

ИЗУЧЕНИЕ ТЕРМИЧЕСКОЙ УСТОЙЧИВОСТИ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗА В АВТОКЛАВИРОВАННЫХ ПРЕПАРАТАХ

**В.В. Власенко, И.Г. Власенко, С.А. Колодий, В.В. Блашук,
М.А. Дзюмак**

Винницкий государственный аграрный университет

А. П. Лысенко, А.Л.Лемиш, Е.Л. Красникова, И.Н.Архипов
Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского
Национальной академии наук Беларуси

В работе обоснована термическая устойчивость возбудителя туберкулеза. Доказано, что в процессе автоклавирования при температуре 120 °С в течение 30 минут артрспора возбудителя туберкулеза не уничтожается. Показана нестерильность туберкулина ППД для млекопитающих после автоклавирования при бактериологическом посеве на питательную среду ВКГ.

возбудитель туберкулеза, температурная устойчивость, среда ВКГ, туберкулин

Несмотря на широкомасштабную профилактику, третья часть населения мира инфицирована микобактериями туберкулеза; ежегодно 10 млн. человек заболевает бациллярными формами туберкулеза и умирают от этого заболевания 2,6-2,9 млн. человек, что составляет около 5 % от всех случаев смертности во всем мире [8,9]. Заболеваемость туберкулезом детей в России за 5 лет возросла более чем на 60 %. Ежегодный прирост заболеваемости составляет – 4 %. Каждый больной с активным бациллярным туберкулезом способен заразить 10-15 человек. Подавляющая часть инфицированных туберкулезом людей не заболевает, 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. Сложная эпизоотическая обстановка сохраняется и в животноводстве [6].

В системе мер профилактики широко используют термическую инактивацию микобактерий туберкулеза (МБТ). Считается, что не только автоклавирование при 120 °С, но и пастеризация при 75 °С убивает возбудителя [7]. Однако еще Straus, Gamaleia (1891) обнаружили, что автоклавированные бациллы могут вызывать у животных «некротуберкулез» - казеозные поражения и перитонит [10]. Grancher, Ledoux - Lebard (1901) установили высокую устойчивость возбудителя туберкулеза в высушенном состоянии к нагреванию при 100 °С [12]. О выделении микроорганизмов из автоклавированных препаратов туберкулина, без описания методик, сообщал Т.М. Бошнян [1].

Разработка новых средств бактериологической диагностики туберкулеза, в частности питательной среды ВКГ, обеспечивающей исключительно высокую чувствительность при выращивании МБТ, существенно расширила возможности изучения биологии возбудителя туберкулеза и его устойчивости к различным факторам [3]. Целью исследований явилось изучение термической устойчивости возбудителя туберкулеза путем посева на питательную среду ВКГ автоклавированных препаратов и туберкулинов, а также исследование свойств полученных культур микроорганизмов.

Материалы и методы исследований. Штамм *M. bovis* № 8 (ВГНКИ) выращивали на среде Сотона при 37 °С 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 (*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. Чашки с посевами заклеивали скотчем и инкубировали при 37 °С. Контролем служили посевы на среду ВКГ стимулятора роста ВКГ и его смеси со стерильной дистиллированной водой 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 *Staph.aureus*, *E.coli* и антигенами атипичных микобактерий [5].

Для иммуноферментного анализа (ИФА) бакмассу ВКГ-изолятов многократно замораживали и оттаивали в 0,1N карбонатном буфере, pH 9,3 и сорбировали на панелях «Sarstedt». Реакцию ставили по общепринятой схеме с бычьими антисыворотками к смеси антигенов атипичных микобактерий и антисывороткой к негретому соникату *M.bovis* Vallee (не адсорбированной) с использованием антивидового пероксидазного конъюгата (Sigma).

Часть изолятов исследовали путем применения полимеразной цепной реакции (ПЦР) с набором «Biokom», по протоколу изготовителя. Для определения патогенности морских свинок подкожно заражали изолятом из ППД туберкулина для млекопитающих (1 мг в 1 мл минерального масла). Через 1 месяц у животных стерильно брали кровь для посева на среду 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 артроспоры возбудителя туберкулеза диаметром 0,12-0,15 мкм (рис .1).

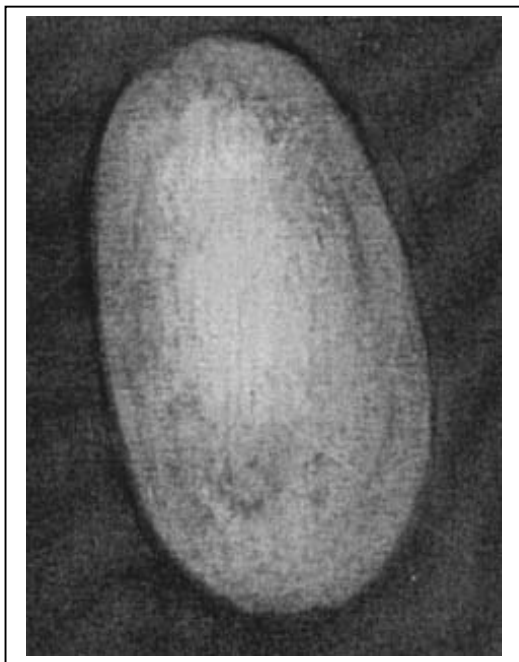


**Рис.1. Общий вид артроспоры
(компьютерная микроскопия)**

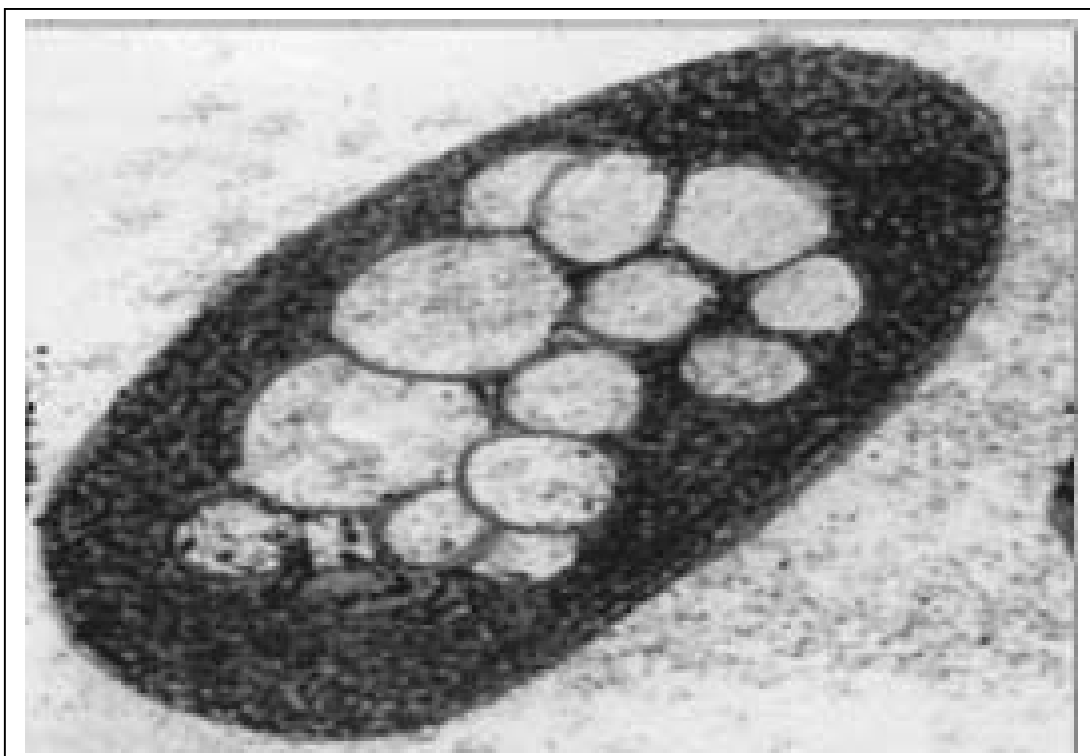


Рис.2. Стадия развития возбудителя туберкулеза - миксамебы в артроспоре (электронная микроскопия-50 тис.)

При электронной микроскопии, на сагиттальном разрезе артроспоры, обнаружены миксамебы, которые выходят из артроспоры после её созревания. Они не имеют клеточной стенки, поэтому их называют моликутами. Некоторые авторы отождествляют моликуты с L-формами. Но в процессе морфологических исследований L-формы идентифицируются как микроорганизмы, утратившие клеточную стенку, тогда как моликут – это стадия развития возбудителя туберкулеза (рис. 2).

Биохимические особенности роста артроспор изучали на различных питательных средах. После ее инкубации со стимулятором роста ВКГ и посева на среду ВКГ 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, а типичные бациллы отсутствовали, но изредка встречались коккообразные формы рубиново-красного цвета.

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 ВКГ на среду Левенштейна-Иенсена без малахитового зеленого культуры приобретали палочковидную форму, а в мазках возрастало количество рубиново-красных форм (табл. 1).

Посев на среду ВКГ показал присутствие жизнеспособных форм в автоклавированных препаратах возбудителя туберкулеза, в том числе,

консервированных фенолом, а при пересеве на среду Левенштейна-Иенсена без малахитового зеленого изоляты частично восстанавливали кислото-устойчивость.

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 M.bovis	ПЦР***«Биокот» комплекс tuberculosis-bovis
Автоклавиру-ванная культуральная жидкость M.bovis 8	5/5	Рубиново-красные палочки, опалесцирующие коко-видные формы	++++	+
ППД для млекопитающих, с. 19, Курская биообработка	8/8	Голубые палочки, опалесцирующие кокки	++++	+
PPD для млекопитающих AN5 batch 5, DILAB (Argentina)	6/6	Голубые палочки, опалесци-рующие кокки	++++	+
PPD bovituberculin BOWET PULAWY	7/7	Голубые палочки, опалесци-рующие кокки	++++	Не исслед.
Туберкулин HCSM (Miffa Merieux)	5/5	Синие и красно-черные опалес-цирующие кокки	++++	Не исслед.
Контроль: стимулятор роста ВКГ, вода с 0,3% фенола (1:1)	Нет	-	-	-

Примечание: 1. * – КП (количество посевов, чашек) – числитель, НР (наличие роста на засеянной чашке) – знаменатель;

2. ** – РА реакция агглютинации;

3. *** – ПЦР – полимеразная цепная реакция.

Бактериальная масса культур, выращенных на среде 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 (табл.2),

2. Превышение оптической плотности в ИФА изолята из ППД туберкулина с антисывороткой к атипичным микобактериям и антисывороткой к M.bovis Vallee (в сравнении с отрицательной сывороткой)

Разведение сывороток	M.bovis Vallee (соникат бациллярной культуры), контроль		ВКГ изолят из ППД для млекопитающих, серии 19	
	A/C* к атипичным мико-бактериям	A/C* M.bovis Vallee	A/C* к атипичным мико-бактериям	A/C* M.bovis Vallee
1:50	3,6	3,4	4,5	5,0
1:100	3,4	3,5	5,3	4,6
1:200	3,6	4,1	6,8	5,7
1:400	3,5	4,8	3,3	3,5
1:800	3,3	5,3	3,3	4,6
1:1600	2,9	5,6	3,0	4,6
1:3200	2,0	4,1	2,2	2,7
1:6400	1,8	4,4	2,5	2,8
М	3,0	4,4	3,9	4,2
ИСА	1,5		1,1	

Примечание. * - A/C (антисыворотки).

но в нормальной сыворотке крови и в 0,9 % растворе хлорида натрия агглютинации не наблюдалось.

В реакции иммуноферментного анализа (ИФА) изоляты из ППД туберкулина для млекопитающих давали интенсивные реакции с антисыворотками к смеси антигенов атипичных микобактерий и к *M.bovis* Vallee. Показатели превышения оптической плотности (в сравнении с отрицательной контрольной сывороткой) были сопоставимы с таковыми контрольного «бациллярного» антигена, но специфичность изолята из туберкулина была ниже. Индекс специфической активности (ИСА - отношение среднего превышения ОП с антисывороткой *M.bovis* Vallee к показателю с антисывороткой к атипичным микобактериям) не превысил 1,1 при показателе у бациллярного антигена *M.bovis* – 1,5. Вместе с тем, положительный результат ПЦР (см. табл. 1) однозначно подтверждал генетическое родство изолятов с возбудителем туберкулеза бычьего вида.

При заражении морских свинок, изоляты оказались способными к длительной персистенции в организме животных. В процессе опыта установлено, что через 1 месяц после введения изолята из крови с помощью питательной среды ВКГ удалось выделить культуры, подобные исходной по морфологии и свойствам. Через 2 месяца у половины морских свинок была отмечена аллергия к туберкулину (диаметр эритем 10-13 мм).

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 питательной среде ВКГ и среде Левенштена-Иенсена без малахитового зеленого были выделены культуры, подобные заражающему штамму и изолятам из крови (табл.3).

Без сомнения, исследованные туберкулины строго контролируются. Однако применение новой питательной среды (ВКГ) показало наличие в них жизнеспособных структур, имеющих генетическую связь с возбудителем туберкулеза.

3. Результаты заражения морских свинок изолятами из ППД туберкулина (серия 19), полученные на среде ВКГ

Аутопсия через 2,5 месяца	Посев крови органов на среду ВКГ	Микроскопия по Циль-Нильсену	РА с А/С*М. bovis	Эритемы на туберкулин (мм)
В печени и легких узелки, диаметром 1-2 мм	+	Синие и красные кокки, палочки, дипло - и тетракокки	++ —	13
В печени узелки, диаметром 1-2 мм	+	Синие и красные кокки, палочки, дипло – и тетракокки	— ++	10
В печени узелки, диаметром 1-2 мм	+	Синие и красные кокки, палочки, дипло - и тетракокки	++++	6
В печени узелки, диаметром 1-2 мм	+	Синие и красные кокки, палочки, дипло - и тетракокки	++++	6

Примечание: * - А/С (антисыворотки).

Автоклавирование, безусловно, вызывало гибель вегетативных форм МБТ, но не уничтожало защитные формы артрспор, выдерживающих высокую температуру и проходящих через стерилизующие фильтры. Достаточно давно появились сообщения о существовании спор у возбудителя туберкулеза [11],

которые в определенных условиях, сохраняют способность к стадийному восстановлению возбудителя [3]. Вероятно, в образовании «спор» принимают участие белки теплового шока и другие регуляторные белки, концентрация которых у микобактерий резко возрастает при подъеме температуры [5,13]

Считается, что стимулятор роста ВКГ активизирует натрий - калиевые насосы и некоторые ферменты микобактерий [3], что активирует адаптивные структуры и способствует быстрому «прорастанию» с образованием полиморфных неокислостойчивых клеток, имеющих общие антигены с бациллярными формами возбудителя туберкулеза и идентичные участки ДНК, по которым была проведена их точная идентификация.

Ранее о выделении неокислостойчивых палочек из фильтратов микобактерий туберкулеза сообщал Vaudremer (цит. по Н.В.Василеву, 1971) [2]. Изоляты из туберкулинов оказались способными к длительной персистенции в организме морской свинки и частичному восстановлению кислостойчивости.

Вероятно, следует признать, что ранее известные ультрамелкие, L-трансформированные, ветвящиеся, кокковидные, неокислостойчивые 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 [4]. 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 компьютерные системы для выявления микобактерий, что дает возможность получить результаты, 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. Приблизительно третья часть пациентов с бактериовыделением может быть выявлена при первичной компьютерной микроскопии окрашенного мазка крови или мокроты. Этот метод достаточно специфичен (75-98 %).

Выводы:

1. Автоклавирование при 120 °С, на протяжении 30 мин убивает патогенную форму возбудителя туберкулеза, но не обезвреживает образованные защитные структуры - артроспоры, выдерживающие этот экстремальный фактор.
2. Инкубирование автоклавированных препаратов возбудителя туберкулеза в стимуляторе роста ВКГ и посев на питательную среду ВКГ обеспечивает прорастание 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.

Бібліографічний список

1. Бошнян Г.М. О природе вирусов и микробов. – Москва: Медгиз, 1950.- 124 с.
2. Василев В.Н. Микобактериозы и микозы легких.- София.- 1971. - 382 с.
3. Власенко В.В. Туберкулез в фокусе проблем современности. - Винница: Наука, 1998. - 350 с.
4. Земскова З.С., Дорожкова Н.И. Скрыто протекающая туберкулезная инфекция. – Москва: Медицина.- 1984. - 221с.
5. Лысенко А.П. Антигены *Mycobacterium bovis* и атипичных микобактерий, изучение и применение для дифференциальной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота: Автореф. дисс. д-ра вет.наук. - Минск. - 1994. – 35 с.
6. Овдиенко Н.П., Найманов А.Х., Солодова И.В. //Ветеринарная патология № 1-2. - 2004. - С. 51-54.
7. Туберкулез животных и меры борьбы с ним / Ю.Я. Кассич, А.Т. Борзяк, А.Ф. Кочмарский и др. - К.: Урожай, 1990. – 304 с.
8. Raviglione M. //Intern.J.Tubercul. and Lung Dis.- 2001.-V.5.-N11.- Suppl.1 1.- P. 7-8.
9. WHO Report-Geneva, 2002. – 175 p.
10. Grancher, Ledoux - Lebard цит. по Э. Нокард, Э. Легланч Микробные болезни животных. - Санкт – Петербург, 1908. - С. 124.
11. Maggini, Praloran, Gammarotta // Ann.dell Institute Carlo Forlanini.- V. XXV. - 1965. - P. 321-345.
12. Straus et Gamaleia /Archives de medecini experim, 1891.-P.- 705.
13. Wiker H., Harboe M., Nagai S.// J.Gen.Microbiol. -1991. - 137. -P. 875-884.

ВИВЧЕННЯ ТЕРМІЧНОЇ СТІЙКОСТІ ЗБУДНИКА ТУБЕРКУЛЬОЗУ В АВТОКЛАВОВАНИХ ПРЕПАРАТАХ

В.В. Власенко, І.Г. Власенко, С.А. Колодій, В.В. Блашук, М.А. Дзюбак, Вінницький державний аграрний університет

А. П. Лисенко, А.Л. Лемиш, Е.Л. Красникова, І.Н.Архипов, Інститут експериментальної ветеринарії ім. С.Н. Вишелеського, Національної академії наук Білорусі

У роботі доведено термічну стійкість збудника туберкульозу. Обґрунтовано, що у процесі автоклавовання при температурі 120 °С протягом 30 хвилин артроспора збудника туберкульозу не знищується. Доказано нестерильність туберкуліну ППД для ссавців після автоклавовання та бактеріологічному посіві на поживне середовище ВКГ.

STUDY OF THERMAL FIRMNESS OF EXCITER OF TUBERCULOSIS IN AVTOCLAVOVANIH PREPARATIONS

B.B. Vlasenco, I.G. Vlasenco, S.A. Colodiy, V.V. Blashuk, M.A. Dzumak, Winnitca state agrarian university

A. P. Lisenco, A.L. Lemish, E.L. Crasnikova, I.N.Arhipov, Institute of experimental veterinary science of im. S.N. Vishelesscogo, National academy of sciences of Byelorussia

In work thermal firmness of exciter of tuberculosis is led to after avtoclavouvannya. Grounded, that in the process of avtoclavouvanni at the temperature of 120 °S during 30 minutes of artrospora exciter of tuberculosis is not annihilated. No Docazana sterility of tuberculin PPD for mammals after avtoclavouvannya and bacteriological sowing on a nourishing environment VCG.