

УДК 619:616–006+619:579:873.21

Притыченко А.Н., кандидат ветеринарных наук, доцент<sup>1</sup>Кучвальский М.В., научный сотрудник<sup>1</sup>Лысенко А.П., доктор ветеринарных наук, профессор<sup>2</sup>Скворцова К.А., студент<sup>3</sup><sup>1</sup>РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского», г. Минск, Республика Беларусь<sup>2</sup>УП «НИИ БИОФАРМ», Минский филиал, Республика Беларусь<sup>3</sup>Белорусский государственный университет, г. Минск, Республика Беларусь

## АНТИГЕННЫЙ СОСТАВ НЕКИСЛОУСТОЙЧИВЫХ С ДЕФЕКТНОЙ КЛЕТОЧНОЙ СТЕНКОЙ МИКОБАКТЕРИЙ ТУБЕРКУЛЕЗА

### Резюме

Исследован антигенный состав экспериментально полученных 13 изолятов некислоустойчивых форм с дефектной клеточной стенкой *M. tuberculosis*, *M. bovis*. Их суммарное антигенное родство с типичной родительской формой достигало 84 %, и в их составе обнаружены специфичные для комплекса *tuberculosis-bovis* антигены MPB 70 и MPB 83.

В составе некислоустойчивых форм с дефектной клеточной стенкой микобактерий туберкулеза обнаружено меньше антигенов, общих с антигенами *M. avium*, чем у типичных родительских штаммов.

В иммуноблоттинге с антисыворотками к типичным штаммам *M. tuberculosis* и *M. bovis* реагировало как минимум 16–18 отдельных антигенных полипептидов некислоустойчивых форм с дефектной клеточной стенкой микобактерий туберкулеза, причем их спектр был одинаковым у экспериментально трансформированных штаммов и клинических изолятов.

При инфекции, вызванной некислоустойчивыми формами с дефектной клеточной стенкой микобактерий туберкулеза, развивался выраженный гуморальный иммунный ответ, который выявлялся диагностическими, приготовленными из типичных микобактерий.

**Ключевые слова:** микобактерии туберкулеза, антигенный состав, дефектная клеточная стенка.

### Summary

The antigenic composition of experimentally obtained 13 isolates of non-acid-fast forms cell wall deficient of *M. tuberculosis*, *M. bovis* was studied. Their total antigenic relationship with the typical parental form reached 84 % and MPB 70 and MPB 83 antigens specific to the tuberculosis-bovis complex were found in their composition.

In the composition of non-acid-fast forms cell wall deficient of *M. tuberculosis*, fewer antigens common with *M. avium* antigens were found than in typical parent strains.

In immunoblotting with antisera to typical strains of *M. tuberculosis* and *M. bovis* at least 16–18 individual polypeptides of non-acid-fast forms cell wall deficient reacted and their spectrum were the same in experimentally transformed strains and clinical isolates.

In case of infection caused by non-acid-fast forms cell wall deficient of mycobacteria of tuberculosis a pronounced humoral immune response developed, which was detected by diagnostics prepared from typical mycobacteria.

**Keywords:** tuberculosis mycobacteria, antigenic composition, deficient cell wall.

Поступила в редакцию 04.05.2023 г.

### ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время уже не вызывает сомнений то, что микобактерии туберкулеза (МБТ) *in vitro* и *in vivo* могут менять форму, терять кислотоустойчивость, снижать патогенность, превращаясь в лишённые полноценной клеточной стенки L- или формы с дефектной (cell wall deficient – CWD) клеточной стенкой [1–7]. Если антигенный состав типичных МБТ хорошо изучен, известны свойства большинства

антигенов, многие из них получены в иммунохимически чистом виде [8–11], то об антигенном составе L- и некислоустойчивых (НКУ) CWD-форм известно мало. Сообщалось о наличии общих антигенов у CWD-изолятов из опухолей и лейкозной крови с *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, микобактериями III группы по Раньону [12]. В конкурентном иммуноферментном анализе (ИФА) установлено, что соникаты НКУ (CWD) *M. bovis*

снижали на 50 % активность конъюгата пероксидазы и антител к *M. bovis* до концентрации 4 мкг/мл, в то время как соникат типичного штамма *M. bovis* – до концентрации 0,18 мкг/мл. То есть НКУ (CWD) *M. bovis* обладали общими антигенами с родительским штаммом *M. bovis* [13]. Отмечалось, что при трансформации МБТ у НКУ форм снижается или прекращается синтез преимущественно антигенов, ассоциированных с клеточной стенкой [14].

Известно, что L- и CWD-формы МБТ играют роль в развитии латентной туберкулезной инфекции и рецидивов туберкулеза [1, 2]. Вместе с тем пожизненная персистенция и свойства L- и CWD-форм МБТ могут быть причиной развития ряда патологических состояний, которые традиционно не связывают с МБТ [2, 3, 4, 12]. В связи с этим данные об антигенном составе таких форм необходимы не только для исследования их родства с типичными МБТ и понимания процесса трансформации, но и для совершенствования диагностики латентной инфекции и изучения патологий неизвестной этиологии.

**Цель исследования** – изучение антигенного состава НКУ (CWD) форм эталонных штаммов МБТ и НКУ (CWD) изолятов из разных источников.

#### МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Штаммы *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, *M. bovis* № 8, *M. avium* 1603 (КМИЭВ РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского») выращивали на среде Гельберга. НКУ (CWD) формы получали инкубацией их бактериальной массы в стимуляторе роста MucCel DW (48 ч при температуре 37 °С), посевом на среду Muc Cel DW и культивированием при температуре 37 °С.

В работе использовали изоляты НКУ (CWD) МБТ из мозга козы с губкообразными изменениями «Br 2» [16], культуры Т-лимфоцитов больного Т-лимфобластной лейкемией «Jurkat» [17], культуры клеток аденокарциномы матки «HeLa» [18], культуры клеток почки ягненка, инфицированной вирусом бычьего лейкоза (FLK-BLV) «IsAGVL 30» [19], крови человека с латентной туберкулезной инфекцией, крови человека с аденокарциномой предстательной железы, лимфатического узла коровы, боль-

ной туберкулезом [20], молока коровы, больной туберкулезом [20], опухоли толстого кишечника крысы [22], опухоли молочной железы кошки [22], крови кота «FeLv+» [22], крови коровы, больной лейкозом [23].

НКУ (CWD) МБТ выращивали на чашках со средой MucCel DW 2–3 суток при температуре 37 °С. Бактериальную массу смывали 1%-ным раствором фенола, промывали этим же раствором, дезинтегрировали (3–5 мг/мл) в 1%-ном растворе фенола на Bandelin Sonopuls 2400 (4 цикла по 5 мин при 80%-ной мощности) с охлаждением.

Антигенный состав изолятов изучали в ИФА, РИД, перекрестном иммуноэлектрофорезе (ПИЭФ) с промежуточным гелем (ПГ), ракетном иммуноэлектрофорезе (РИЭФ) [15] и в иммуноблоттинге с антитысыворотками кроликов, иммунизированных соникатами *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, *M. bovis* 8, *M. avium* 1603 и их НКУ (CWD) форм, НКУ (CWD) МБТ «D» из крови, больного саркомой, из культуральной жидкости FLK-BLV [19], из мозга козы «Br 2» [16], из культуры клеток аденокарциномы HeLa [18] (5–7-кратно подкожно по 200 мкг/кг в смеси с ISA 70).

Для иммуноблоттинга изоляты прогревали в буфере для образцов (4х) и подвергали электрофорезу (ЭФ) в 10- или 12 %-ном полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ПААГ-ДСН) (Laemmli, 1970). Перенос осуществляли на Trans-Blot® SD на нитроцеллюлозные мембраны, которые блокировали 2%-ным раствором овальбумина и инкубировали (90 мин) с антитысыворотками (a/c) к типичным и НКУ (CWD) МБТ, истощенными клетками *Staph. aureus*, *Strept. epidermidis*, *E. coli*, *Salm. dublin*, *Klebs. pneumonia*, *Past. multocida*. Для визуализации мембраны обрабатывали конъюгатом пероксидазы и анти-IgG кролика («Abscam») и субстратным раствором 3,3'-диаминобензидина с перекисью водорода.

Антитела в антитысыворотках к изолятам НКУ (CWD) МБТ к антигенам МРВ 70 и МРВ 83 определяли в ИФА с тест-системой Iddex *M. bovis* АВ, заменив пероксидазный конъюгат анти-IgG крупного рогатого скота на конъюгат анти-IgG кролика (Sigma), результаты регистрировали при 450 нм.

Для изучения иммунного ответа 3 морские свинки заразили (подкожно по 3 мг) восстановившими жизнеспособность НКУ (CWD) МБТ после инактивации *M. bovis* 8 глутаровым альдегидом [24]. Через 45 суток их исследовали туберкулинами для млекопитающих и птиц (по 100 IU), а сыворотки крови – в ИФА с соникатами *M. avium* 1603 и *M. bovis* 8.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Для выявления общих антигенов в ИФА исследовали соникаты НКУ (CWD) *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv и типичного штамма *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv с антисыворотками к этим штаммам. Соникат *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv реагировал с антисывороткой к НКУ (CWD) *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv, давая положительные реакции (S/neg больше 2,0) со всеми разведениями (таблица 1). Следовательно, в его составе были антигены, общие с НКУ (CWD) *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv. С гомологичной антисывороткой *M. tubercu-*

*losis* H<sub>37</sub>Rv давал более интенсивные реакции (таблица 1), которые по суммарному показателю ОП S/neg были на 46,5 % выше, чем с антисывороткой к НКУ (CWD) *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (таблица 1). То есть формально суммарное антигенное родство НКУ (CWD) *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv и родительского типичного штамма могло быть порядка 53–54 %.

При исследовании в иммуноблоттинге тех же компонентов, что и в ИФА (таблица 1), установлено, что не менее 18 полипептидов НКУ (CWD) *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv реагировало с антисывороткой к типичному родительскому штамму (рисунок 1). В то же время у сониката *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv в иммуноблоттинге с антисывороткой к НКУ (CWD) *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv было выявлено не менее 8 полипептидов с молекулярной массой, как у НКУ (CWD) *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (рисунок 1, стрелки), и ряд полипептидов, образывавших достаточно крупные диффузные зоны.

Таблица 1. – Результаты ИФА сониката *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv с антисыворотками (а/с) к НКУ (CWD) *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv и к *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (ОП – оптическая плотность, S/neg – отношение ОП антисыворотки к ОП нормальной сыворотки)

Разведения а/с	Соникат <i>M. tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv				
	нормальная сыворотка	а/с CWD <i>M. tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv		а/с <i>M. tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv	
		ОП	ОП	S/neg	ОП
1:20	340	698	2,1	439	1,3
1:40	242	631	2,6	765	3,2
1:80	222	624	2,8	632	2,9
1:160	169	815	4,8	946	5,6
1:320	228	749	3,3	964	4,2
1:640	185	586	3,2	883	4,8
1:1280	142	447	3,2	963	6,8
1:2560	125	356	2,9	946	7,6



1 – соникат *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv;  
 2 – НКУ (CWD) *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv.  
 Слева – а/с к *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (1:80);  
 справа – к НКУ (CWD) *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (1:80),  
 Стрелками обозначен ряд выявленных полипептидов

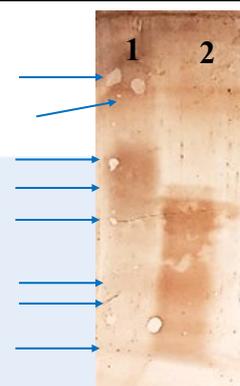
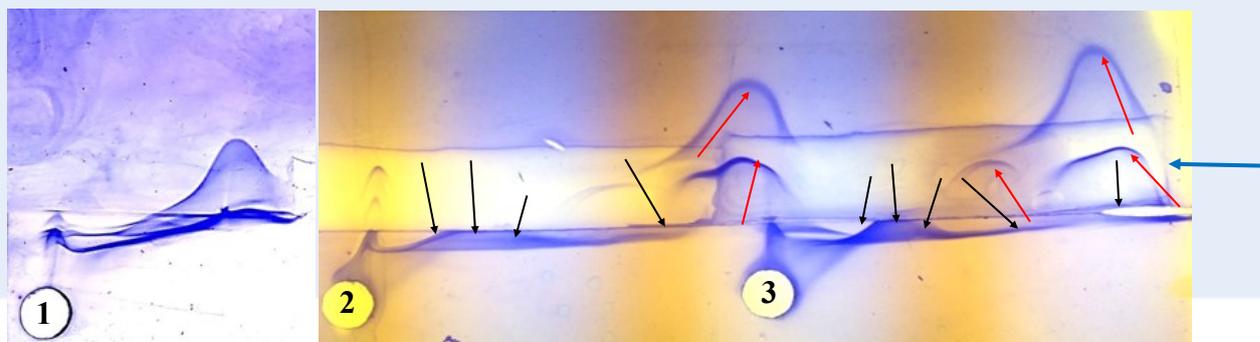


Рисунок 1. – Электрофорез в 12%-ном ПААГ-ДСН с иммуноблоттингом

Выявленное в иммуноблоттинге количество общих антигенных полипептидов не отражает число общих неденатурированных антигенов, так как полипептиды могут представлять лишь их фрагменты. В ПИЭФ ПГ, где в реакции участвуют неденатурированные антигены, установлено, что практически все антигены НКУ (CWD) форм МБТ имели полное или частичное родство с антигенами типичных МБТ, что проявлялось образованием горизонтальных преципитатов и увеличением высоты пиков (рисунок 2).

Что касается изменения антигенного состава МБТ при трансформации в НКУ формы, то оно, скорее всего, происходит одинаково у разных штаммов. Так, спектр антигенных полипептидов у изолятов, предположительно происходящих от *M. tuberculosis*, не отличался от спектра экспериментально полученного НКУ (CWD) *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (рисунок 3). Это подтверждали и результаты ПИЭФ ПГ с неденатурированными антигенами соникатов изолятов и культур опухолевых клеток (рисунок 4).



1 – результат ПИЭФ без промежуточного геля (контроль);

2 – в ПГ введено 100 мкл сониката *M. bovis* 8;

3 – в ПГ введено 100 мкл сониката *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (синяя стрелка – ПГ);  
черные стрелки – общие антигены, образующие базовые (горизонтальные) преципитаты;  
красные стрелки – преципитаты, находящиеся выше преципитатов в контрольном спектре)

**Рисунок 2. – ПИЭФ ПГ сониката НКУ CWD «Br 2» (в круглых лунках).**

**В гель II направления внесена а/с к НКУ CWD «Br 2»**

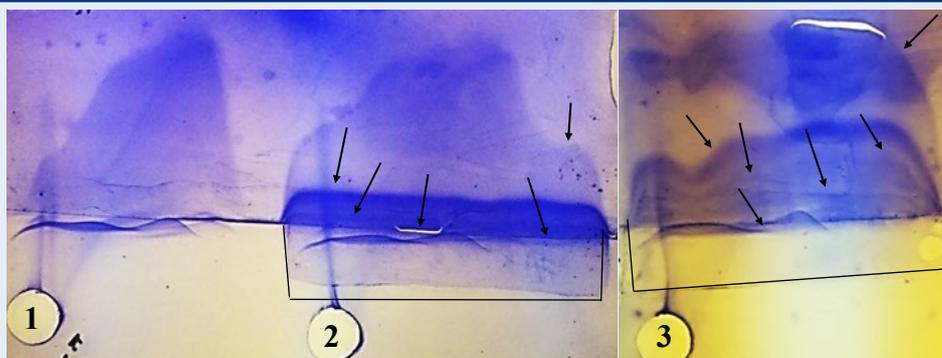


1 – НКУ (CWD) *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv; 2 – изолят из крови человека с латентной туберкулезной инфекцией; 3 – изолят из крови человека с аденокарциномой предстательной железы

**Рисунок 3. – ЭФ в 12%-ном ПААГ-ДСН и иммуноблоттинг с антисывороткой к НКУ (CWD) *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (1:80)**

Сравнение антигенного состава соникатов типичного штамма *M. bovis* 8 и экспериментально полученного НКУ (CWD) *M. bovis* 8 показало, что последний в ИФА реагировал с антисывороткой к родительскому штамму, разведенной 1:5120 (таблица 2). С гомологичной антисывороткой соникат НКУ (CWD) *M. bovis* 8 закономерно давал более интенсивные реакции.

По разнице показателей S/neg можно было предположить, что суммарное антигенное родство составляло не менее 44 %, а если судить об антигенном родстве *M. bovis* 8 и экспериментально полученного штамма НКУ (CWD) *M. bovis* 8 по результатам ИФА сониката *M. bovis* 8 с антисыворотками к этим штаммам, то по суммарным показателям S/neg, оно могло достигать 82 % (таблица 3).



1 – ПИЭФ без промежуточного геля (контроль); 2 – в ПГ введено 100 мкл сониката изолята из культуры Т-лимфоцитов больного Т-лимфобластной лейкемией (Jurkat); 3 – в ПГ введено 100 мкл сониката изолята из культуры клеток аденокарциномы матки HeLa

**Рисунок 4. – ПИЭФ ПГ сониката НКУ (CWD) *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (в круглых лунках). ПГ обозначен черными линиями. В гель II направления внесена а/с к НКУ (CWD) *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (стрелки – общие антигены, образующие базовые (горизонтальные) преципитаты)**

Таблица 2. – Результаты ИФА сониката НКУ (CWD) *M. bovis* 8 с антисыворотками к НКУ (CWD) *M. bovis* 8 и к типичному штамму *M. bovis* 8

Разведения а/с	Соникат НКУ (CWD) <i>M. bovis</i> 8				
	нормальная сыворотка	а/с к НКУ(CWD) <i>M. bovis</i> 8		а/с к <i>M. bovis</i> 8	
	ОП	ОП	S/neg	ОП	S/neg
1:40	888	2031	2,3	1349	1,5
1:80	900	2568	2,9	1894	2,1
1:160	528	2658	5,0	1801	3,4
1:320	336	2643	7,9	1567	4,7
1:640	415	3275	7,9	1386	3,3
1:1280	303	2887	9,5	986	3,3
1:2560	279	2462	9,0	724	2,6
1:5120	204	2916	14,3	1028	5,0

Таблица 3. – Результаты ИФА сониката *M. bovis* 8 с антисыворотками к НКУ(CWD) *M. bovis* 8 и к типичному штамму *M. bovis* 8

Разведения а/с	Соникат <i>M. bovis</i> 8				
	нормальная сыворотка	а/с к НКУ(CWD) <i>M. bovis</i> 8		а/с к <i>M. bovis</i> 8	
	ОП	ОП	S/neg	ОП	S/neg
1:40	342	2064	5,9	2384	7,0
1:80	326	2514	7,7	2534	7,8
1:160	263	2584	9,8	2520	9,6
1:320	400	2640	6,6	2629	6,6
1:640	380	2556	6,7	3056	8,0
1:1280	400	2446	6,1	2984	7,5
1:2560	408	2068	5,1	3038	7,5
1:5120	140	1841	13,2	2568	18,3

Что касается антигенного состава НКУ форм, которые, скорее всего, происходили от *M. bovis*, то он практически не от-

личался от антигенного состава экспериментально полученного штамма *M. bovis* 8 (рисунок 5).



1 – НКУ (CWD) *M. bovis* 8;  
 2 – изолят из лимфатического узла коровы, больной туберкулезом;  
 3 – изолят из молока коровы, больной туберкулезом

**Рисунок 5. – ЭФ в 10%-ном ПААГ-ДСН и иммуноблоттинг с антисывороткой к НКУ (CWD) *M. bovis* 8 (1:80)**

Сравнение антигенного состава НКУ и типичных форм МБТ и НТМБ в ИФА показало, что соникат *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv давал выраженные перекрестные реакции с антисывороткой к *M. avium* (1:2560, таблица 4). В то же время соникат НКУ (CWD) *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv интенсивно реагировал с антисывороткой к типичному штамму *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (1:2560), но с антисывороткой к *M. avium* 1603 давал лишь слабые реакции (S/neg в разведении 1:40–1,6) (таблица 5). Эти результаты подтверждали значительное антигенное родство НКУ (CWD) *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv с типичным

родительским штаммом и гораздо меньшее – с *M. avium*. То есть в процессе трансформации заметно уменьшалось количество перекрестно реагирующих антигенов. Вместе с тем у трансформированных МБТ сохранялись антигены, специфичные только для комплекса *tuberculosis-bovis*. Это подтверждало то, что сыворотки крови кроликов, иммунизированных изолятами НКУ (CWD) МБТ из разных источников, реагировали в ИФА тест-системе Iddex *M. bovis* АВ с рекомбинантными антигенами МРВ 70 и МРВ 83 (рисунок 6).

Таблица 4. – Результаты ИФА сониката *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv с антисыворотками к *M. avium* 1603 и *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv

Разведения а/с	Соникат <i>M. tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv				
	нормальная сыворотка	а/с <i>M. avium</i> 1603		а/с <i>M. tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv	
		ОП	ОП	S/neg	ОП
1:20	554	1320	2,4	1064	1,9
1:40	600	1341	2,2	1428	2,4
1:80	600	1358	2,3	1358	2,3
1:160	642	1373	2,1	1376	2,1
1:320	594	1303	2,2	1337	2,3
1:640	389	1232	3,2	1388	3,6
1:1280	283	1156	4,1	1357	4,8
1:2560	296	1091	3,7	1357	4,6

В целом изоляты из самых разных источников, идентифицированные как НКУ (CWD) МБТ, обладали очень близким или практически идентичным антигенным составом. На рисунке 7 представлены результаты ПИЭФ сониката изолята из мозга козы со спонгиозными изменениями «Br 2» с гомологичной антисывороткой, где в промежуточный гель внесена антисыворотка к изоляту из крови человека больного сарко-

мой «D». Как видно, основная часть образующихся преципитатов опущена в ПГ. Это указывает на то, что антисыворотки к «Br 2» и «D» содержат антитела к идентичным антигенам. Кроме того, 3 пика были выше (красные стрелки), то есть в антисыворотке «D» были антигены в комплексе с антителами, идентичными антигенам изолята «Br 2» [15].

Близость антигенных составов изолятов была установлена и при их непосредственном сравнении. В частности, соникаты изолятов из опухолей животных и культуры клеток аденокарциномы человека в РИД (рисунок 8) с антисывороткой к НКУ (CWD) *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv и соникатом НКУ (CWD) *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv образовывали плавно сливающиеся преципитаты, что указывало на их одинаковый антигенный состав, хотя незначительные отличия

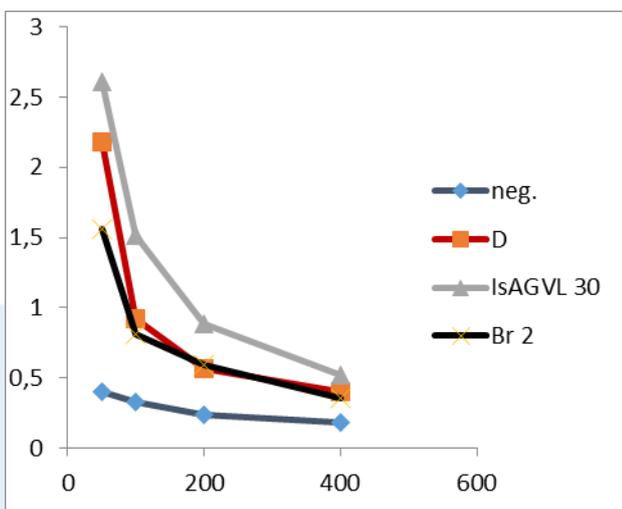
могли касаться «минорных» антигенов. В частности, в ПИЭФ ПГ сониката НКУ (CWD) МБТ «Br 2», с гомологичной антисывороткой и изолята из крови коровы BLV+ было заметно, что основная часть их антигенов была идентичной, на что указывало образование мощных горизонтальных преципитатов, но несколько «минорных» антигенов были характерны только НКУ (CWD) МБТ «Br 2» (рисунок 9).

Таблица 5. – Результаты ИФА сониката НКУ (CWD) *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv с антисыворотками к *M. avium* 1603 и *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv

Разведения а/с	Соникат CWD <i>M. tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv				
	нормальная сыворотка	а/с <i>M. avium</i> 1603		а/с <i>M. tuberculosis</i> H <sub>37</sub> Rv	
		ОП	ОП	S/neg	ОП
1:20	200	331	1,7	584	2,9
1:40	200	320	1,6	698	3,5
1:80	200	274	1,4	487	2,4
1:160	237	232	1,0	489	2,1
1:320	161	206	1,3	423	2,6
1:640	122	182	1,5	314	2,6
1:1280	110	144	1,3	252	2,3
1:2560	94	123	1,3	187	2,0

Для выявления туберкулезной инфекции используют препараты, представляющие комплексы или отдельные антигены МБТ. Полученные результаты о близком антигенном родстве типичных и НКУ (CWD) МБТ позволяют считать, что если инфекция вызвана такими трансформированными формами, то в иммунологических

тестах возможно получение положительных результатов без клинических признаков туберкулеза. Это подтвердил опыт по заражению морских свинок НКУ (CWD) МБТ, полученных при восстановлении жизнеспособности *M. bovis*, инактивированного глутаровым альдегидом [24].



neg. – отрицательная контрольная сыворотка;  
соникаты изолятов:  
D – из крови человека, больного саркомой;  
IsAGVL 30 – из FLK-BLV;  
Br 2 – из мозга козы  
с губкообразными изменениями

Рисунок 6. – Исследование антисывороток к изолятам НКУ (CWD) МБТ в ИФА с тест-системой Iddex *M. bovis* АВ (ось абсцисс – разведение антисывороток, ось ординат – ОП при 450 нм)

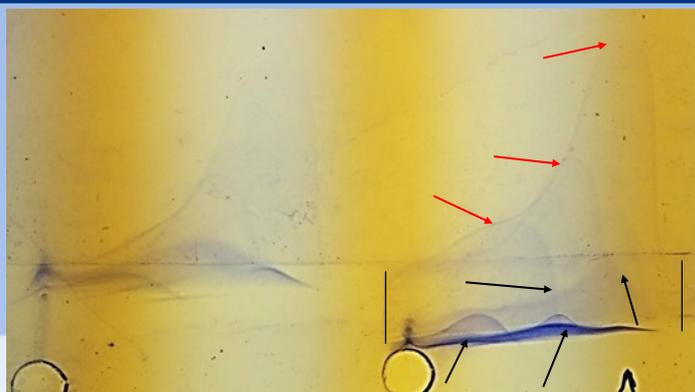
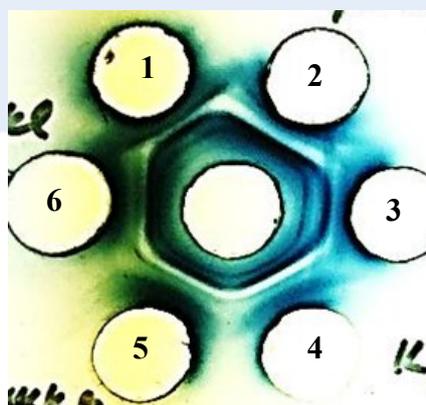


Рисунок 7. – ПИЭФ ПГ сониката НКУ (СWD) МБТ «Вг 2» (в круглых лунках) с гомологичной антисывороткой. В ПГ (выделен черными линиями) внесено 30 мкл антисыворотки к изоляту из крови человека, больного саркомой «D» (черные стрелки – антигены, образующие базовые (горизонтальные) преципитаты, красные стрелки – преципитаты, находящиеся выше преципитатов в контрольном спектре



1 – НКУ (СWD) *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv; НКУ (СWD) МБТ;  
2 – из опухоли кишечника крысы (деконтаминация щавелевой кислотой);  
3 – из культуры клеток аденокарциномы HeLa;  
4 – из опухоли толстого кишечника крысы (0,22 мкм);  
5 – из опухоли молочной железы кошки (0,22 мкм);  
6 – из крови кота FeLv+ (0,22 мкм)

Рисунок 8. – РИД а/с к НКУ (СWD) *M. tuberculosis* H<sub>37</sub>Rv (в центре) с соникатами



Рисунок 9. – ПИЭФ ПГ сониката НКУ (СWD) МБТ «Вг 2» (в круглых лунках) с гомологичной антисывороткой. В ПГ внесен соникат изолята из крови коровы, больной лейкозом (белые стрелки – общие антигены, образующие горизонтальные преципитаты, черные стрелки – преципитаты «минорных» антигенов, отсутствующие у изолята из крови коровы BLV+)

Оказалось, что инфицированные животные слабо реагировали на туберкулины для млекопитающих и птиц (папулы 5–7 мм), но у них развивался выраженный гу-

моральный ответ на соникат типичного штамма *M. bovis* (титры в ИФА 1:2560–1:5120), причем более выраженный, чем на *M. avium* (таблица 6).

Таблица 6. – ИФА крови морских свинок, зараженных изолятами НКУ (CWD) МБТ, полученными при восстановлении жизнеспособности *M. bovis*, инактивированного глутаровым альдегидом, с соникатами *M. avium* и *M. bovis* (ОП – оптическая плотность, S/neg – отношение ОП пробы к ОП отрицательного контроля)

Разведение сывороток	Морская свинка № 1				Морская свинка № 2			
	<i>M. avium</i>		<i>M. bovis</i>		<i>M. avium</i>		<i>M. bovis</i>	
	ОП	S/neg	ОП	S/neg	ОП	S/neg	ОП	S/neg
1:40	0,923	2,1	1,801	<b>6,4</b>	1,199	2,6	1,527	<b>5,5</b>
1:80	0,1041	3,3	1,235	<b>8,4</b>	1,392	4,5	1,5871	<b>10,6</b>
1:160	0,792	3,3	1,304	<b>6,9</b>	1,114	4,6	1,753	<b>9,3</b>
1:320	0,638	2,4	1,037	<b>5,5</b>	0,744	2,8	1,084	<b>5,7</b>
1:640	0,446	3,1	0,584	<b>4,3</b>	0,447	3,1	0,634	<b>4,7</b>
1:1280	0,319	2,5	0,365	<b>2,9</b>	0,374	2,5	0,567	<b>4,6</b>
1:2560	0,308	2,4	0,304	<b>2,5</b>	0,343	2,7	0,417	<b>3,2</b>
1:5120	0,246	1,9	0,235	<b>1,8</b>	0,312	2,4	0,279	<b>2,2</b>

### ВЫВОДЫ

1. Суммарное антигенное родство не-кислотоустойчивых форм (с дефектной клеточной стенкой) микобактерий туберкулеза с типичной родительской формой по степени перекрестных реакций в ИФА составляет 53–82 %, что связано с наличием в их составе полностью или частично идентичных антигенов.

2. В антигенном составе не-кислотоустойчивых форм (с дефектной клеточной стенкой) микобактерий туберкулеза обнаружены наиболее специфичные для комплекса tuberculosis-bovis антигены МРВ 70 и МРВ 83.

3. В составе не-кислотоустойчивых форм (с дефектной клеточной стенкой) микобактерий туберкулеза гораздо меньше антигенов, общих с антигенами микобакте-

рий птичьего вида, чем у типичных родительских штаммов.

4. В иммуноблоттинге с антисыворотками к типичным штаммам *M. tuberculosis* и *M. bovis* реагирует как минимум 16–18 отдельных антигенных полипептидов не-кислотоустойчивых форм (с дефектной клеточной стенкой) микобактерий туберкулеза, причем их спектр одинаковый у экспериментально полученных штаммов и клинических изолятов, что может быть использовано для их идентификации.

5. При инфекции, вызванной не-кислотоустойчивыми формами (с дефектной клеточной стенкой) микобактерий туберкулеза, развивается выраженный гуморальный иммунный ответ, который может быть выявлен диагностикумами, приготовленными из типичных микобактерий.

### ЛИТЕРАТУРА

1. Скрыто протекающая туберкулезная инфекция / З. С. Земскова [и др.]. – М. : Медицина, 1984. – С. 28–34.
2. Mattman, L. H. Cell wall deficient forms: stealth pathogens / L. H. Mattman. – 3rd ed. – Boca Raton : CRC Press, 2001. – 416 p.
3. Власенко, В. В. Туберкулез в фокусе проблем современности / В. В. Власенко. – Винница : Наука, 1998. – 350 с.
4. Tefu, H. G. Lin. Mycobacterium tuberculosis L-forms / H. G. Tefu Lin // Microbial Ecology in Health and Disease. – 1999. – Vol. 10, № 3–4. – P. 129–133.

5. Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review / V. Beran [et al.] // *Veterinárni Medicína*. – 2012. – Vol. 51, № 7. – P. 365–389.
6. Formation of Persisting Cell Wall Deficient Forms of *Mycobacterium bovis* BCG during Interaction with Peritoneal Macrophages in Guinea Pigs / N. Markova [et al.]. – 2008. – Vol. 4. – P. 1–10.
7. Markova, N. Unique biological properties of *Mycobacterium tuberculosis* L-form variants: impact for survival under stress / N. Markova, G. Slavchev, L. Michailova // *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*. – 2012. – Vol. 15, № 2. – P. 61–68.
8. Cross-reactions between mycobacteria. II. Crossed immunoelectrophoretic analysis of soluble antigens of BCG and comparison with other mycobacteria / M. Harboe [et al.] // *Scandinavian journal of immunology*. – 1979. – Vol. 9, № 2. – P. 115–124.
9. Лысенко, А. П. Антигены *Mycobacterium bovis* и атипичных микобактерий, изучение и применение для дифференциальной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота : дис. ... д-ра ветеринар. наук : 16.00.03 / А. П. Лысенко. – Минск, 1994. – 35 с.
10. Fifis, T. Soluble *Mycobacterium bovis* protein antigens: Studies on their purification and immunological evaluation / T. Fifis, J. S. Rothel, P. R. Wood // *Veterinary Microbiology*. – 1994. – Vol. 40, № 1. – P. 65–81.
11. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* Antigens of High Serodiagnostic Value / G. C. Ireton [et al.] // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2010. – T. 17. – № 10. – С. 1539–1547.
12. Morphological, biological, and immunological studies on isolates from tumors and leukemic bloods / F. B. Seibert [et al.] // *Annals of the New York Academy of Sciences*. – 1970. – Vol. 174, № 2. – P. 690–728.
13. Новик, Т. П. Биологические свойства термически обработанных микобактерий: дисс. ... канд. биол. наук / Т. П. Новик. – Минск : Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского, 2010. – 138 с.
14. Особенности антигенного состава измененных форм микобактерий туберкулеза / А. П. Лысенко [и др.] // *Проблемы туберкулеза и болезней легких*. – 2010. – № 10. – С. 54–58.
15. *A manual of quantitative immuno-electrophoresis: methods and applications* / ed. N. H. Axelsen. – Oxford: Blackwell, 1977. – 169 p.
16. CWD tuberculosis found in spongiform disease formerly attributed to prions: its implication towards mad cow disease, scrapie and Alzheimer's / A.P. Lysenko [et al.] // *Journal of Molecular Pathological Epidemiology*. – 2017. – Vol. 3, № 3. – P. 1–13.
17. Вероятная связь миелоидного и лимфобластного лейкоза с туберкулезной инфекцией / А. П. Лысенко [и др.] // *Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария*. – 2020. – № 1. – С. 23–38.
18. Возможная роль туберкулезной инфекции в возникновении опухолей / А. П. Лысенко [и др.] // *Экология и животный мир*. – 2020. – № 1. – С. 53–69.
19. Further evidence for cancer as cell-wall-deficient mycobacterial disease / A. P. Lysenko [et al.] // *Journal of Molecular Pathological Epidemiology*. – 2016. – Vol. 1, № 1. – P. 1–12.
20. Обнаружение маркеров скрытой туберкулезной инфекции в ультрапастеризованном молоке, произведенном в разных странах / А. П. Лысенко [и др.] // *Экология и животный мир*. – 2021. – № 2. – С. 13–25.
21. The tuberculin skin test: How safe is safe? – The tuberculins contain unknown forms capable of reverting to cell-wall-deficient mycobacteria / A. P. Lysenko [et al.] // *Clinical and Experimental Medical Sciences*. – 2014. – Vol. 2. – P. 55–73.
22. Неопластические заболевания мелких животных и скрытая туберкулезная инфекция / А. П. Лысенко [и др.] // *Экология и животный мир*. – 2022. – № 1. – С. 20–32.
23. Вирус бычьего лейкоза – вирусоподобная форма микобактерий туберкулеза? / А. П. Лысенко [и др.] // *Экология и животный мир*. – 2019. – № 1. – С. 15–24.
24. Микобактерии туберкулеза после летального воздействия дезинфектантов могут восстанавливать жизнеспособность в виде микобактерий с дефектной клеточной стенкой / А. Э. Высоцкий [и др.] // *Эпизоотология, иммунобиология, фармакология, санитария*. – 2019. – № 2. – С. 26–35.