on seeding surroundings VKG or Vlacon provides growing into vegetative forms, have common antigens and sections DNK analogous to bacillary forms of tuberculosis agents.*

*Стаття надійшла до редакції 18.02.2008*