

Министерство здравоохранения Украины
ОДЕССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

На правах рукописи

УДК 579.61: 616 - 078: 579.873.21

ГРУЗЕВСКИЙ Александр Анатольевич

ИЗУЧЕНИЕ ВИДОСПЕЦИФИЧНОСТИ ПОВЕРХНОСТНЫХ
КОМПОНЕНТОВ *Mycobacterium kansasii*
(экспериментальное исследование)

03.00.07 – микробиология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата
медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук,
доцент П.З. Протченко

Одесса - 2000

ОГЛАВЛЕНИЕ

стр.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	14
1.1 Фотохромогенные микобактерии, их место среди других микобактерий. Распространение, эпидемиология, биологические свойства.....	14
1.2 Клиническое значение фотохромогенных микобактерий.....	19
1.3 Основные подходы к диагностике заболеваний, вызванных атипичными микобактериями.....	21
РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	30
2.1 Методы получения экстрактов <i>M. kansasii</i>	30
2.2 Методы изучения физико-химических свойств экстрактов <i>M. kansasii</i>	35
2.3 Методы фракционирования экстрактов <i>M. kansasii</i> и анализа полученных фракций.....	42
2.4 Методы изучения антигенных свойств экстрактов <i>M. kansasii</i> и полученных фракций.....	48
2.4.1 Иммунизация лабораторных животных.....	48
2.4.2 Техника реакции преципитации в геле.....	50
2.4.3 Техника иммуноэлектрофореза.....	52
РАЗДЕЛ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	54
3.1. Изучение условий экстрагирования поверхностных компонентов атипичных микобактерий.....	54
3.1.1. Обоснование выбора экстрагирующего раствора для получения поверхностных компонентов <i>M. kansasii</i>	54

3.1.2. Исследование оптимальных условий экстрагирования поверхностных компонентов микобактерий.....	58
3.1.3. Освобождение экстрактов поверхностных компонентов от детергентов.....	61
3.1.4 Контроль целостности бактериальных клеток после экстрагирования.....	63
3.1.5. Сравнительная характеристика антигенных свойств экстрактов, полученных с применением различных детергентов и их комбинаций.....	65
3.2 Изучение экстрактов <i>M. kansasii</i> методом электрофореза в полиакриламидном геле.....	68
3.3 Изучение физико – химических свойств экстрактов микобактерий методом ионообменной хроматографии.....	72
3.3.1. Использование ионообменной хроматографии для фракционирования экстрактов микобактерий.....	72
3.3.2. Спектрофотометрическое исследование хроматографических фракций экстракта <i>M. kansasii</i>	79
3.3.3 Исследование полученных фракций методом тонкослойной хроматографии.....	82
3.3.4. Исследование хроматографических фракций экстракта <i>M. kansasii</i> методом электрофореза в ПААГ.....	84
3.4 Изучение антигенной структуры экстрактов <i>M. kansasii</i>	89
3.4.1 Изучение антигенной активности фракций экстракта <i>M. kansasii</i> и его фракций в РПГ.....	89
3.4.2 Изучение антигенной активности экстракта <i>M. kansasii</i> и его фракций методом иммуноэлектрофореза.....	94
3.4.3 Индикация видоспецифических компонентов в хроматографических фракциях экстракта <i>M. kansasii</i>	100

3.4.4 Сравнительное изучение антигенной структуры фракций, которые могут содержать видоспецифические компоненты.....	103
РАЗДЕЛ 4. АНАЛИЗ И ОБОБЩЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	108
ВЫВОДЫ.....	122
ЛИТЕРАТУРА.....	124

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- ВИЧ – вирус иммунодефицита человека
- ГЖХ – газожидкостная хроматография
- ГЗТ – гиперчувствительность замедленного типа
- ГНТ – гиперчувствительность немедленного типа
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- кДа – килодальтоны
- ККМ – критическая концентрация мицеллообразования
- МКА – моноклональные антитела
- НК – нуклеиновые кислоты
- НОЖ – надосадочная жидкость
- ПААГ – полиакриламидный гель
- ПАСК – пара – аминсалицилат натрия
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- РНК – рибонуклеиновая кислота
- РПГ – реакция преципитации в геле
- ТЕМЕД – тетраметилэтилендиамин
- ТРИС – трис – (оксиметил) – аминометан
- ХНЗЛ – хронические неспецифические заболевания легких
- ХПН – хроническая почечная недостаточность
- кДа – килодальтоны
- IgM – десятичный логарифм относительной молекулярной массы
- M_r – относительная молекулярная масса
- M. kansasii* - *Mycobacterium kansasii*
- PPD – protein purified derivative
- SDS (ДСН) – sodium dodecylsulfate – натрия додецилсульфат

ВВЕДЕНИЕ

Проблема борьбы с туберкулезом и микобактериальными инфекциями, считавшаяся близкой к своему разрешению, в последние годы становится все более актуальной во всем мире [85, 159, 168]. По данным Всемирной Организации Здравоохранения треть населения во всем мире инфицирована туберкулезом, а в некоторых странах инфицирование достигает 80 % [44, 145]. В настоящее время в мире зарегистрировано 30 млн. больных активным туберкулезом, ежегодно выявляется 10 млн. новых случаев заболевания, и каждый год 3 млн. человек умирает от туберкулеза. Смертность от этого заболевания достигает 6 % смертельных исходов от всех заболеваний в мире [36].

Туберкулез в Украине, по мнению многих специалистов, представляет национальную опасность, так как его распространение носит эпидемический характер [44, 56, 68]. Более того, 2-й съезд фтизиатров Украины оценил эпидемическую ситуацию по туберкулезу как вышедшую из-под контроля [51]. В отличие от экономически развитых стран, туберкулез в Украине является наиболее распространенным инфекционным заболеванием, занимающим первое место по смертности людей от инфекционной патологии [36]. Если с 1985 по 1990 годы заболеваемость всеми формами туберкулеза уменьшилась со 115 до 32 на 100000 населения, то за 1990 – 1996 годы заболеваемость увеличилась с 32 до 45,8 на 100000 населения, то есть на 43,1 %. Эта тенденция сохраняется во всех областях Украины [36, 67]. Заболеваемость всеми формами туберкулеза у детей с 1990 по 1995 год увеличилась на 39 % [44]. Ухудшение эпидемиологической обстановки по туберкулезу требует от здравоохранения дальнейшего изучения причин увеличения заболеваемости, что, в свою очередь, предполагает совершенствование методов диагностики.

Актуальность проблемы. Тот факт, что клиническая картина туберкулеза претерпела значительные изменения по сравнению с классическими описаниями, объясняется в литературе многими причинами. Наиболее вероятными признаются изменения экологической обстановки, влияющие как на макроорганизм, так и на микробную популяцию, иммунодефицитные состояния, формирование лекарственной устойчивости и селекция наиболее жизнеспособных штаммов возбудителя, миграционные процессы, ограниченность национальных противотуберкулезных программ в развивающихся странах, относительно широкое использование иммунодепрессивных лекарственных средств, социальные факторы (наркомания, увеличение числа бездомных, алкоголизм) [11, 98].

Среди причин изменения клинического течения туберкулеза важное место занимает проблема инфицированности т.н. «атипичными», или «неклассифицируемыми» микобактериями. Со времени классических исследований Е. Н. Runyon (1959) возможная роль нетуберкулезных микобактерий в этиологии заболеваний человека неоднократно оспаривалась [170]. Не считался достоверным даже факт самостоятельного существования “атипичных” микобактерий в природе.

Однако многочисленные исследования данного вопроса показали самостоятельность, эпидемиологическое и эпизоотологическое значение нетуберкулезных микобактерий [177, 178, 201]. Для обозначения заболеваний человека и животных, вызванных “атипичными” микобактериями обычно употребляется термин “микобактериоз”. Возможность инфицирования человека нетуберкулезными микобактериями облегчается в связи с их широким распространением в природе. Так, нетуберкулезные микобактерии обнаруживали в почве, природных и технических водах, домашней пыли и т.д. [99, 135, 137, 149, 204]. Многие исследователи считают резервуаром “атипичных” микобактерий диких и домашних птиц, домашних животных и корма [32, 41, 45].

Данные об относительной частоте микобактериозов среди всех заболеваний человека, вызванных микобактериями, весьма вариабельны, причем колебания зависят от уровня заболеваемости туберкулезом. В США, где он не высок, микобактериозы составляют от 3 до 50%, в Индии и Африке-0,1-0,9 %, по бывшему СССР - 0,6 %, в Прибалтике - 5,6 % , в Молдавии - до 10 % [58].

В Украине, начиная с 1986 года наблюдается неуклонный рост заболеваемости микобактериозами, достигший к 1995 году 3,1 % среди всех заболеваний, вызванных микобактериями [59].

Ухудшение экологической обстановки, сопровождающееся изменением реактивности организма, а также резкое нарастание числа больных с вторичными иммунодефицитными состояниями, особенно СПИД, значительно повышает роль микобактериозов как оппортунистических инфекций [8, 20, 24, 47, 69, 126, 177, 178], а также как инфекций, сопутствующих саркоидозу и ХНЗЛ [29].

Учитывая интересы клинической практики, были предприняты попытки создать единую классификацию микобактерий. Наибольшее распространение получила классификация Е. Н. Runyon (1959) [170]. В соответствии с этой классификацией выделяют 4 группы микобактерий: фотохромогенные микобактерии - микобактерии, образующие при росте на свету оранжевый пигмент; скотохромогенные микобактерии - образуют пигмент при росте в темноте; нехромогенные микобактерии; быстрорастущие сапрофиты.

Значение в инфекционной патологии человека группы фотохромогенных микобактерий оценивается в литературе неоднозначно. Не вызывают сомнения факты выделения у некоторых больных микобактериозом легких *M. kansasii*, причем частота их выделения высока в районах, производящих молоко и молочные продукты [29] и колеблется от 2% до 50% всех микобактериозов [58]. Несмотря на относительно небольшое количество заболеваний, вызванных *M. kansasii*, следует отметить их более тяжелое течение, по сравнению с туберкулезом и другими микобактериозами сходной локализа-

ции. Исход микобактериоза, вызванного *M. kansasii* зависит, в частности, от сроков микробиологической диагностики [61].

Бактериологические методы диагностики затруднены медленным ростом микобактерий, их требовательностью к питательным средам и малой вирулентностью по отношению к лабораторным животным [58, 151]. Биохимические тесты идентификации длительны, трудоемки, требуют дефицитных реактивов, что затрудняет их широкое распространение в практической медицине [30, 61].

Клиническая практика и экономические соображения требуют разработки методов экспресс-диагностики микобактериозов без существенного снижения специфичности. В этом направлении получены определенные положительные результаты. Применяются аллергодиагностика микобактериозов с помощью субстанций, выделенных из микобактерий - сенситинов [12, 35, 39], серодиагностика и серологическая идентификация микобактерий, в том числе с использованием моноклональных антител [4, 37, 80, 140, 141]. Обращают на себя внимание изотопные и молекулярно – генетические методы, среди которых выделяется метод полимеразной цепной реакции [81, 86, 105].

Тем не менее, существующие методы диагностики не могут считаться в полной мере разработанными, два же последних метода рекомендуются, главным образом, иностранными авторами и требуют сложного оборудования и труднодоступных реагентов. Высокая степень антигенного родства между микобактериями значительно усложняет выявление и выделение видоспецифичных антигенов, пригодных для приготовления диагностических тест-систем. Возможен подход к разрешению данной проблемы путем альтернативного отграничения туберкулезных и нетуберкулезных микобактерий, без дифференцирования "атипичных" микобактерий друг с другом. Этот подход отвечает скорейшему разрешению народно-хозяйственных задач в сфере ветеринарии и, в известной мере, эпидемиологии микобактериозов. В медицинской же практике необходима точная диагностика с видовой идентификацией

возбудителя. А это требует углубленного изучения антигенной структуры микобактерий. Данные литературы свидетельствуют о том, что такой подход уже разрабатывался рядом исследователей, однако исследовалась сложная, многокомпонентная система антигенов и субстанций, не обладающих антигенными свойствами [5, 38, 39, 66]. Она была получена путем разрушения бактериальных клеток и представляла собой совокупность поверхностных, цитоплазматических и ядерных антигенов, что затрудняло ее анализ и интерпретацию получаемых результатов [35].

Более целесообразным представляется подход, предполагающий изучение антигенов как нативных, так и инактивированных, но не разрушенных клеток. Данные литературы касаются, в основном, цитоплазматических антигенов, поверхностные же антигены изучены в меньшей степени. Имеются единичные сообщения о том, что видоспецифические компоненты могут находиться и среди поверхностных структур [107, 109, 110, 130, 197]. В ходе инфекционного процесса организм реагирует, в первую очередь, именно на поверхностные антигены. Кроме того, именно поверхностные антигены служат основными для серологической идентификации и экспресс-индикации микроорганизмов. Эти соображения и определяют постановку цели и задач исследований.

Связь работы с научными программами, планами, темами. Диссертационная работа является фрагментом плановой научной работы кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии Одесского государственного университета № 0199U002025 “Изучение видоспецифических белоксодержащих поверхностных компонентов микобактерий с целью создания диагностической тест-системы”. Отдельные части диссертации были фрагментами плановых научных работ Одесского института клинической биохимии и санитарии животных УААН № 01.01.02 “Идентифицировать, выделить и изучить специфические детерминанты микобактерий туберкулеза” и № 01.06.2 “Изучить антигенную структуру атипичных микобактерий с использованием ИФА-

методов и выделить видоспецифические антигены с целью разработки антигенных диагностикумов”. Автор является исполнителем перечисленных комплексных тем.

Цель и задачи исследования. Цель работы – выделить поверхностные компоненты *M. kansasii* и изучить наличие среди них видоспецифических антигенов, пригодных для индикации и идентификации *M. kansasii*. Достижение поставленной цели осуществлялось путем решения следующих задач:

1. Получить протеиновые компоненты *M. kansasii* путем экстрагирования бактериальной массы и иммунные сыворотки к ним путем иммунизации кроликов.

2. Провести фракционирование экстрактов *M. kansasii* для выделения компонентов с антигенными свойствами.

3. Изучить антигенную структуру нативных и фракционированных экстрактов *M. kansasii* в серологических реакциях.

4. Провести сравнительный анализ антигенной структуры экстрактов *M. kansasii* и представителей других групп микобактерий.

5. Провести оценку видоспецифичности выделенного компонента при изучении состава микобактерий разных штаммов этого вида и других видов микобактерий.

Объект исследования – *Mycobacterium kansasii*.

Предмет исследования – антигенная структура *Mycobacterium kansasii*.

Методы исследования - бактериологические - посев и накопление бактериальной массы *M. kansasii*; физико-химические – экстрагирование компонентов микобактерий, электрофоретическое фракционирование, обессоливание путем гель-хроматографии, ионообменная хроматография для выделения отдельных компонентов, спектрофотометрия, определение белка по методу Lowry и Bradford; иммунологические - иммунизация лабораторных животных

для получения иммунных сывороток, реакция преципитации в геле, иммуноэлектрофорез.

Научная новизна полученных результатов: Впервые обоснована возможность выделения поверхностных компонентов *M. kansasii* в неденатурирующих условиях без существенного разрушения микробных клеток. Среди полученных компонентов установлено наличие видоспецифических антигенов, которые могут быть использованы для индикации и межвидовой дифференциации *M. kansasii*.

Практическое значение полученных результатов: на основе выделенных видоспецифических компонентов *M. kansasii* возможна разработка диагностикума для быстрой и качественной идентификации микобактерий в эксперименте и клинике. Полученные результаты указывают на перспективность дальнейших исследований состава поверхностных компонентов микобактерий с целью совершенствования дифференциальной диагностики микобактериозов. Основные результаты проведенных исследований используются в учебных программах по микробиологии и фтизиатрии в Национальной фармацевтической академии Украины, в Одесском государственном медицинском университете, во Львовском государственном медицинском университете им. Д. Галицкого, в Луганском государственном медицинском университете, Крымском государственном медицинском университете им. С.И. Георгиевского, Ивано-Франковской медицинской академии, Тернопольской государственной медицинской академии им. И.Я. Горбачевского, Буковинской государственной медицинской академии.

Личный вклад соискателя. Автором лично был осуществлен патентно-информационный поиск, в том числе с привлечением электронных средств, определены цель и задачи исследования, методические подходы, отработаны модели, в соответствии с которыми лично выполнены экспериментальные исследования. Проведено оформление полученных результатов в виде таблиц

и графиков, осуществлен их анализ, сформулированы выводы работы. Автором разработан метод получения поверхностных компонентов *Mycobacterium kansasii* в мягких условиях путем последовательного применения детергентов разной химической природы без заметного разрушения бактериальных клеток. Отработаны условия разделения экстрактов поверхностных протеинов на отдельные фракции (совместно с Филиповским А.В.), проведен анализ химического состава и антигенной специфичности полученных фракций. Проведенные исследования позволили выявить компонент *M. kansasii*, который на данном этапе может считаться видоспецифическим. Автором разработаны условия выделения видоспецифического компонента из экстракта поверхностных структур *Mycobacterium kansasii*. Все положения и выводы диссертации принадлежат автору. Автором написаны лично или в соавторстве с д.мед.н. Протченко П.З., к.мед.н. Созіновим В.А., Александровой Л.Н., Филиповским А.В. все печатные работы, которые имеют отношение к теме диссертации.

Апробация работы и публикации по теме диссертации. Результаты работы отражены в 9 научных работах, в том числе в 6 журнальных статьях, из которых 1- в иностранном журнале, 1 – в сборнике научных трудов.

Результаты работы были доложены и обсуждались на:

XIII съезде Украинского научного общества микробиологов, эпидемиологов и паразитологов им. Д.К. Заболотного (Киев – Винница, 1996);

Научно-практической конференции молодых ученых и студентов, посвященной IV конгрессу СФУЛТ (Одесса, 1996);

Конференции “Актуальные проблемы микробиологии, вирусологии и иммунологии” (Харьков, 1998);

Пленуме Украинского научного общества микробиологов, эпидемиологов и паразитологов им. Д.К. Заболотного “Научные и практические аспекты борьбы с инфекциями в Украине на рубеже столетий” (Одесса, 2000).

РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Фотохромогенные микобактерии, их место среди других микобактерий. Распространение, эпидемиология, биологические свойства

Начиная с 60 - х годов нашего столетия, когда появились первые сообщения о заболеваниях человека, обусловленных «неклассифицированными» микобактериями, значение их в патологии человека постоянно возрастает. В настоящее время атипичные микобактерии нередко выступают на первый план, обуславливая формирование оппортунистических инфекций при иммунодефицитных состояниях [8, 47, 79, 96, 126, 153, 182].

Универсальная схема исследования с целью распознавания микобактерий не разработана, что затрудняет их классификацию. Наиболее часто исследуемыми являются: скорость и характер роста на питательных средах, образование пигментов, рост при повышенной либо пониженной температуре, биохимические тесты, газожидкостная хроматография (ГЖХ) [15, 83, 99, 180, 191].

В Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (9th edition) насчитывается 45 видов микобактерий [83].

По данным М.П. Зыкова и Т.Б. Ильиной, в разные годы были предложены классификации, основанные на генетическом родстве микобактерий, например, классификация по Bugaczewska (1964), а также базирующиеся на биохимических свойствах микобактерий и на математическом методе сравнения отдельных свойств - нумерическая таксономия [13, 29]. Делаются попытки применить с целью систематизации микобактерий нуклеотидный состав их ДНК [10, 66, 203]. Однако наиболее употребительной является классификация Runyon (1959), которая учитывает образование каротиноидных пигментов и скорость роста микобактерий [83, 155, 170]. В соответствии с этой классификацией выделяют следующие группы микобактерий (табл. 1).

Таблица 1.

Классификация микобактерий

Группа	Подгруппа	Представители
Туберкулезные	Туберкулезные микобактерии	<i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i>
Атипичные микобактерии	Фотохромогенные – образуют пигмент при росте на свету	<i>M. kansasii</i> (var. <i>Aurantiacum</i> , <i>luciflavum</i> , <i>album</i>), <i>M. marinum</i> (<i>M. balnei</i>), <i>M. simiae</i> , <i>M. ulcerans</i>
	Скотохромогенные – образуют пигмент при росте в темноте	<i>M. gordonae</i> (<i>M. aquae</i>), <i>M. scrofulaceum</i> (<i>M. marianum</i>), <i>M. szulgai</i> , <i>M. flavescens</i> .
	Нехромогенные микобактерии	<i>M. avium</i> , <i>M. paratuberculosis</i> , <i>M. intracellulare</i> (<i>M. battey</i>), <i>M. lepraemurium</i> , <i>M. xenopi</i> , <i>M. terrae</i> , <i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. radish</i> , <i>M. triviale</i> .
	Быстрорастущие микобактерии	<i>M. fortuitum</i> (<i>M. minetti</i> , <i>M. ranae</i> , <i>M. peregrinum</i> , <i>M. parafortuitum</i> , <i>M. giae</i>), <i>M. chelonae</i> , <i>M. phlei</i> , <i>M. smegmatis</i> , <i>M. friedmanii</i> (<i>M. borstelense</i> , <i>M. abscessus</i>), <i>M. diernhoferi</i> , <i>M. vaccae</i> .
Микобактерии лепры	Микобактерии лепры	<i>M. leprae</i>

Кроме вышеперечисленных, имеется ряд видов, сведения о которых не вполне достаточны для их классификации [199].

Группа фотохромогенных микобактерий характеризуется появлением желто–оранжевого пигмента в клетках (микроскопически) и в культурах

(макроскопически) при экспозиции на свету. Представители этой группы – прямые палочки размером 0.4-0.6 x 5-6 мкм, кислото–спиртоустойчивые, грамположительные, неподвижные, лишенные эндоспор, конидий и капсул. Аэробы, требовательны к питательным средам, растут медленно – в течение 2 - 3 нед при оптимальных температурах. Для культивирования применяют среды Левенштейна - Йенсена, Сотона. Рост отмечается при 22 – 37 °С у *M. kansasii* и, с трудом, при 22 °С у *M. marinum* (относительно активный рост у *M. marinum* отмечается при 28 - 32 °С). Представители группы фотохромогенных микобактерий не способны расти при 45 и 52 °С, способны к S- R - диссоциации.

M. kansasii и *M. marinum* не продуцируют ниацин, растут на средах с салицилатом натрия (в отличие от микобактерий человеческого и бычьего типов), не продуцируют ацетамидазу, аллантаиназу, сукцинамидазу, не способны разлагать ПАСК. В то же время эти виды продуцируют уреазу, никотинамидазу, гидролизуют твин–80. Арилсульфатаза выделяется этими микобактериями не ранее 2 недель культивирования. *M. marinum*, в отличие от *M. kansasii*, разрушает пипразинамид и не способна редуцировать нитраты [30, 83]. Однако указанные биохимические тесты при их длительности и трудоемкости, не всегда способны обеспечить надежные результаты, что побуждает искать новые подходы к индикации и идентификации микобактерий. На этом пути достигнуты определенные успехи, связанные, главным образом, с развитием методик генетического картирования микобактерий и исследованием их компонентов в иммунологическом и структурном аспектах. Несмотря на сложность и малую доступность упомянутых методов, именно их развитие повлекло за собой прогресс в исследовании взаимодействия микобактерий и организма человека и животных.

Фотохромогенные микобактерии представляют значительную опасность для лиц с проявлениями иммунодефицитных состояний и даже для иммунокомпетентных лиц [80]. Ряд авторов отмечает неуклонный рост заболеваемо-

сти, вызванной основным представителем этой группы микобактерий - *M. kansasii* на протяжении последних 25 лет в различных регионах [76, 135, 138, 142, 148, 163]. В то же время, нерешенными остаются проблемы быстрой и эффективной прижизненной диагностики заболеваний, вызванных данной группой микобактерий и их идентификации. В связи с этим представляется целесообразным рассмотреть сведения, касающиеся роли фотохромогенных микобактерий в патологии человека.

Атипичные микобактерии чрезвычайно широко распространены в природе. В частности, их выделяли из воды, причем, в отличие от туберкулезных микобактерий, они не только сохраняли жизнеспособность в воде, но и размножались в ней [99, 135]. Нетуберкулезные микобактерии выделены из почвы, люцерны, домашней пыли [58, 137]. Особо следует подчеркнуть роль синантропных животных в эпидемиологии микобактериозов. Многие исследователи считают резервуаром “атипичных” микобактерий дику и домашнюю птицу, домашних животных [32, 41, 45].

Природный резервуар *M. kansasii*, так же, как и пути передачи инфекции, остаются невыясненными. Роль животных в возможном сохранении и накоплении *M. kansasii* дискутируется, хотя отмечены отдельные случаи заболеваний животных, вызванных этим микроорганизмом [45, 132]. Наиболее значительным фактором передачи представляется вода. *M. kansasii* обнаруживали как в питьевой воде водопроводных кранов [99, 135, 149, 204], так и в технической воде [135]. Сообщают о загрязнении фотохромогенными микобактериями водоснабжающих систем госпиталей в экономически развитых странах - Франции, Нидерландах [99, 149]. Эпидемиологическое значение *M. kansasii* подтверждается также обнаружением сходных фаготипов микобактерий, выделенных из воды и от населения, использовавшего данный водисточник [99].

Ранее отмечали определенную эндемичность заболеваний, вызванных *M. kansasii*. Их ареал ограничивали, преимущественно, юго - восточной ча-

стью США и отдельными областями Чехословакии [141, 142]. Однако по данным литературы, их распространение в настоящее время является почти повсеместным, причем частота обнаружения имеет тенденцию к увеличению. [59, 177, 178, 201]. По данным М. Kubin и соавт. [142] частота обнаружения *M. kansasii* у больных с вновь выявленным туберкулезом в некоторых районах Чехии возросла с 3,7% в 1968 г. до 33,7% в 1979 г. В Японии до 1977 г. заболеваемость, обусловленная *M. kansasii* составляла менее 1,1 %, тогда как в 1981 году - уже 3,3 %, а в 1992 – 2,9 % от всех случаев заболеваний, вызванных микобактериями [172, 193].

Характерно возрастание роли фотохромогенных микобактерий как возбудителей микобактериозов, частота обнаружения *M. kansasii* среди всех больных микобактериозами возросла с 6,9 % в 1977 г. до 10 % в 1992 г., достигнув 19,5 % в 1981 г. [172, 193]. Н. Engel отмечает, что в Нидерландах в 65% случаев заболеваний, вызванных атипичными микобактериями выделяется *M. kansasii* [99]. В Великобритании среди ВИЧ – негативного населения наиболее частым этиологическим фактором при поражениях легких микобактериальной этиологии, является *M. kansasii* [102]. Тревогу вызывает тот факт, что атипичные и, в частности, фотохромогенные микобактерии могут выявляться у больных общетерапевтического профиля и служить причиной госпитальной инфекции [75, 194]. Хотя речь обычно идет о спорадических случаях заболевания, указывается возможность появления эпидемических вспышек, возникавших, предположительно, водным и аэрогенным путем [135, 141].

Фотохромогенные микобактерии поражают преимущественно лиц со вторичными иммунодефицитами, обусловленными, прежде всего, ВИЧ и заболеваниями системы крови – [77, 103, 167, 207, 209]. Встречаются, однако, случаи микобактериозов у лиц с аутоиммунными расстройствами, а также у подвергающихся медицинским вмешательствам по жизненным показаниям - хронический гемодиализ у больных ХПН, искусственная иммуносупрессия

после трансплантации органов [78, 94, 111, 173, 198]. Особо следует отметить случаи микобактериозов (с летальным исходом) даже у иммунокомпетентных лиц [139, 205]. Сообщают и о возникновении заболеваний, вызванных *M. kansasii* у пациентов с первичными иммунодефицитными состояниями, касающимися Т-клеточного звена [77].

1.2. Клиническое значение фотохромогенных микобактерий

Клинические формы заболеваний, обусловленных фотохромогенными микобактериями, чрезвычайно многообразны. В большинстве случаев приходится иметь дело с более или менее изолированными органными поражениями, однако, нередко инфекция имеет генерализованный характер. Наиболее часто клинические проявления микобактериоза, вызванного *M. kansasii* напоминают картину при легочном туберкулезе [73]. Отмечается большая частота образования каверн, при их унилатеральном расположении, а также ограниченность процессов воспаления, которая трактуется как своеобразная ареактивность организма, определенная склонность к генерализации процесса [81, 135, 141, 153, 182]. Желудочно – кишечный тракт закономерно поражается микобактериями, в том числе *M. kansasii*, при СПИДе [96]. Дискутируется вопрос о возможной роли микобактерий, в частности, *M. kansasii*, в возникновении болезни Крона. В подтверждение этой гипотезы авторы приводят данные о повышении уровня антимикобактериальных антител [188], однако имеются и сообщения, отвергающие предположения такого рода [176]. Сообщают о поражениях *M. kansasii* кожи и подкожной клетчатки [95, 97, 131], синовиальных оболочек [148, 173], перикарда [78, 158], урогенитального тракта [121]. Имеется сообщение об эмпиеме плевры, вызванной *M. kansasii* [211]. Склонность к генерализации инфекции отмечается, прежде всего, у лиц с иммунодефицитными состояниями. Возможны поражения лимфатических узлов, печени, селезенки, костного мозга, поджелудочной

железы, лихорадка неясного генеза и летальный исход [82, 104, 122, 139, 152, 154, 187].

Лечение заболеваний, вызванных атипичными микобактериями, представляет собой трудную задачу как вследствие множественной лекарственной устойчивости микобактерий, так и из-за иммунодефицитного состояния, на фоне которого развился микобактериоз [125]. Обычные схемы включают противотуберкулезные препараты первого и второго рядов – изониазид, рифамицины, стрептомицин, этамбутол, циклосерин, пиразинамид [103, 166, 192]. В терапии заболеваний, вызванных *M. kansasii*, наиболее эффективными признаются сочетания из трех препаратов, включающие наиболее действенный рифампицин [157]. Сообщают об успешном применении эритромицина вместо рифампицина при непереносимости последнего [118]. В качестве второй составной части рекомендуют один из трех аминогликозидов – стрептомицин, канамицин или виомицин, а в качестве третьей – этионамид или этамбутол [144]. В то же время отмечают возможность летального исхода при множественной лекарственной устойчивости возбудителя и неуспехе оперативного лечения [205].

Непрерывно ведется поиск новых препаратов для лечения микобактериальных инфекций. Показана эффективность применения для этой цели фторхинолонов *in vitro*, причем наиболее активными были офлоксацин и ципрофлоксацин [90, 139, 186]. Однако эффективность фторхинолонов *in vivo* оказалась несколько меньше. Исследуется активность амоксициллина и тикарциллина в комбинации с клавулановой кислотой [195, 202] по отношению к микобактериям. Имеется сообщение об активности сульфадиметоксина, причем из группы фотохромогенных микобактерий именно *M. kansasii* чувствительна к сульфадиметоксину, тогда как *M. marinum* – нечувствительна, что может быть использовано для внутригрупповой дифференциации фотохромогенных микобактерий [191].

1.3. Основные подходы к диагностике заболеваний, вызванных атипичными микобактериями

Чрезвычайное сходство клинической картины туберкулеза и микобактериозов вызывает потребность в точной диагностике. В то же время, необходимость изучения эпидемиологической цепочки и скорейшего назначения лечения при микобактериозах требуют еще и возможно ранней диагностики. Исследования в этом направлении ведутся в соответствии с двумя основными задачами: дифференцировать туберкулез от микобактериозов и разграничить микобактериозы между собой. Изучение морфологии микроорганизмов, также, как и исследование их биохимических свойств по – прежнему остаются базисными в идентификации микобактерий и дифференциальной диагностике микобактериозов, что юридически закреплено еще рекомендациями приказа № 558 Министерства Здравоохранения СССР [19]. Однако бактериологические методы диагностики затруднены медленным ростом микобактерий, их требовательностью к питательным средам и малой вирулентностью по отношению к лабораторным животным [58]. Биохимические тесты идентификации длительны, трудоемки, требуют дефицитных реактивов, что затрудняет их широкое распространение в практической медицине [19, 83].

Для ускоренного типирования атипичных микобактерий используется целый ряд подходов. Среди них присутствуют как модификации бактериологического и биохимического методов, так и другие методы [19].

Предложена методика дифференциации фотохромогенных микобактерий от целого ряда других с использованием термоустойчивой кислой фосфатазы [171]. Из новых методов следует отметить все шире внедряемую в практику полимеразную цепную реакцию (ПЦР)[74, 81, 86, 105, 181], а также ряд тестов, имеющих пока более теоретическое, чем прикладное значение – ГЖХ, радиоизотопные методы, металлоаффинная хроматография [42, 81, 115, 119, 127, 134, 151, 190, 203], электрофорез и иммуноэлектрофорез. Полимеразная

цепная реакция, по данным ЦНИИТ РАМН, позволяет в 90% случаев подтвердить диагноз туберкулеза, поставленный «классическими» методами [19]. Следует, однако, отметить, что ПЦР остается сравнительно дорогим и мало-доступным для большинства клинических лабораторий методом. Кроме того, исследуемый материал нередко содержит поврежденную хранением, либо фиксированием ДНК, что значительно снижает возможности метода [106, 210].

С развитием методов разделения белков появились реальные возможности учитывать состав внутриклеточных белков в таксономии микобактерий и их идентификации [63]. Изучение белкового состава микобактерий представляет интерес, поскольку синтез белков специфичен для представителей различных родов и видов и обусловлен наследственным кодом, связанным со структурой ДНК [5, 66]. Особенно значительную роль в этом направлении сыграл электрофорез в полиакриламидном геле. Те же авторы отмечают, что, несмотря на хорошую воспроизводимость электрофореграмм из экстрактов различных видов микобактерий, имеется значительная гетерогенность состава белкового спектра в группе условно – патогенных микобактерий, обусловленная, вероятно, межштаммовыми различиями.

Имеются, однако, сообщения о применении электрофореза с целью выявления видоспецифических компонентов микобактерий. Методом электрофореза в ПААГ показано наличие до 60 электрофоретических фракций, среди которых определяются и видоспецифические [27, 63, 65, 88]. Такой высоко-разрешающий метод, как двумерный электрофорез позволяет увеличить количество определяемых антигенных компонентов приблизительно до 100 [89]. Методами иммунодиффузии и иммуноэлектрофореза в ультрасоникатах, культуральных фильтратах и экстрактах микобактерий обнаруживается до 11 антигенов [21, 133]. Сообщают также о выделении из *M. kansasii* высокоиммуногенного липопропротеида с молекулярной массой 26 кДа, который может

быть перспективным при создании микобактериальной вакцины и диагностических препаратов [200].

Клиническая практика и экономические соображения требуют разработки методов экспресс-диагностики микобактериозов без существенного снижения специфичности. В этом направлении получены определенные положительные результаты. Применяются аллергодиагностика микобактериозов с помощью субстанций, выделенных из микобактерий - сенситинов, серодиагностика и серологическая идентификация микобактерий [12, 35, 39, 46].

Следует отметить, что общепринятые методы аллергодиагностики в случае микобактериозов недостаточно эффективны, как из-за слабой выраженности аллергических реакций, так и из-за их невысокой специфичности [29, 46]. Низкая специфичность обусловлена наличием в составе препаратов для постановки этих реакций сложной, многокомпонентной системы антигенов, среди которых имеются группоспецифические.

Особое внимание привлекают работы, посвященные исследованию антигенной структуры микобактерий. Это связано с возможностью создания новых диагностических, а, возможно, и лечебных препаратов. Кроме того, не оставлены попытки использовать атипичные микобактерии и, в частности, *M. kansasii* и *M. smegmatis* в качестве вакцинных препаратов для профилактики туберкулеза и лепры, что также требует всестороннего изучения антигенной структуры [33].

Выделяют следующие группы микобактериальных антигенов: 1) Антигены, общие для микобактерий, листерий, нокардий, коринебактерий; 2) общие антигены, присутствующие только в медленно размножающихся микобактериях; 3) общие антигены, присутствующие в быстро размножающихся бактериях; 4) видоспецифические антигены, не присутствующие в других видах микобактерий [183]. Большинство антигенов прочно связано с бактериальной клеткой, их очень мало в фильтратах культур. Такие антигены переходят в раствор только после инактивации микобактерий. Следует отметить,

что антигены, обнаруженные в разрушенных микобактериях, не всегда определяются в цельных клетках [38].

Антигены в клетках микобактерий локализуются в различных структурах. Показано, что введение в макроорганизм клеточных оболочек, рибосом, цитоплазмы, корд-фактора вызывает в нем синтез антител [57]. Химическая природа антигенов микобактерий многообразна. Антигенные свойства обнаруживаются как у белков, так у липидов и углеводов микобактерий. Основными полисахаридами микобактериальной клетки являются глюкан, маннан, арабиноманнан и арабиногалактан. Антигенные детерминанты арабиногалактана и арабиноманнанов часто идентичны и являются группоспецифическими [38]. Главными липидами бактерий, которые обладают иммунологической активностью, являются фосфатидилинозитол – маннозиды, сульфатиды, корд – фактор (трегалоза-6,6'-димиколат), микозиды [114].

Среди поверхностных структур наибольшее значение придается антигенам, относящимся к трем основным классам: фенольные гликолипиды, ацилтрегалозу - содержащие липоолигосахариды и полярные гликопептидолипиды [110]. Комплекс фенольных гликолипидов подразделяют на 4 компонента, первый из которых присутствует на поверхности клеток в наибольшем количестве [107, 110]. Однако имеется сообщение об открытии еще четырех представителей этого комплекса, что стало возможным при использовании высокоразрешающей жидкостной хроматографии [197]. Получены специфические антисыворотки к некоторым из этих антигенов, указывается на возможность применения их в диагностических целях [107]. Показано наличие видоспецифических эпитопов и среди трегалозу – содержащих липоолигосахаридов [109, 130]. Гликопептиды клеточных стенок микобактерий характеризуются адьювантной активностью. Этим свойством обладает группа пептидогликолипидов (воски D) [113].

Можно констатировать, что полисахариды микобактерий зачастую обладают перекрестной реактивностью в серологических реакциях, тогда как не-

которые белки характеризуются видовой специфичностью [93, 160]. Решение вопроса о природе видовой специфичности затрудняется особенностями распределения эпитопов между веществами различных классов. Некоторые молекулы, например, определенные полисахариды, состоят из повторяющихся субъединиц с идентичными антигенными свойствами, другие же, в первую очередь, белки, несут различные эпитопы. Во многих случаях на одной молекуле присутствует более чем одна антигенная детерминанта, в то же время одна и та же антигенная детерминанта может присутствовать во фракциях с различными физико–химическими свойствами [21, 117].

Столь сложная антигенная структура микобактерий приводит к образованию прекрестно реагирующих антител, что затрудняет решение задач индикации и идентификации данных микроорганизмов. Привлечение метода моноклональных антител, несмотря на его сложность для практики, позволяет во многих случаях выявлять видоспецифические антигены [4, 37, 80, 140, 141].

Моноклональные антитела (МКА) - это, как правило, антитела к протеиновым компонентам микобактерий, имеющим молекулярную массу от 10 до 65 кДа, обладающие групповой и, реже, видовой специфичностью. В частности, получены серии МКА, реагирующих с полипептидом молекулярной массой 19 кДа *M. tuberculosis* штамма H37Rv, 22 кДа *M. kansasii*, 16 кДа *M. bovis*, 51 кДа *M. bovis* BCG, 79 кДа *M. avium* [19]. Ряд моноклональных антител реагирует только с цельными микобактериями и не реагирует с их растворимыми компонентами. МКА предлагают использовать для серодиагностики туберкулеза, для индикации и серотипирования микобактерий, в иммуноаффинной хроматографии, для выделения высокоспецифичных антигенов, а также для иммуногистохимического выявления антигенов *M. kansasii* в тканях и для тестирования антигенов, полученных методами генной инженерии [37, 80, 196, 200]. Международной рабочей группой по иммунологии туберкулеза при ВОЗ с использованием антигенов микобактерий, выделенных с

помощью аффинной хроматографии, полученных с помощью рекомбинантных технологий и путем химического синтеза получено 31 моноклональное антитело [101]. Следует отметить, что применение МКА повышает специфичность иммунологических методов идентификации микобактерий от 69 до 100%, что зависит от вида микобактерий [19].

Имеется сообщение о приготовлении и испытании антиидиотипических антител против антимикобактериальных моноклональных антител [1].

Значительный раздел работ по получению микобактериальных антигенов связан с молекулярным клонированием и экспрессией ДНК микобактерий в подходящие векторные системы. Рекомбинантные ДНК используются для изучения нуклеотидных последовательностей в геноме, в которых закодированы специфические антигены, определяемые с помощью моноклональных антител [161, 189, 208].

В последние годы одним из современных и оригинальных направлений является получение синтетических антигенов микобактерий. Получен ряд пептидов микобактерий, способных индуцировать выработку антител, реагировать с ними и вызывать туберкулиновые реакции. Делаются попытки использовать эти пептиды для иммунодиагностики микобактериозов [143, 147, 156, 174]. Однако реализация идеи создания молекулярной вакцины требует, прежде всего, выделения в чистом виде и изучения физико–химических и иммунобиологических свойств антигенов микобактерий. Кроме того, для этого необходимо решение целого ряда технологических задач, а именно определения возможности химического или биотехнологического синтеза протективных антигенов, конструирования на их основе молекулярных синтетических вакцин [16].

В диагностике микобактериальных инфекций особо отмечают значение ИФА как метода, способного с высокой точностью идентифицировать микобактерии в исследуемом материале в сравнительно короткие сроки и в минимальном количестве – от $10 \text{ нг} \cdot \text{см}^3$ белка. В то же время отмечается необхо-

димость применения моноклональных антител для ИФА, что затрудняет введение этого метода в широкую практику [140, 165, 175, 206].

Большинство исследований антигенных компонентов *M. kansasii* опирается на изучение дезинтегратов микобактерий, хотя имеются указания и на возможность нахождения видоспецифических протеиновых компонентов в клеточной мембране [80, 129, 134, 141, 200]. Исследование экстрактов микобактерий, получаемых путем дезинтеграции клеток различными способами, предоставляет возможность работать с достаточно широким набором антигенных компонентов, включая «ядерные» и цитоплазматические [6, 39]. В настоящее время применяется множество методов, направленных на извлечение антигенных компонентов из клеток микобактерий. Не утратили своего значения физические методы - разрушение клеток с последующим дифференциальным центрифугированием. Разрушения клеток достигают различными способами – наиболее часто механическим путем (с использованием прессы Френча) либо с использованием ультразвука. Таким путем получают клеточные оболочки, цитоплазму, рибосомы [2, 39, 57]. Столь обширный набор антигенов позволяет надеяться на выявление среди них и высокоспецифичных.

Разработан и применяется целый ряд методов, позволяющих выделить отдельные антигенные компоненты или, по крайней мере, частично освободиться от балластных веществ. Среди таких методов – осаждение уксусной кислотой и этиловым спиртом, приводящее к получению ряда белков и полисахаридов микобактерий [38]. Те же авторы приводят данные о последовательном применении осаждения сульфатом аммония, гель-хроматографии, ионообменной хроматографии и гель-электрофореза. Такая последовательность процессов позволяет получить высокоочищенные антигены, но в небольшом количестве и с низким выходом.

Применение хроматографических методов во многих случаях позволяет достигнуть достаточно эффективного фракционирования сложных смесей, в

состав которых могут входить и антигенные компоненты [22, 23]. Так, успешно проводилось фракционирование стрептококкового аллергена на колонке с ДЭАЭ–сефадексом А–25 [53]. Применение хроматографии методом молекулярных сит позволяет получить лишь фракции, обогащенные белками, которые, однако, нельзя характеризовать как очищенные антигены [88]. Следует отметить, что ионообменная хроматография на ДЭАЭ–целлюлозе сама по себе не всегда способна привести к выделению очищенных антигенов. В то же время ее комбинация с осаждением сульфатом аммония, хроматографией на сефадексе А-50, изоэлектрическим фокусированием позволяет выделять достаточно очищенные антигенные компоненты различной химической природы [38]. Применение для разделения микобактериальных антигенов таких методов, как иммуносорбция, аффинная хроматография на поликлональных моноспецифических сыворотках привело к получению высокоочищенных антигенов в препаративных количествах. Использование же аффинной хроматографии на моноклональных антителах обеспечивает еще более эффективную очистку [91, 92].

А.П. Лысенко, исследуя ультразвуковые дезинтеграты *M. bovis* показал, что гуморальный иммунный ответ у млекопитающих на микобактерии характеризуется преимущественным синтезом и циркуляцией антител к низкоспецифичным высокомолекулярным антигенам [39]. Антитела же к высокоспецифичным антигенам циркулируют в составе иммунных комплексов или обнаруживаются в низких титрах. Тем не менее, автору удалось дифференцировать гуморальный иммунный ответ на заражение *M. bovis* от инфицирования атипичными микобактериями со специфичностью 90% с помощью созданной им тест-системы для ИФА. Применение же очищенных антител к видоспецифическим компонентам *M. bovis* и антисыворотки к группоспецифическим антигенам атипичных микобактерий позволяет со специфичностью 100% дифференцировать антигены и культуры микобактерий. Разработанные автором тест-система для ИФА-диагностики туберкулеза крупного рогатого

ската и набор для дифференциации культур микобактерий позволяют сократить время диагностики и идентификации микобактериозов до 2-3 дней.

Вместе с тем, в данной работе исследована возможность лишь дифференциации *M.bovis* и атипичных микобактерий, задача же межвидовой дифференциации самих атипичных микобактерий не ставилась. Несмотря на то, что показана возможность выявления видоспецифических компонентов микобактерий, исследование сложной смеси антигенов, полученных в результате ультразвуковой дезинтеграции микробных клеток, было затруднено. Затруднено было и получение очищенных антител к высокоспецифичным антигенам микобактерий из-за образования иммунных комплексов и присутствия большого количества антител к низкоспецифичным антигенам микобактерий. Следовательно, представляет интерес изучение вопроса о получении антител к очищенным биохимическими методами поверхностным компонентам микобактерий, не подвергавшихся дезинтеграции [54]. Целесообразным представляется также изучение активности как цельной антисыворотки, так и ее компонентов в реакциях с фракциями экстрактов микобактерий.

Таким образом, проблема атипичных, в частности фотохромогенных, микобактерий привлекает большое внимание исследователей во всем мире, причем особо выделяются вопросы иммунологической диагностики микобактериозов. До настоящего времени не созданы препараты, по диагностической ценности превосходящие PPD [7]. Это во многом объясняется сложностью структуры микобактерий и особенностями иммунных реакций при микобактериозах что ставит задачу продолжения исследований в направлении изучения антигенного состава микобактерий, в том числе и видоспецифических компонентов.

РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили с музейными штаммами *M. kansasii*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. scrofulaceum*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. phlei*. Все штаммы были предоставлены Одесским Институтом Клинической Биохимии и Санитарии Животных УААН.

В работе использовали следующие методы: бактериологические - посев и накопление бактериальной массы *M. kansasii*; физико-химические – экстрагирование компонентов микобактерий, электрофоретическое фракционирование, обессоливание путем гель-хроматографии, ионообменная хроматография для выделения отдельных компонентов, спектрофотометрия, определение белка по методу Lowry и Bradford; иммунологические - иммунизация лабораторных животных для получения иммунных сывороток, реакция преципитации в геле, иммуноэлектрофорез.

2.1. Методы получения экстрактов *M. kansasii*

Микобактерии выращивали и сохраняли на плотной питательной среде Гельберга. Микроорганизмы, выросшие на среде Гельберга в условиях холодильника могут храниться до 2-х лет, однако мы делали пересевы каждые 3 мес. *M. kansasii* культивировали в течение 3 нед., а *M. bovis* и *M. scrofulaceum* – до 4 – 5 нед. при $t^{\circ} = 37,5$ °C. *M. smegmatis*, *M. fortuitum*, *M. phlei* росли в течение 1 – 2 недель. Со среды Гельберга микобактерии пересевали на жидкую питательную среду Сотона для накопления. Среду Сотона готовили путем последовательного растворения следующих ингредиентов:

L – Аспарагина - 4,0 г, глицерина нейтрального - 60 см³, лимонной кислоты - 2,0 г, двухзамещенного фосфорнокислого калия - 0,5 г, лимоннокислого аммиачного железа - 0,05 г, магния сернокислого - 0,5 г, дистиллированной воды - 940 см³.

Смесь кипятили, охлаждали, нейтрализовали аммиаком до pH = 7,2,

фильтровали, разливали по колбам (250см³) и по пробиркам, автоклавировали при 120 °С 30 мин. После пересева среду Сотона помещали в термостат при 37 °С. Культуры оставляли в термостате на 4 недели для *M. kansasii*, и до 5 недель для *M. bovis*. Бактериальную массу снимали в фазе стационарного максимума.

Для подтверждения видовой принадлежности полученных штаммов мы использовали «классические» способы идентификации, основанные на бактериоскопическом, бактериологическом и биохимическом методах. Исследования проводили по следующей схеме:

1. Ниациновый тест – положителен лишь для *M. tuberculosis*;
2. Рост на среде с салицилатом натрия – не дает роста только *M. bovis*;
3. Дифференциация по скорости роста на плотной питательной среде: появление видимых колоний в сроки до 7 суток – быстрорастущие, в более поздние сроки - прочие виды;
4. Дифференциация среди быстрорастущих микобактерий:
 - образование пигмента, рост при 45 °С, расщепление дульцита, рост в присутствии 0,01 % пиронина В, расщепление аллантаминамида, бензамида, изоникотинамида – *M. smegmatis*;
 - образование пигмента, рост при 45 и 52 °С, отсутствие расщепления дульцита, отсутствие роста в присутствии 0,01 % пиронина В, отсутствие расщепления аллантаминамида, бензамида, изоникотинамида – *M. phlei*;
 - беспигментные колонии, образование арилсульфатазы, деградация салицилата и ПАСК, рост на среде с нитритом натрия – *M. fortuitum*;
5. Дифференциация микобактерий с медленным ростом:
 - фотохромогенность, образование уреазы, восстановление нитратов, гидролиз твина – 80 – *M. kansasii*;
 - скотохромогенность, образование уреазы, восстановление

нитратов, отсутствие гидролиза твина – 80 – *M. scrofulaceum*.

Выросшие на среде Сотона культуры обрабатывали различными способами с целью выявления оптимальных условий экстрагирования антигенных компонентов.

К выросшей культуре микобактерий добавляли фенол в таком количестве, чтобы его концентрация в среде составила 2 % и оставляли в термостате на 48 часов при непрерывном перемешивании. Убитую фенолом бактериальную массу собирали с помощью центрифугирования при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость (НОЖ) сливали в отдельную колбу. Собранную бактериальную массу ресуспендировали в приблизительно равном объеме изотонического (0,15 М) трис-НСl буферного раствора рН 7,5 и центрифугировали при 3000 об/мин. Эту же операцию (отмывка от фенола) проводили еще раз. Полученную бактериальную массу использовали как для иммунизации животных, так и для получения экстрактов. В случае необходимости длительного хранения бактериальную массу высушивали лиофильно на лабораторной установке «LZ-9.2» при давлении 0,01 торр.

От детергентов экстракты освобождали различными способами. ДСН удаляли путем выдерживания экстракта при 4 °С. При этом часть детергента кристаллизовалась и кристаллы отделяли от маточного раствора. Оставшееся относительно небольшое количество ДСН удаляли из препарата путем гель - хроматографии на колонке с сефадексом G - 25 [14, 23, 25, 50, 71].

Гель-хроматографию для очистки получаемых экстрактов от ДСН проводили на колонке Sephadex G-25 (фирмы Pharmacia Fine Chemicals), высотой 400 мм, диаметром 25 мм с использованием в качестве буферного раствора 0,01 М трис-НСl (рН 6,8). Сухой сефадекс массой 40 г суспендировали в рабочем буферном растворе. После осаждения основной массы декантировали надосадочную жидкость с мельчайшими частицами геля. Декантацию повторяли до прозрачности надосадочной жидкости. После этого гель оставляли на ночь для “набухания”. Колонку, в основание которой был вставлен перфори-

рованный диск из плексигласа с положенным на него кружком фильтровальной бумаги “белая лента”, укрепляли строго вертикально. Над колонкой укрепляли воронку, соединенную с колонкой с помощью стеклянной трубки и пробки. Колонку, соединительную трубку и часть воронки заполняли рабочим буферным раствором. Выход из воронки прикрывали стеклянной палочкой настолько, чтобы суспензия сефадекса могла просачиваться в колонку тонкой струйкой. Порциями вносили суспензию сефадекса. По мере того, как в основании колонки оседал слой сефадекса высотой 3 см, открывали кран колонки, чтобы жидкость могла медленно вытекать. После формирования столба геля требуемой высоты кран закрывали, а сверху геля помещали кружок из предварительно обезжиренного ацетоном поролонa. Колонку промывали рабочим буферным раствором, оставляли над верхним краем геля столбик жидкости высотой 1 см и перекрывали кран колонки до использования. Следили, чтобы как под плексигласовым диском, так и под поролоновым кружком не было пузырьков воздуха и чтобы поверхность геля была строго горизонтальной. Буферному раствору давали впитаться, после чего наносили перепарат, подвергавшийся очистке. На колонку общим объемом 200 см^3 , с наружным объемом 80 см^3 , и внутренним объемом 100 см^3 пипеткой медленно наслаивали очищаемый раствор в количестве 20 см^3 . Как только раствор профильтровывался, стенки колонки ополаскивали несколько раз минимальным количеством рабочего буферного раствора, после чего начинали элюирование. Фракции объемом 10 см^3 собирали с помощью коллектора «Radelkis». Полноту освобождения белкового раствора от ДСН контролировали путем проведения реакции с хлористым барием.

Выход белка контролировали по поглощению при 260 и 280 нм, а также пользуясь колориметрическими методами Lowry и Bradford.

Поскольку в процессе прохождения через колонку экстракт разбавлялся, мы объединяли все белоксодержащиеся фракции и приводили полученный раствор к объему экстракта, наносившегося на колонку (20 см^3).

Очистку экстрактов от тритона X-100 осуществляли в экстракторе непрерывного действия, изображенном на рисунке 2.1.

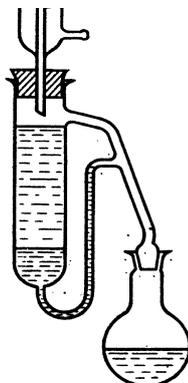


Рис. 2.1. Схема экстрактора непрерывного действия для отделения тритона X – 100.

В сосуд экстрактора наливали хлороформ, а на него наслаивали раствор, подлежащий экстрагированию. Сосуд закрывали пробкой с вставленным в нее обратным холодильником. Находящийся в круглодонной колбе хлороформ нагревали до кипения, а в обратный холодильник пускали охлаждающую воду. При этом пары растворителя поступали в экстрактор, конденсировались в обратном холодильнике и жидкий хлороформ в виде капель проходил через экстрагируемый раствор, увлекая с собой детергент. По мере увеличения слоя хлороформа часть его перетекала в колбу, откуда хлороформ вновь испарялся и поступал в экстрактор. Таким образом, процесс экстрагирования протекал непрерывно и минимальным объемом хлороформа удавалось быстро извлечь значительные количества детергента. Контролировали полноту очистки от тритона X-100 путем предварительного проведения «холостого» эксперимента.

Буферный раствор, не содержащий белка и содержащий 0,4 % тритона X-100 подвергали экстрагированию. Было показано, что при обработке в

экстракторе в течение 30 минут достигается полная очистка раствора от этого детергента.

Учитывая то, что твин-80 и холат натрия не влияют в применяемых нами концентрациях на протекание реакции иммунодиффузии в геле и не затрудняют определение белка и нуклеиновых кислот в применяемых нами методиках, мы, для предварительных экспериментов не проводили очистку экстрактов от этих детергентов.

2.2. Методы изучения физико-химических свойств экстрактов *M. kansasii*

Содержание белка в экстрактах контролировали по поглощению при 260 и 280 нм на спектрофотометре СФ-46, по Lowry, а также методом связывания красителя по Bradford [26].

Техника количественного определения белка по Lowry была следующей. К 0,4 см³ исследуемого раствора добавляли 2 см³ раствора «С», оставляли при комнатной температуре на 10 минут. Затем добавляли 0,2 см³ реактива Фолина - Чокальтеу и оставляли пробы на 30 минут для развития окраски. Интенсивность окраски измеряли на спектрофотометре «СФ-46» в кюветах длиной 10 мм, либо на фотоэлектроколориметре КФК-1, при длине волны 750 нм. Количественное определение производили по калибровочной кривой, составленной по яичному альбумину. Калибровочная кривая для определения белка по Lowry представлена на рисунке 2.2.

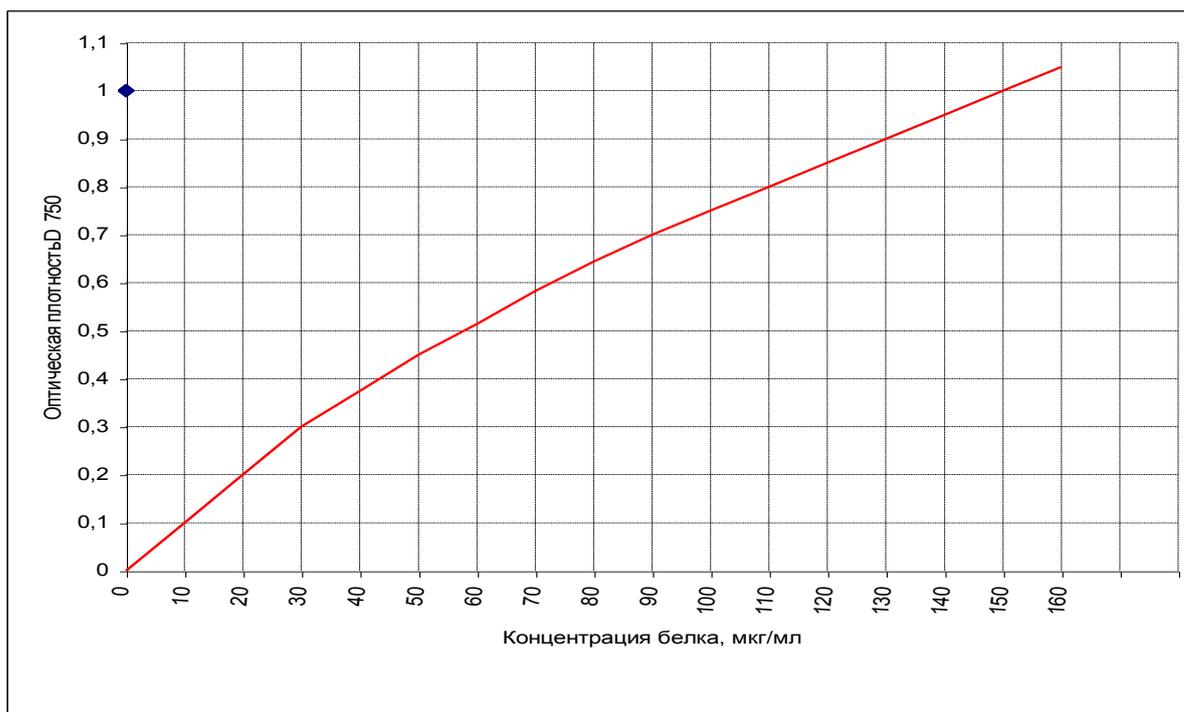


Рис. 2.2. Калибровочная кривая для определения белка по методу Lowry.

Реактив «С» представлял собой смесь 50 частей реактива «А» (2 % раствор карбоната натрия в 0,1 н. растворе гидроксида натрия) и одной части реактива «В» (0,5% раствор сульфата меди (II), приготовленный на 1% растворе цитрата натрия. Реактив Фолина готовили следующим образом. В круглодонную колбу объемом 1 л вносили 350 см³ дистиллированной воды, добавляли 50 г вольфрамата натрия (Na₂WO₄·2H₂O), 12,5 г молибдата натрия (Mo₂MoO₄·2H₂O) и перемешивали до полного растворения солей. К полученному раствору приливали 25 см³ 85% раствора ортофосфорной кислоты, 50 см³ концентрированной соляной кислоты и смесь кипятили с водяным обратным холодильником на шлифе в течение 10 часов. Затем добавляли 75 г сульфата лития (Li₂SO₄), 25 см³ дистиллированной воды и 3 капли брома. Для удаления избытка брома смесь кипятили без холодильника, под тягой в течение 15 минут. Затем раствор охлаждали до комнатной температуры,

доводили дистиллированной водой его объем до 500 см³ и фильтровали через бумажный фильтр. 1 см³ фильтрата разводили в 10 раз водой и титровали 0,1 н. раствором гидроксида натрия по фенолфталеину до появления розовой окраски. Рассчитывали концентрацию кислоты в пробе и к основному раствору прибавляли такое количество дистиллированной воды, чтобы получить конечную концентрацию кислоты в растворе, равную 1н. Поскольку трис, входивший в состав буферного раствора применялся нами в концентрациях ниже 0,3 М, его присутствие не сказывалось на определении белка [26].

Учитывая относительно большой объем работы по определению белка в методе Lowry, а также для подтверждения результатов и нивелирования возможных погрешностей, мы применяли также метод определения белка по Bradford. Для этого 0,1 г кумасси бриллиантового голубого G-250 растворяли в 50 см³ 95 % этилового спирта. Затем добавляли 100 см³ 85 % водного раствора ортофосфорной кислоты, разбавляли дистиллированной водой до 1 л, фильтровали и сохраняли при 4 °С не более 14 дней. Для построения калибровочной кривой микрометодом использовали раствор сывороточного альбумина («Reanal»), содержащий не более 10 мкг белка в 0,1 см³. К этому раствору добавляли 1 см³ раствора красителя, смешивали и, не ранее, чем через 5 минут и не позднее 1 часа определяли поглощение при 595 нм относительно чистого реагента. Калибровочная кривая для определения белка этим методом представлена на рисунке 2.3.

Метод Bradford отличается более высокой чувствительностью, чем метод Лоури, однако присутствие ДСН или тритона X-100, а также щелочей искажает результаты определения белка.

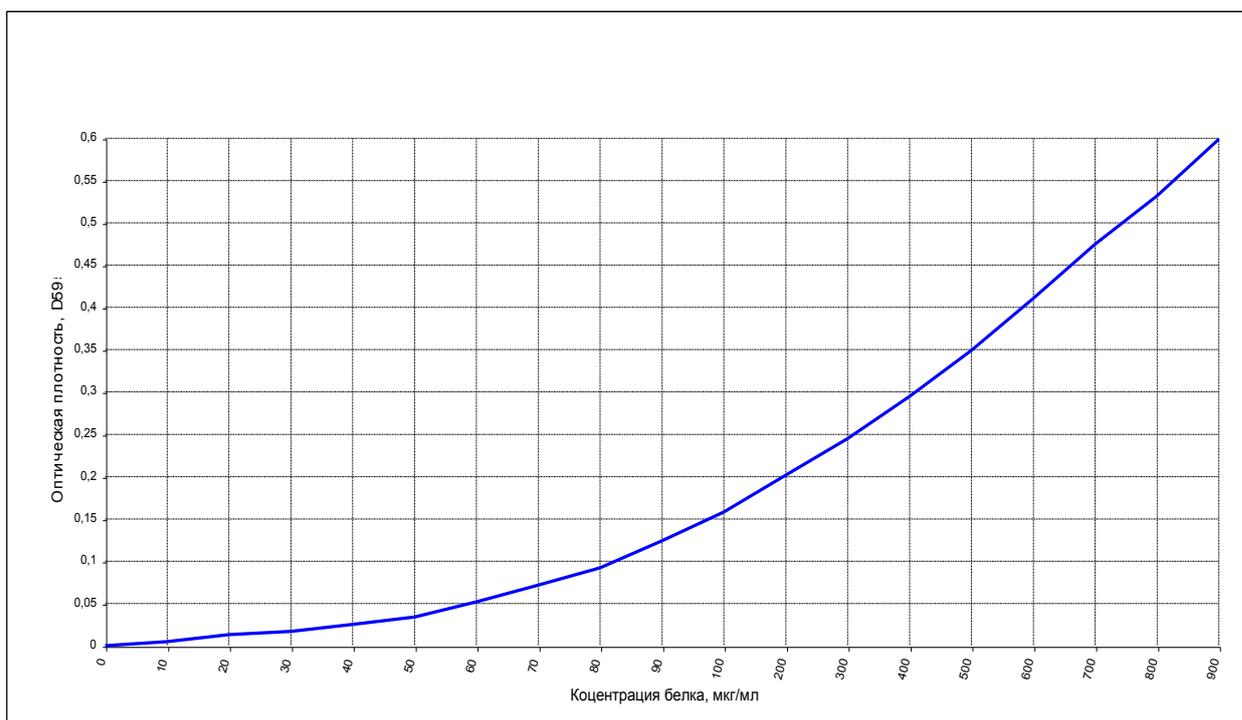


Рис. 2.3. Калибровочная кривая для определения белка по методу Bradford

Для определения нуклеиновых кислот пользовались физическими и физико–химическими методами. В качестве контрольных использовали образцы ДНК и РНК фирмы «ICN». Путем спектрофотометрии определяли оптические плотности образцов при 260 и 280 нм, после чего находили отношение D_{280}/D_{260} . Далее по таблице, приведенной в работе Р. Досона и соавт. вычисляли приближенное содержание нуклеиновой кислоты относительно общей концентрации белка [26]. Для отдельного определения ДНК и РНК использовали физико–химические методы, основанные на цветных качественных реакциях.

РНК определяли орциновым методом, для чего готовили ряд растворов: раствор А – 1 % водный раствор орцина; раствор Б – концентрированная соляная кислота; раствор В – 10 % водный раствор хлорида железа (III). Непосредственно перед использованием смешивали растворы А,Б и В в соотноше-

нии 10: 40: 1 (по объему). 3 см³ полученного раствора добавляли к 0,5 см³ исследуемого раствора и нагревали в кипящей водяной бане в течение 25 минут. При этом предотвращали упаривание исследуемой жидкости, прикрывая пробирку стеклянным шариком. После охлаждения определяли оптическую плотность при 660 нм относительно чистого реагента. Калибровочная кривая для определения РНК представлена на рисунке 2.4.

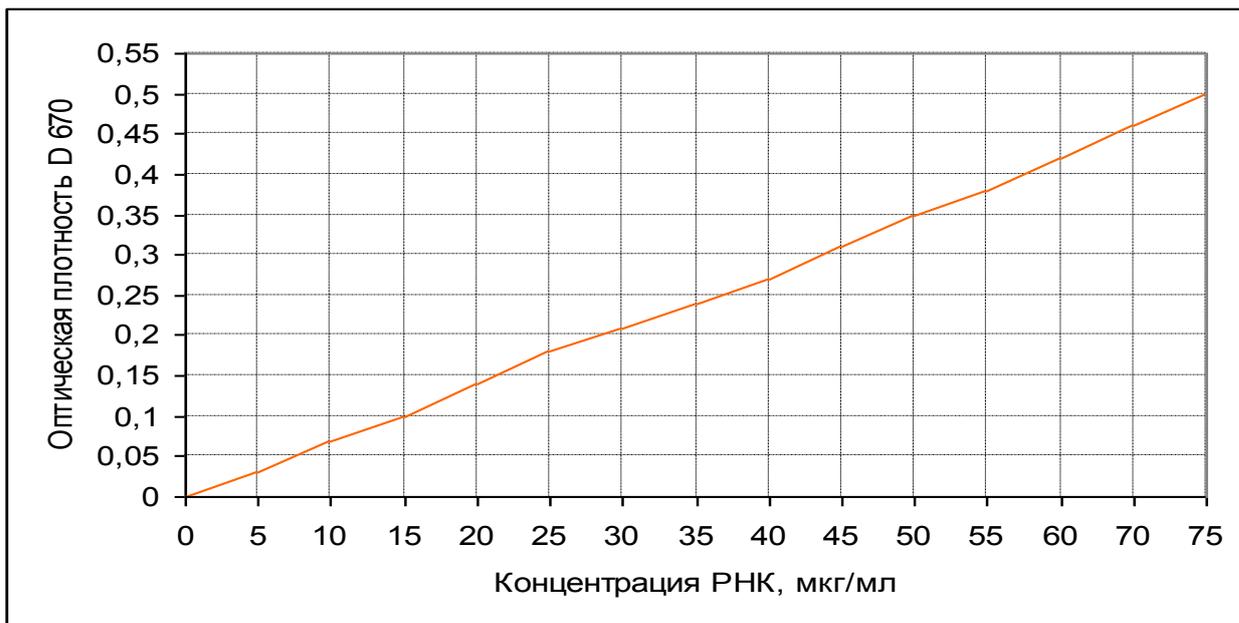


Рис. 2.4. Калибровочная кривая для определения РНК
орциновым методом.

ДНК определяли дифениламиновым методом в модификации Бартона, для чего предварительно готовили реактив: к 100 мл 1,5 % раствор дифениламина в перегнанной ледяной уксусной кислоте добавляли 1,5 мл концентрированной серной кислоты [87]. Готовили водный раствор ацетальдегида из расчета 1,6 г (2 см³) ацетальдегида на 100 см³ воды. На каждые 20 мл реагента добавляли 0,1 мл водного раствора ацетальдегида. Далее к образцу, содержащему ДНК добавляли хлорную кислоту до конечной концентрации 0,5 М. Два объема дифениламинового реагента прибавляли к одному объему образца, содержащего ДНК в 0,5 М растворе хлорной кислоты. Одновременно ана-

логичные процедуры проводили со стандартами ДНК и чистым реагентом. Инкубировали 16 часов при 30 °С и измеряли поглощение при 600 нм. При расчете содержания нуклеиновой кислоты исходили из того, что раствор, содержащий 1 мг РНК в 1 см³ характеризуется $D_{260} = 24,0$, а содержащий 1 мг ДНК/см³ имеет $D_{260} = 20,0$. Калибровочная кривая для определения ДНК этим методом представлена на рисунке 2.5.

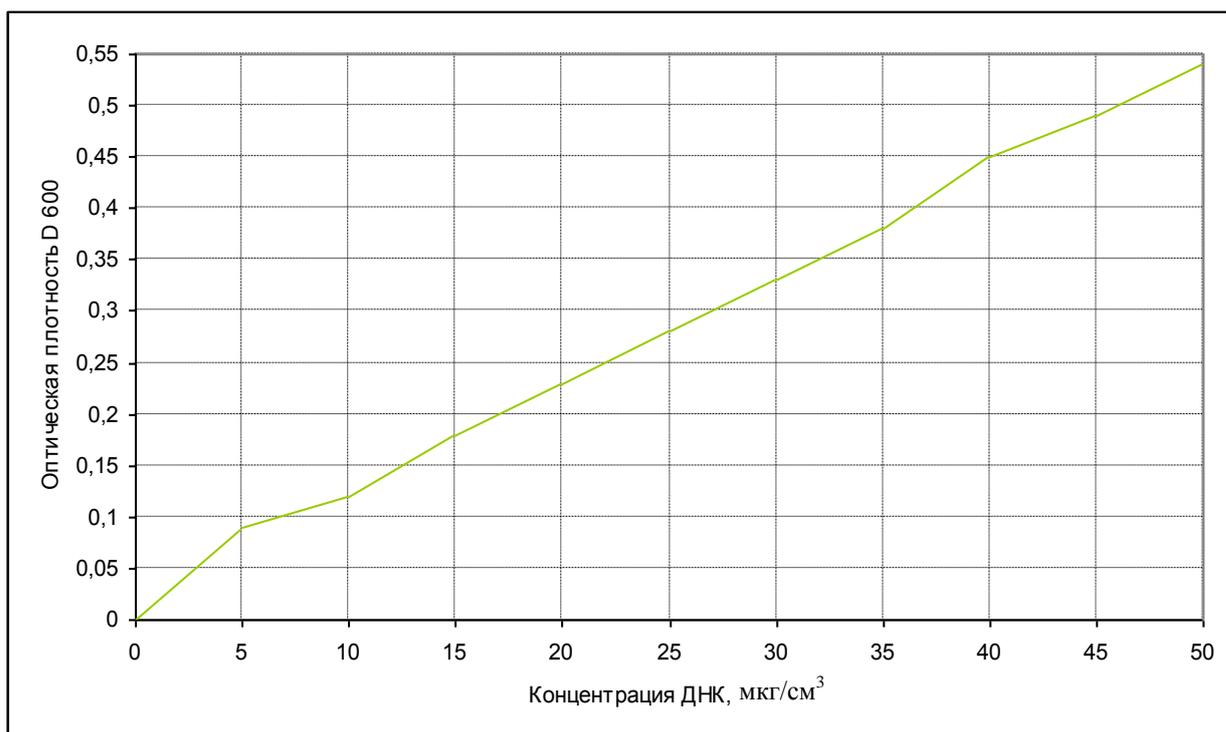


Рис. 2.5. Калибровочная кривая для определения ДНК по методу Burton.

С целью определения в экстрактах углеводных и липидных компонентов применяли тонкослойную хроматографию на пластинках «Silufol – UV» по методикам, описанным в ряде работ [26, 34, 52, 55, 70].

На пластинке, на расстоянии 2 см от нижнего края отмечали точки нанесения препарата. С помощью микропипетки в намеченные места наносили исследуемый препарат в объеме 10 мкл таким образом, чтобы получились пятна одинакового диаметра. После высушивания пятен пластинку помещали в хроматографическую камеру, на дне которой находился растворитель с

высотой слоя 1 см. Для определения углеводов в качестве растворителя использовали смесь н-бутанол-ацетон-вода (4 : 5 : 1), липидов – смесь гексан – диэтиловый эфир-ледяная уксусная кислота (73 : 25 : 2). Хроматографию проводили до прохождения растворителем 10 см от линии старта. После этого хроматограммы высушивали и проявляли. Поскольку использовали пластинки «Silufol-UV», оказывалось возможным выявить пятна углеводов под ультрафиолетовым светом. Другим методом проявления было применение паров йода. Для этого пластинку помещали в эксикатор, на дне которого находились кристаллы йода и выдерживали 15 минут. Этот метод проявления выявлял как углеводы, так и липиды, однако для последних требовалась более длительная выдержка (до нескольких суток).

Углеводы выявляли также с применением реактива Шиффа. Для этого готовили реактив по следующей прописи: 0,5 г основного фуксина квалификации “для фуксинсернистой кислоты” растворяли в 100 мл кипящей воды и, охладив до 50 °С, добавляли 100 мл 1 н. раствора соляной кислоты и 0,5 г метабисульфита калия $K_2S_2O_5$. Затем раствор выдерживали в темном месте в плотно закрытой склянке в течение 18 часов, обесцвечивали 0,5 г активированного угля, фильтровали и разбавляли водой в 20 раз. Маточный раствор сохраняли при 4 °С не более 1 месяца.

Для окрашивания хроматограммы погружали в 2 % водный раствор матапериодата натрия на 1 минуту, промывали водой и погружали на 25 минут в 2 % водный раствор бисульфита натрия. Затем погружали препараты в реактив Шиффа на 30 секунд. Через 10 – 15 минут появлялись красные пятна, соответствующие углеводам.

Для выявления липидных компонентов экстрактов использовали родамин 6 G. Для этого предварительно готовили 0,001 % водный раствор красителя 0,25 М растворе гидрофосфата калия K_2HPO_4 . Препарат выдерживали в растворе красителя 5 минут. Влажную хроматограмму наблюдали в ультрафиолетовом свете. Липиды выявлялись как желтые пятна на розовом фоне.

Для выявления липопротеинов применяли окрашивание суданом черным. Для этого растворяли 0,1 г судана черного В в 1 см³ этилацетата при комнатной температуре. К полученному раствору добавляли 9 см³ пропиленгликоля. Хроматограмму прокрашивали в течение 15 минут. Липопротеиды выявлялись в виде синих пятен на сером фоне.

2.3. Методы фракционирования экстрактов *M. kansasii* и анализа полученных фракций.

В качестве одного из методов разделения экстрактов микобактерий мы применяли ионообменную хроматографию, поскольку она обладает высокой разрешающей способностью и позволяет относительно несложно переходить от аналитических исследований к препаративным. Как рабочий раствор использовали 0,1 М трис-НСl буфер с рН от 7,6 до 9,0, содержащий, в зависимости от цели эксперимента до 0,2 М NaCl. Хлорид натрия вводили с целью уменьшения прочности связи протеиновых молекул с ионообменником, а его концентрацию подбирали путем определения количества несвязанного с ионообменником белка при различном содержании NaCl в растворе [50, 60, 62]. Было установлено, что в используемом диапазоне рН оптимальной является концентрация NaCl 0,2 М, поскольку именно при таком его содержании обеспечивается удовлетворительное разделение.

В качестве ионообменника использовали ДЭАЭ–целлюлозу «Ватман DE–32» обменной емкостью 1,0 мэкв/г. Ионообменник уравнивали с исходным буферным раствором путем трехкратной декантации, после чего наполняли колонку диаметром 0,9 см таким образом, чтобы высота ДЭАЭ–целлюлозы составила 13 см при давлении, применяемом в ходе эксперимента. Наполненную колонку промывали двукратным объемом исходного буферного раствора (18 см³), после чего порциями наносили 10 см³ раствора белка, уравновешенного исходным буферным раствором. С момента нанесения

собирали фракции элюата по 3 см³, после чего колонку промывали 18 см³ исходного буферного раствора. Ступенчатую элюцию проводили при проведении ориентировочных экспериментов по определению необходимой ионной силы исходного и элюирующего буферных растворов. Это обусловлено тем, что ступенчатая элюция обеспечивает более быстрый анализ, но обуславливает меньшую разрешающую способность по сравнению с градиентной элюцией. На колонку порциями наносили исходный буферный раствор, содержащий возрастающие концентрации хлорида натрия. Объем каждой порции был равен удвоенному объему колонки и составлял 18 см³. Ступенчатую элюцию с изменением рН применяли при анализе фракций, которые наиболее прочно связывались с ионообменником. Для этого готовили ряд буферных растворов на основе трис–HCl с добавлением различных количеств раствора гидроксида натрия под контролем рН. Градиентную элюцию начинали немедленно после всасывания промывающего буферного раствора. Использовали систему для создания «прямого» градиента концентрации NaCl [60, 62]. По окончании градиентной элюции на колонку наносили 9 см³ 1н. раствора NaOH, при этом собирали фракции объемом 0,5 см³. После полного прохождения раствора щелочи колонку промывали 200 см³ исходного буферного раствора.

Содержание белка в полученных фракциях исследовали спектрофотометрически, определяя поглощение при 260 и 280 нм, а также методами Bradford по поглощению при 595 нм и Лоури [26].

Во фракциях, полученных после нанесения гидроксида натрия предварительно определяли рН, а затем доводили сильнощелочные фракции до рН исходного буферного раствора и только тогда определяли содержание белка. Электрофорез в полиакриламидном геле применяли для определения состава экстрактов микобактерий, чистоты получаемых фракций экстрактов, а также молекулярной массы отдельных компонентов, входящих в состав экстрактов. С этой целью пользовались методикой электрофореза по Laemmli [49, 72,

146]. Проведение ступенчатого электрофореза требовало уравнивания белков по заряду, для чего необходимо было обработать бактериопротеины в составе экстракта не менее, чем трехкратным избытком ДСН. Разрушения четвертичной, третичной и вторичной структур белка достигали добавлением карбамида, а для восстановления дисульфидных связей и предохранения препарата от окисления добавляли 2–меркаптоэтанол. Для проведения электрофореза готовили буферный раствор для образцов следующего состава:

Карбамид	- 4,8 г
2–меркаптоэтанол	- 0,1 см ³
Экстракт микобактерий с содержанием белка 1 мг/см ³ (в 0,1 М трис–НСl буфере рН 6,8, содержащем 0,5 % ДСН)	- до 10 см ³ .

Непосредственно перед проведением электрофореза образцы выдерживали при температуре 100 °С в течение 3 минут. Состав концентрирующего и разделяющего гелей приведен в таблице 2.1.

Полимеризацию гелей проводили при комнатной температуре, причем непосредственно перед заливкой гелей в форму на 16 мл разделяющего геля добавляли 0,16 мл 10 % водного раствора персульфата аммония и 5,1 мкл ТЕМЕД, а на 5 мл концентрирующего геля–соответственно 0,05 мл и 7,5 мкл.

Электрофорез вели с применением аппарата для вертикального электрофореза АВГЭ–2, представлявшим собой видоизменение конструкции Стадиера [184]. Размер гелевой пластины составлял 115 x115 x 2 мм. В герметизированную гелевую ячейку вносили гелеобразующую смесь для разделяющего геля таким образом, чтобы верхний уровень ПААГ был на 25 мм ниже верхнего края «лицевой» стеклянной пластины и поверхность его была строго горизонтальна.

Таблица 2.1.

Состав концентрирующего и разделяющего гелей для электрофореза в ПААГ по Лэммли

Ингредиенты	Требуемые количества и свойства	
	Концентрирующий гель (5 %)	Разделяющий гель (17,5 %)
30 % водный раствор акриламида	16,7 см ³	17,5 см ³
1% водный раствор N,N'-метилен-бисакриламида	13,0 см ³	2,2 см ³
1М трис-НСI буферный раствор	pH 6,8 12,5 см ³	pH 8,7 12,5 см ³
10 % водный раствор ДСН	1,0 см ³	0,3 см ³
Вода бидистиллированная	до 100 см ³	до 30 см ³

Полимеризацию проводили под слоем буферного раствора для разделяющего геля, который наносили по полоске фильтровальной бумаги. После полимеризации избыточную воду с поверхности геля удаляли полоской фильтровальной бумаги и тотчас же вносили смесь для формирования концентрирующего геля, которую заливали до уровня верхнего края «лицевой» стеклянной пластины. В еще незаполимеризовавшийся гель вставляли «гребенку» с шириной зубцов 5 мм с целью формирования карманов для образцов. По окончании полимеризации геля вынимали прокладку с нижней стороны для обеспечения электрического контакта геля с «нижним» электродным буферным раствором. В «верхнюю» камеру помещали электрод из нержавеющей стали, соединенный с катодом, а в «нижнюю» – платиновый электрод, подключенный к аноду. В качестве электродного буфера с pH 8,3 использовали раствор следующего состава: глицин - 14,4 г; трис-(оксиметил)-аминометан - 3,025 г; ДСН - 1,0 г; вода бидистиллированная - до 100 см³.

100 см³ этого буферного раствора разбавляли водой в 10 раз и заливали в прибор таким образом, чтобы уровень буферного раствора был на 2 – 3 мм выше верхнего края «лицевой» пластины. Непосредственно перед внесением проб из геля извлекали гребенку, а в образцы добавляли глицерин до конечной концентрации 5 %. Образцы с ориентировочным содержанием белка 1 мг/см³ вносили под слой буферного раствора в количестве 25 мкл в каждый «карман». Ввод образцов в гель осуществляли при токе 10 мА и напряжении 150 В. После перехода лидирующего красителя (бромфеноловый синий) в разделяющий гель ток повышали до 30 мА. Процесс считали завершившимся, когда полоса красителя достигала нижнего края геля. Общая продолжительность опыта составляла 3,5 часа.

По окончании электрофореза пластину для фиксации и окрашивания белковых зон оставляли на 30 минут в растворе следующего состава: кумасси R–250 - 0,125 %; кумасси G–250 - 0,125 %; этанол - 50,0 см³; вода бидистиллированная - до 500 см³. Затем гель отмывали от красителя 7 % уксусной кислотой двое суток.

Для определения молекулярной массы компонентов электрофоретических фракций использовали маркерные белки фирмы “Sigma”, характеристики которых приведены в таблице 2.2.

Маркерные белки подвергали такой же обработке, как и исследуемые экстракты. По окончании электрофореза рассчитывали относительную подвижность Rf по следующей формуле:

$$Rf = \frac{L_B}{L_K} \quad (\text{формула 2.1}),$$

где L_Б - расстояние, пройденное белком от старта; L_К – расстояние, пройденное фронтом лидирующего красителя от старта. По результатам, полученным в ходе электрофореза смеси маркерных белков строили график зависимости Rf от десятичного логарифма молекулярной массы каждого компонента набора маркерных белков.

Таблица 2.2.

Свойства маркеров, примененных для электрофореза в ПААГ

Белок	Молекулярная масса, Да	LgM	Rf
Лизоцим	14300	4,16	0,98
Карбоангидраза (эритроциты быка)	29000	4,46	0,85
Альбумин яичный	45000	4,65	0,69
Бычий сывороточный альбумин	66000	4,82	0,54
Фосфорилаза b (мышечная ткань кролика)	97400	4,99	0,35
в – галактозидаза (из E. coli)	116000	5,06	0,25
Миозин (мышечная ткань кролика)	205000	5,31	0,15

В дальнейшем, используя этот график, изображенный на рисунке 2.5, определяли молекулярные массы компонентов электрофореграмм.

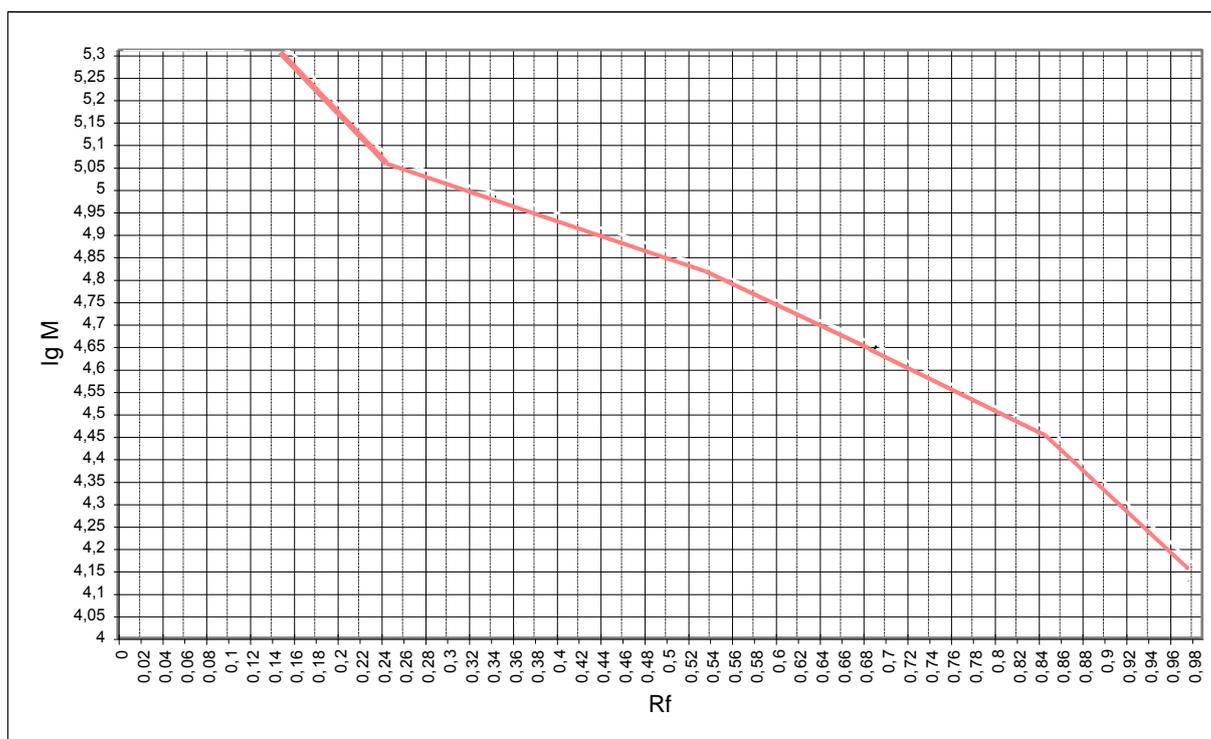


Рис. 2.5. Зависимость логарифма молекулярной массы (lg M) маркеров от относительного расстояния (Rf) их миграции при электрофорезе в ПААГ.

2.4. Методы изучения антигенных свойств экстрактов *M. kansasii* и полученных фракций

2.4.1. И м м у н и з а ц и я л а б о р а т о р н ы х ж и в о т н ы х. Для получения иммунных антисывороток к микобактериям использовали 16 кроликов – самцов с массой тела 3 – 4 кг, возрастом 1 – 1,5 года. Работа с экспериментальными животными проводилась в соответствии с требованиями, изложенными в приложении к Приказу МЗ СССР № 755 от 12. 08. 1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию форм работы с использованием экспериментальных животных». Животные содержались в индивидуальных боксах со свободным доступом к пище и воде и естественной сменой света и темноты.

Иммунизацию проводили по модифицированной методике, описанной О.Е. Вязовым и Ш.Х. Ходжаевым (1973) [4, 17]. Учитывая относительно слабо выраженные антигенные свойства поверхностных компонентов микобактерий, мы применяли иммунизацию кроликов с неполным адьювантом Фрейнда. Препараты для иммунизации готовили следующим образом: в стерильной ступке смешивали и растирали 15 г стерильного вазелинового масла, 5 г стерильного безводного ланолина. Смесь переносили в стерильные пробирки и кипятили на водяной бане по 30 минут в течение 3 дней. Сохраняли адьювант в холодильнике при температуре 4 °С. Непосредственно перед иммунизацией готовили взвесь микобактерий в стерильном изотоническом растворе хлорида натрия из расчета 20 мг бактериальной массы на 5 см³ изотонического раствора. Таким образом, в 1 см³ содержалось 4 мг бактериальной массы (по сухому весу).

Эмульсию антигена готовили в масляной фазе адьюванта Фрейнда по методике, описанной в работе [4]. Вначале определяли общий необходимый объем эмульсии, увеличивали его на 20 % в расчете на потери. Переносили необходимый объем подогретого до 40 °С адьюванта во флакон, затем в мас-

ляную фазу энергично вводили такой же объем суспензии антигена в изотоническом растворе хлорида натрия. Весь объем смеси набирали в шприц. Затем шприц снабжали иглой с двумя канюлями и присоединяли второй шприц, после чего многократно перегоняли смесь из одного шприца в другой, до тех пор, пока эмульсия не загустевала. Готовую эмульсию переносили обратно во флакон и использовали для иммунизации - вводили кролику в толщу мышц бедра, убедившись, что игла не попала в кровеносный сосуд. Впрыскивали по 1 см^3 эмульсии в каждую заднюю лапу одновременно. Такие инъекции производили 2 раза в неделю с интервалом в 3 и 4 дня. После окончания месячного цикла иммунизации получали кровь и делали перерыв 2 месяца. Затем производили реиммунизацию. Мы не применяли внутривенный метод иммунизации, поскольку животные плохо переносили его.

Кровь у кроликов получали путем венесекции в количестве 20 см^3 один раз в неделю, собирали в стерильные силиконированные пробирки, оставляли для свертывания на 1 час при 37°C , затем отделяли сгусток от стенок сосуда. Для ретракции сгустка кровь оставляли на ночь при 4°C , после чего жидкость центрифугировали 20 минут при 1500 об/мин для удаления эритроцитов. Затем часть сывороток использовали непосредственно для работы, часть же распределяли аликвотами по 1 см^3 в пластиковые пробирки с крышками и хранили при температуре -18°C .

Для проведения ряда экспериментов было необходимо получить моноспецифическую антисыворотку против *M. kansasii*. С этой целью к 1 см^3 полученной полиспецифической антисыворотки к *M. kansasii* добавляли от 0,01 до 1 см^3 смеси экстрактов следующих видов микобактерий: *M. bovis*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*, *M. phlei*. Экстракты в смеси присутствовали в равных пропорциях, однако содержание антигенных компонентов в них несколько отличалось. Содержание антител в сыворотках также не могло быть совершенно одинаковым. В связи с этим для каждой серии экстрактов и сыворотки приходилось вновь определять необходимое соотношение.

Обычно на 1 см³ антисыворотки приходилось 0,5 – 0,6 см³ смеси экстрактов.

После добавления экстрактов к сыворотке смесь инкубировали 1 час при температуре 37 °С, после чего выдерживали при температуре 4 °С в течение 18 часов. Сыворотку отделяли от образовавшегося преципитата путем центрифугирования в течение 15 минут при 3000 об/мин с последующим отсасыванием. Таким же образом производили истощение сыворотки всеми хроматографическими фракциями экстракта *M. kansasii*, кроме той, моноспецифическую сыворотку к которой требовалось получить. В ряде случаев сыворотку приходилось концентрировать путем упаривания под пониженным давлением при температуре не более 25 °С. Полноту истощения антисыворотки контролировали в РПГ с теми экстрактами и фракциями, от антител к которым требовалось освободиться. После проверки на полноту адсорбции в дальнейших экспериментах использовали лишь те сыворотки, из которых были удалены перекрестно реагирующие антитела.

2.4.2. Т е х н и к а р е а к ц и и п р е ц и п и т а ц и и в г е л е. Реакцию преципитации в геле применяли с целью как предварительной оценки активности полученных сывороток, так и с целью детального исследования антигенных свойств полученных экстрактов и их фракций. Использовали реакцию двойной радиальной иммунохимической диффузии в геле по методу Ouchterlony [162]. Для постановки реакции использовали 0,75 % очищенный агар “Difco”, приготовленный на изотоническом растворе хлорида натрия. Агар расплавляли на кипящей водяной бане в колбе с обратным холодильником во избежание подсыхания. Нагревание вели при перемешивании минимально необходимое для образования гомогенной жидкости время. Агар разливали предварительно подогретыми пипетками в теплые «Планшеты для культур клеток» Ленинградского завода медицинских полимеров. Планшеты устанавливали горизонтально, по уровню, в каждую чашку диаметром 34 мм вносили по 2 см³ расплавленного агара. Таким образом, в каждой чашке создавали слой геля толщиной 2 мм. Во избежания подсыхания все чашки, с которыми в

данный момент не работали, закрывали увлажненной фильтровальной бумагой. Для приготовления лунок использовали трафареты, предложенные Л.А. Зильбером [28]. Агар из лунок удаляли с помощью водоструйного насоса. Расстояния между лунками варьировали, в зависимости от аранжировки эксперимента, от 3 до 6 мм. Концентрацию реагентов подбирали опытным путем, в предварительных экспериментах путем приготовления различных разведений и “раститровки”. При этом исходили из положения, что с повышением концентрации реагента линия преципитации удаляется от соответствующей лунки. Мы старались подобрать концентрации таким образом, чтобы линии образовывались ближе к середине между лунками, были интенсивными и четкими. Предварительно вычислив объем лунки, вносили требуемые количества сывороток и раствора антигена, так, чтобы жидкость в лунке была на одном уровне с поверхностью агара. После внесения реагентов весь планшет прикрывали увлажненной фильтровальной бумагой и выдерживали 48 часов в герметически закрытой камере при комнатной температуре. Затем двукратно производили отмывку от реагентов изотоническим раствором хлорида натрия по 30 минут. После удаления раствора соли в чашки помещали дистиллированную воду и выдерживали при температуре 4 °С в течение 1 суток. В некоторых случаях с целью усиления преципитационных полос гель после удаления дистиллированной воды помещали на 10 минут в сосуд с 0,065% раствором сульфата кадмия. Затем раствор соли удаляли, а гель вновь заливали дистиллированной водой на 10 минут [31, 48].

Результаты учитывали визуально в проходящем свете с последующей зарисовкой, фотографированием под слоем дистиллированной воды, а также высушиванием агаровой пластинки и ее окрашиванием. Для окрашивания гель извлекали из чашек и переносили в дистиллированную воду, а затем на стекло. Стеклянную пластинку с гелем помещали на 5 минут в водный раствор, содержащий 10,5 % трихлоруксусной кислоты и 3,5 % сульфосалициловой кислоты, промывали двумя сменами 96 % этанола (по 10 минут в каждой

смене) и покрывали смоченным в этаноле листком фильтровальной бумаги. На него клали еще 5 слоев сухой фильтровальной бумаги, накрывали стеклянной пластинкой и прижимали грузом до 1 кг. За 20 минут пластинка геля заметно сжималась, ее извлекали, подсушивали в токе теплого воздуха до состояния тонкой пленки. Эту пленку окрашивали в течение 10 минут 0,11% раствором кумасси ярко-голубого R-250 в смеси, содержащей 8% уксусной кислоты и 25 % этанола, отмывали в трех сменах того же растворителя, а затем снова высушивали [128].

2.4.3. Т е х н и к а и м м у н о э л е к т р о ф о р е з а. Иммуноэлектрофорез по Грабар и Уильямс вели в слое 1 % геля агарозы для электрофореза [116]. В качестве рабочего буферного раствора применяли 0,1 М трис-глициновый буфер рН 7,5. Выбор буферного раствора диктовался необходимостью ввести в сетку геля ионы с возможно меньшей подвижностью, что приводило к ускорению миграции заряженных белковых молекул в электрическом поле и улучшению разделения. По краям стекла размещали полосы из фильтровальной бумаги так, чтобы наносимый гель агарозы зафиксировал их на стекле. Расплавленную агарозу наносили на стекло так, чтобы образовался слой геля толщиной до 2 мм. После застывания геля в нем прорезывали лунки для разделяемого препарата и траншеи для иммунных сывороток. Гель из траншей не удаляли для обеспечения равномерного распределения напряженности электрического поля по всей поверхности геля. Лунки для препарата прорезывали ближе к «катодному» краю пластины. Гель из лунок отсасывали с помощью водоструйного насоса. Препарат, подвергавшийся разделению вносили в лунку в количестве 20 мкл и помещали стекло в электрофоретическую ванну так, чтобы электродный буферный раствор смачивал бумажные фитили. В качестве электродного буферного раствора использовали тот же раствор, на котором был приготовлен препарат. Электрофорез проводили при напряженности электрического поля 10 В/см в течение 4 часов при 4 °С. Затем следовал этап иммунодиффузии и образования дуг преципитатов. Пла-

стинку с гелем вынимали из электрофоретической ванны, извлекали шпателем агарозу из траншей и наливали в них до уровня геля антисыворотку, степень разведения которой определяли в предварительных экспериментах. Учет результатов вели аналогично РПГ [48].

РАЗДЕЛ 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Изучение условий экстрагирования поверхностных компонентов атипичных микобактерий

3.1.1. Обоснование выбора экстрагирующего раствора для получения поверхностных компонентов

M. kansasii. Существует ряд методов, позволяющих извлечь требуемые компоненты из бактериальной клетки. Наше внимание привлекали технические приемы извлечения поверхностных компонентов из клеток в мягких условиях, поскольку мы ставили задачу изучить поверхностные антигенные компоненты, полученные без разрушения бактериальной клетки. Для этого было необходимо перевести интересовавшие нас компоненты в раствор, т.е. солюбилизировать их. С физико-химической точки зрения солюбилизация представляет собой процесс получения термодинамически устойчивого изотропного раствора вещества, обычно нерастворимого в данном растворителе, путем введения добавок амфифильного компонента или компонентов [150]. Подходящими амфифилами являются детергенты. Детергент обычно включается в биологическую мембрану до достижения точки насыщения, после чего начинают отделяться мицеллы состава детергент – липид – белок [120, 169].

Успех солюбилизации часто зависит от выбора детергента, к которому существуют определенные требования. Детергент должен солюбилизировать, но не денатурировать белок, желательно также, чтобы он был недорогим, легко удалялся в процессе очистки или не мешал бы дальнейшим манипуляциям с солюбилизированными компонентами.

Детергенты подразделяют на два типа: ионные и неионные. Ионные, в свою очередь, подразделяются на анионные (например, соли желчных кислот, SDS), катионные (алкилтриметиламмониевые соли) и цвиттерионные (цвит-

тергент 3 – 14) [9]. Одним из важнейших свойств детергентов, определяющих их необходимую концентрацию в растворе, является критическая концентрация мицеллообразования (ККМ). Эта величина определяет минимальный предел концентрации детергента, ниже которого мицеллы не формируются, а, следовательно, солубилизация невозможна. В то же время ККМ, до известной степени, характеризует возможность очистки от данного детергента, поскольку при концентрациях выше ККМ затруднена очистка, например, диализом и гель–хроматографией [50]. ККМ, особенно, у ионных детергентов, снижается с повышением ионной силы раствора [9]. Повышение температуры, напротив, слабо влияет на ионные детергенты (выше критической температуры мицеллообразования), но приводит к заметному снижению ККМ неионных детергентов, вероятно, за счет усиления гидрофобных взаимодействий [9, 120, 185]. Из приводимых в литературе детергентов нам были доступны лишь некоторые.

Додецилсульфат натрия – анионный детергент с ККМ 0,23 % (вес/объем). Солубилизирующая активность его весьма высока, однако он способен вызывать денатурацию белков и разрушение стенок грамотрицательных бактерий [26, 120, 169]. Однако показано, что этот детергент не приводит к гибели микобактерий [40]. Додецилсульфат натрия создает на белках сильный отрицательный заряд, разрушая третичную и вторичную структуры. При этом молекулы приобретают эллипсоидную конформацию, а их собственный заряд нивелируется. Такое свойство додецилсульфата натрия широко используется для разделения белков по молекулярной массе в электрофорезе по Laemmli [49, 146]. В то же время, несмотря на столь значительное воздействие ДСН на белки, было показано, что антигенные свойства большинства белков не страдают от временного комплекса с ДСН [84]. Однако для некоторых методик очистки, фракционирования и детектирования белков присутствие ионного детергента оказывается неприемлемым. Известно, что ДСН растворяет не все щелочные белки, зато хорошо растворяет нуклеино-

вые кислоты, что может создавать помехи как при ионообменной хроматографии, так и при электрофоретических методах исследования [164]. При ионообменной хроматографии додецилсульфат натрия не позволяет белку сорбироваться на ионообменнике. Проведение РПГ и иммуноэлектрофореза в присутствии ДСН также становится затруднительным, поскольку он даже в концентрации 0,05 % ингибирует протекание реакции антиген–антитело [48]. Это вызывает необходимость очистки препарата от детергента. В концентрациях выше ККМ разрушения мицелл можно достигнуть путем охлаждения раствора до 0 °С. При этом часть додецилсульфата кристаллизуется, и его концентрация в растворе снижается ниже ККМ [71]. Того же эффекта можно достичь разбавлением, либо увеличением молярности буферного раствора [50]. К неоспоримому преимуществу ДСН относится отсутствие у его растворов поглощения при 260 и 280 нм. Таким образом, этот детергент не мешает детектированию белков и нуклеиновых кислот по методу Варбурга и Кристиана [26].

Другим широко употребляемым детергентом является тритон X–100. Его ККМ составляет всего лишь 0,021 % (вес/объем). При этом молекулярная масса мицелл составляет до 90000 Да (при молекулярной массе мономера 650 Да) [120, 123, 169]. Такие мицеллы достаточно крупные чтобы элюироваться с колонок вместе с белком, что делает невозможной очистку белка от детергента методом гель–хроматографии. Диализ в этом случае также затруднен, поскольку возможность диссоциации мицелл достигается при содержании тритона, меньшем ККМ, а это приводит к слишком незначительной разности концентраций и низкой скорости процесса. Удаление тритона X–100 зачастую необходимо, поскольку он поглощает при 280 нм, мешая тем самым определению белка. Кроме того, он затрудняет определение белка методами Lowry и Bradford [26]. Triton X–100 мешает проведению электрофореза по Laemmli [49]. Он также способен к аутоокислению и вследствие этого, к разрушению белковых и липидных препаратов, что требует либо скорейшего

освобождения от этого детергента, либо введения антиоксидантов [9]. Необходимо отметить, однако, что, не будучи ионным, этот детергент не препятствует проведению РПГ и иммуноэлектрофореза, а, напротив, даже тормозит неспецифическую преципитацию [48]. При электрофорезе тритон X-100 за счет образования мицелл дает значительный прирост молекулярной массы различных белков, что может быть использовано для улучшения разделения [49]. Для удаления тритона X-100 предложены методы адсорбции его на ионообменных смолах типа «Амберлит», а также экстракция хлороформом [124]. Важным достоинством тритона X-100 является его эффективность при солюбилизации. В то же время он не приводит к денатурации белков [49].

Холат натрия также относится к неденатурирующим детергентам [9]. Это ионный детергент, и, следовательно, препятствует ионообменной хроматографии. Кроме того, он образует нерастворимые комплексы с ионами двухвалентных металлов, а также осаждается при рН ниже 6,8 [108, 179]. Благодаря относительно небольшому размеру мицелл (молекулярная масса 4300 Да) и более высокому ККМ (0,6 % вес/объем) удаление холата из растворов осуществимо значительно легче, чем тритона X-100 и может быть проведено обыкновенным диализом. Кроме того, холат натрия не мешает определению белка при 280 нм и методами Lowry и Bradford [9]. Недостатком холата является его относительно невысокая солюбилизующая активность.

Твин-80 относится к мягко действующим, но в то же время относительно малоактивным детергентам. Он также склонен к аутоокислению, образует комплекс с ионами двухвалентных металлов и затрудняет анализ липидных компонентов экстракта. ККМ твина-80 – 0,002 % (вес/объем), а молекулярная масса образуемых им мицелл достигает 76000 Да [136]. Такое низкое значение ККМ делает невозможным освобождение от этого детергента методами диализа и гель-хроматографии, однако разработаны методы его удаления путем ионообменной хроматографии и экстракции органическими растворителями. К достоинствам твина-80 относятся отсутствие у него поглощения

при 280 нм и незначительное влияние на протекание иммунологических реакций [9].

Таким образом, ни один из доступных нам детергентов не мог считаться в полной мере подходящим для экстрагирования поверхностных компонентов *M. kansasii*. Поэтому было необходимо исследовать экстрагирующее действие каждого из них в различных условиях.

3.1.2. Исследование оптимальных условий экстрагирования поверхностных компонентов микобактерий. В связи с изложенным было целесообразно выбрать тот детергент или их комбинацию, который обеспечил бы максимальный выход антигенных компонентов в неденатурирующих условиях. Эксперименты в этом направлении проводили по одинаковой схеме: исследовали выход белковых компонентов при концентрациях детергента ниже ККМ, равных ККМ и выше ККМ. Для исследований использовали: додецилсульфат натрия (ДСН), тритон X-100, холат натрия, твин-80. Навеску бактериальной массы (влажный вес) вносили в соответствующий раствор детергента в соотношении 1 г бактериальной массы на 10 см³ раствора детергента в 0,15 М трис-НСl буфере с различными значениями рН.

Молярность буферного раствора задавали таким образом, чтобы обеспечить его изотоничность и предотвратить осмотический разрыв бактериальных клеток [63]. Взвесь бактерий в растворе детергента выдерживали 72 часа при температуре 37 °С, после чего центрифугировали при 18000 об/мин. Осадок отбрасывали, а супернатант подвергали фильтрованию через бумажный фильтр. При необходимости концентрирования экстракт упаривали при 4 °С в роторном испарителе «LRV-2». Для стерилизации и осветления препарат фильтровали через мембранный фильтр с размером пор 0,4 мкм, после чего разливали в стерильную посуду и сохраняли в замороженном состоянии при -15 °С. Экстракты освобождали от детергента различными способами. ДСН удаляли путем выдерживания экстракта при 4 °С. При этом часть детергента

кристаллизовалась и кристаллы отделяли от маточного раствора. Оставшееся небольшое количество ДСН удаляли из препарата путем гель-хроматографии на колонке с сефадексом G-25. [14, 25, 50], тритон X-100 удаляли экстракцией хлороформом в экстракторе непрерывного действия для растворителей тяжелее экстрагируемого раствора [18].

В предварительных экспериментах было показано, что наибольший выход белка наблюдается в диапазоне рН от 6 до 7. В более кислых средах наблюдалось выпадение осадка из исследуемых экстрактов. Схема постановки эксперимента с применением ДСН приведена в таблице 3.1. Выход белка дан в пересчете в мкг / мл.

Таблица 3.1.

Выход протеиновых компонентов (мкг/см³) из бактериальной массы *M. kansasii* в зависимости от концентрации ДСН и рН раствора

рН	Содержание белка, мкг / см ³ при концентрации ДСН, % (вес/объем)									
	0,05 %	0,1 %	0,2 %	0,25 %	0,4 %	0,5 %	1,0 %	2,0 %	3,0 %	4,0 %
6,0	15	23	63	83	143	145	138	130	120	120
6,1	20	26	70	85	148	150	140	132	125	120
6,2	30	30	74	90	150	160	145	135	130	130
6,3	32	35	80	94	153	163	150	140	135	135
6,4	35	38	84	100	160	165	160	162	145	140
6,5	40	45	95	110	170	170	155	150	145	143
6,6	40	46	95	115	170	167	153	152	148	145
6,7	42	48	100	120	175	190	180	180	169	168
6,8	45	50	102	125	175	200*	179	178	170	170
6,9	42	45	90	115	135	180	165	160	155	150
7,0	40	43	85	110	130	175	162	160	153	150

Примечание. *) Звездочкой отмечен максимальный выход белка.

Из таблицы 3.1 видно, что наибольший выход белка отмечался при концентрации ДСН 0,5 % и рН 6,8. Такие же параметры использовались при экстрагировании в дальнейшем.

Подобную схему исследования применяли и для других детергентов. При этом было обнаружено, что тритон X–100 обуславливает наибольший выход белковых компонентов (180 мкг/мл) при концентрации его 0,4% (вес/объем) и рН 7,0, что отражено в таблице 3.2.

Таблица 3.2.

Выход протеиновых компонентов (мкг/см³) из бактериальной массы *M. kansasii* в зависимости от концентрации Тритона X–100 и рН раствора

рН	Содержание белка, мкг/см ³ при концентрации ДСН, % (вес/объем)									
	0,02 %	0,04 %	0,08 %	0,1 %	0,2 %	0,3 %	0,4 %	0,5 %	0,7 %	0,8 %
6,0	65	80	95	113	120	125	120	115	110	110
6,1	70	90	98	115	125	125	130	128	124	120
6,2	75	95	110	122	127	130	135	130	125	120
6,3	80	100	115	128	135	140	144	144	140	138
6,4	83	104	118	130	137	145	147	145	143	140
6,5	87	107	120	132	141	153	153	149	145	144
6,6	90	110	124	134	145	155	158	152	152	150
6,7	93	113	125	134	148	159	160	160	155	153
6,8	95	115	127	136	152	165	170	166	163	157
6,9	98	118	130	140	155	168	170	169	164	160
7,0	100	120	135	140	160	170	180*	175	165	160

Примечание. *) Звездочкой отмечен максимальный выход белка.

Максимальный выход белка отмечался при концентрациях холата натрия 1 % (вес/объем) и рН 8,0 и твина–80 - 0,005 % (вес/объем) и рН 7,5. Однако в этих случаях максимальная концентрация белка в исследуемых экстрактах не превышала 10 мкг/см³.

Учитывая несколько различный характер солубилизирующего действия таких активных детергентов, как ДСН и тритон X-100, мы провели изучение возможности их последовательного применения. С этой целью вначале проводили экстрагирование ДСН по методике и при условиях, которые были описана выше, а затем отцентрифугированную и троекратно отмытую от ДСН бактериальную массу обрабатывали 0,4 % раствором тритона X-100 в 0,15 М трис-НСI буферном растворе рН 7,0. При этом удавалось дополнительно экстрагировать белок в количестве 50 мкг/см³ экстракта. В дальнейшем проводили освобождение экстрактов от соответствующего детергента и изучали различные их свойства.

3.1.3 Освобождение экстрактов поверхностных компонентов от детергентов. Для использования экстрактов в последующих экспериментах необходимо было очистить их от детергентов. Особенно большое значение имело освобождение от ДСН, поскольку этот детергент, как указывалось выше, тормозит образование комплексов антиген-антитело и затрудняет определение белка по методу Lowry. Для очистки от ДСН экстракты выдерживали при 4 °С. Выпадавший в виде кристаллов ДСН отделяли, а остаток детергента из маточного раствора удаляли методом гель-хроматографии. Хроматограмма очистки белкового препарата от ДСН представлена на рис. 3.1.

Из рисунка 3.1 можно видеть, что выход белка с колонки начинался в десятой фракции, что отвечает 100 см³ пропущенной жидкости. Общий объем, в котором элюировался белок составлял 60 см³. При этом белковый пик достаточно симметричен и не размыт, что говорит о правильном заполнении колонки. Для индикации присутствия детергента с порцией исходного экстракта, 0,5 % раствором ДСН и фракциями элюата провели реакцию с 1 % раствором хлорида бария.

3.1.4 Контроль целостности бактериальных клеток после экстрагирования. Поскольку наше внимание привлекали поверхностные компоненты микобактерий, было необходимо контролировать целостность клеток после экстрагирования.

Для этого проводили микроскопическое исследование мазков из бактериальной массы, окрашенных по Цилю–Нильсену. Микроскопия показала, что экстрагирование как ДСН, так и тритоном Х–100 не приводило к потере кислотоустойчивости клетками *M. kansasii* и других изученных микобактерий. Это позволило сделать вывод об отсутствии существенных повреждений клеточной стенки микобактерий при обработке ДСН и тритоном Х–100.

Разрушение клеток должно было сопровождаться значительным выходом нуклеиновых кислот, наличие которых могло указывать на присутствие в экстрактах интрацеллюлярных компонентов. Поэтому было целесообразным провести качественное определение содержания НК в экстрактах. Результаты представлены в таблице 3.3.

Из данных таблицы 3.3 видно, что наибольший выход бактериопротеинов наблюдался в случаях применения ДСН, тритона Х–100 и, особенно, при последовательном применении ДСН и Тритона Х–100. В то же время содержание нуклеиновых кислот не было значительным ни в одном случае, что позволяет подтвердить вывод об относительной сохранности клеток в процессе экстрагирования.

Таким образом, на основании результатов микроскопии и исследования присутствия нуклеиновых кислот, можно заключить, что полученные нами экстракты *M. kansasii* содержали преимущественно поверхностные компоненты микобактерий и не имели существенной примеси внутриклеточных компонентов.

Таблица 3.3.

Содержание белка и нуклеиновых кислот, в экстрактах *M. kansasii*, полученных с применением различных детергентов

Исследуемый показатель	Экстракты, полученные с применением детергента:				
	ДСН	Тритон X – 100	Холат Na	Твин – 80	ДСН + Тритон X-100 ¹
D ₂₆₀	0,242	0,190	0,018	0,016	0,137
D ₂₈₀	0,250	0,210	0,015	0,014	0,148
D _{Lowry} ²	1,200	1,100	0,100	0,100	0,880
D _{Bradford}	0,200	0,190	0,005	0,005	0,170
Содержание белка в пробе, мкг	200	180	10	10	250
Содержание нуклеиновых кислот ³	3 %	2,4 %	5,6 %	4,9 %	2,7 %
Содержание РНК в пробе, мкг	4,0	3,5	Не опр.	Не опр.	7,2

Примечания:

1. Суммарный препарат, полученный смешением 1 см³ экстракта «ДСН» с 1 см³ «Тритонового» экстракта, полученного в результате дополнительного экстрагирования той же бактериальной массы. Таким образом, объем пробы составлял 2 см³.
2. Данные количественного определения белка по Lowry при высоких концентрациях белка получены в результате разведения экстракта с последующим пересчетом на исходный препарат.
3. Содержание нуклеиновых кислот относительно общей концентрации белка + нуклеиновых кислот. Вычислено приблизительно на основании данных, приводимых в работе Р. Досона и соавт. [26].

3.1.5. Сравнительная характеристика антигенных свойств экстрактов, полученных с применением различных детергентов и их комбинаций. Учитывая то, что целью работы являлся поиск видоспецифических компонентов среди поверхностных структур микобактерий, а антигенные структуры являются наиболее ярко выраженными носителями видовой специфичности, представляло интерес изучить вопрос о сохранности поверхностных антигенных компонентов *M. kansasii* в процессе экстрагирования. Такое исследование было тем более необходимо, что, как указывалось выше, ДСН способен вызывать разрушение высших структур белковых молекул с возможной утратой ими антигенных свойств. В связи с тем, что экстракты, подвергавшиеся исследованию представляли собой сложную смесь веществ, возможно, с различными антигенными свойствами, мы применяли реакцию иммунодиффузионной преципитации в геле по Ouchterlony, поскольку она при простоте постановки и достаточной чувствительности обеспечивает получение надежных результатов именно при анализе многокомпонентных систем. Учитывая то, что содержание белка в различных экстрактах значительно варьировало, мы предварительно уравнивали их по этому показателю.

Этого достигали упариванием экстрактов в роторном испарителе при 4 °С, под контролем оптической плотности при исследованиях по Lowry и Bradford.

Подготовку РПГ проводили, как описано в главе 2. В центральную лунку помещали антисыворотку *M. kansasii*, а в периферические – экстракты, полученные с применением различных ПАВ, освобожденные от последних. В качестве контрольных использовали буферные растворы, содержавшие соответствующий детергент и очищенные от него. Результаты этого эксперимента приведены на рис. 3.2.

Можно видеть, что из всех видов экстрактов активными в антигенном отношении оказались лишь полученные с применением ДСН и тритона X-100.

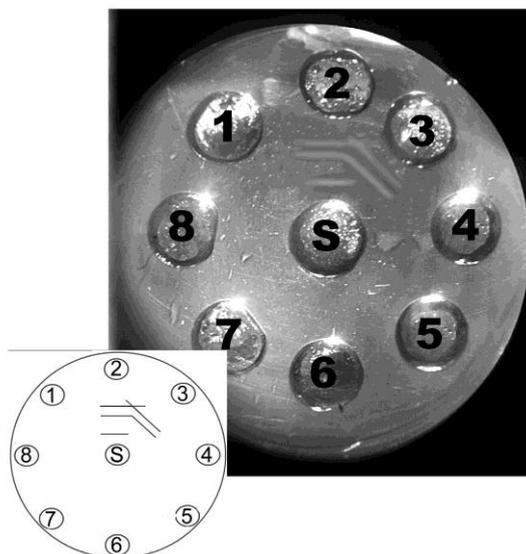


Рис. 3.2. Антигенные свойства экстрактов *M. kansasii*, полученных с применением различных детергентов:

S – антисыворотка к *M. kansasii*, разведенная 1 : 2; 1 - буферный раствор, содержащий ДСН и очищенный от него; 2 – экстракт, полученный с применением ДСН; 3 – экстракт, полученный с применением тритона X-100; 4 - буферный раствор, содержащий тритон X-100 и очищенный от него; 5 – экстракт, полученный с применением холата натрия; 6 - буферный раствор, содержащий холат натрия и очищенный от него; 7 - экстракт, полученный с применением твина-80; 8 - буферный раствор, содержащий твин-80 и очищенный от него.

Ввиду этого, в дальнейшем мы отказались от применения холата натрия и твина-80 в качестве экстрагентов. Экстракт «ДСН» дает три четко выраженные преципитационные линии, тогда как «тритоновый» экстракт – две. При этом можно видеть, что одну из линий формирует антиген, общий для обоих экстрактов. Поскольку были получены данные о том, что тритон X-100 дополнительно экстрагирует бактериопотеины после обработки бактериаль-

ной массы ДСН, нам представлялось целесообразным исследовать антигенную активность экстрактов, полученных таким «комбинированным» методом. Результаты этого эксперимента представлены на рисунке 3.3. В центральной лунке – антисыворотка *M. kansasii*, в периферических – экстракты, полученные различными способами. Для сравнения мы ввели в реакцию экстракты, полученные с применением только одного детергента.

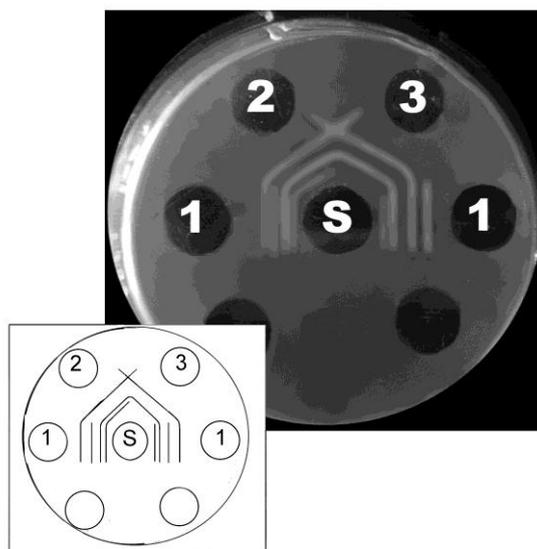


Рис. 3.3. Сравнение иммунологической активности экстрактов *M. kansasii*, полученных путем последовательного и раздельного применения ДСН и тритона X-100: S – антисыворотка к *M. kansasii*; 1 - экстракт, полученный с последовательным применением ДСН и тритона X-100; 2 – экстракт, полученный с применением только ДСН; 3 – экстракт, полученный с применением только тритона X-100.

Как можно видеть из рисунка 3.3, экстракт, полученный с последовательным применением детергентов содержит как минимум, четыре антигенных компонента, что больше, чем в результате применения индивидуальных детергентов. Тем не менее, количество полос преципитата меньше, чем можно было бы ожидать при простом суммировании картин, полученных с применением индивидуальных детергентов. Это может свидетельствовать о том,

что тритон X–100 дополнительно экстрагирует один (по результатам преципитации) антигенный компонент.

Таким образом, после проведения экстрагирования с последовательным применением ДСН и тритона X–100 получены экстракты, содержащие, по результатам двумерной радиальной иммунодиффузии в геле, по крайней мере, 4 антигенных компонента.

В результате проведения данного этапа исследований было установлено, что для экстрагирования поверхностных компонентов *M. kansasii* наилучшим является применение ДСН, тритона X–100 или их комбинации. Руководствуясь тем, что последовательное применение ДСН и тритона X–100 обеспечивает наибольший выход антигенных компонентов, в дальнейшем мы использовали экстракты, полученные таким способом. При этом не отмечалось значительного разрушения клеток и выхода внутриклеточных компонентов. В то же время, экстракты содержали ряд антигенных компонентов, что в дальнейшем делает возможным их разделение и выделение видоспецифических компонентов. В целях выявления в полученных экстрактах отдельных компонентов, также для определения их химической природы и молекулярной массы мы считали целесообразным исследовать полученные экстракты с применением такого высокоразрешающего метода, как электрофорез в полиакриламидном геле.

3.2. Изучение экстрактов *M. kansasii* методом электрофореза в полиакриламидном геле

Исследовали экстракты поверхностных компонентов *M. kansasii* в сравнении с экстрактами других видов микобактерий: *M. bovis*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*, *M. phlei*. Рисунок 3.4 демонстрирует расположение маркерных белков и основных компонентов фореграммы экстрактов

микобактерий причем можно отметить, что бактериопротеины расположены на фореграммах в широком диапазоне – от 205 кДа до 14 кДа и менее.

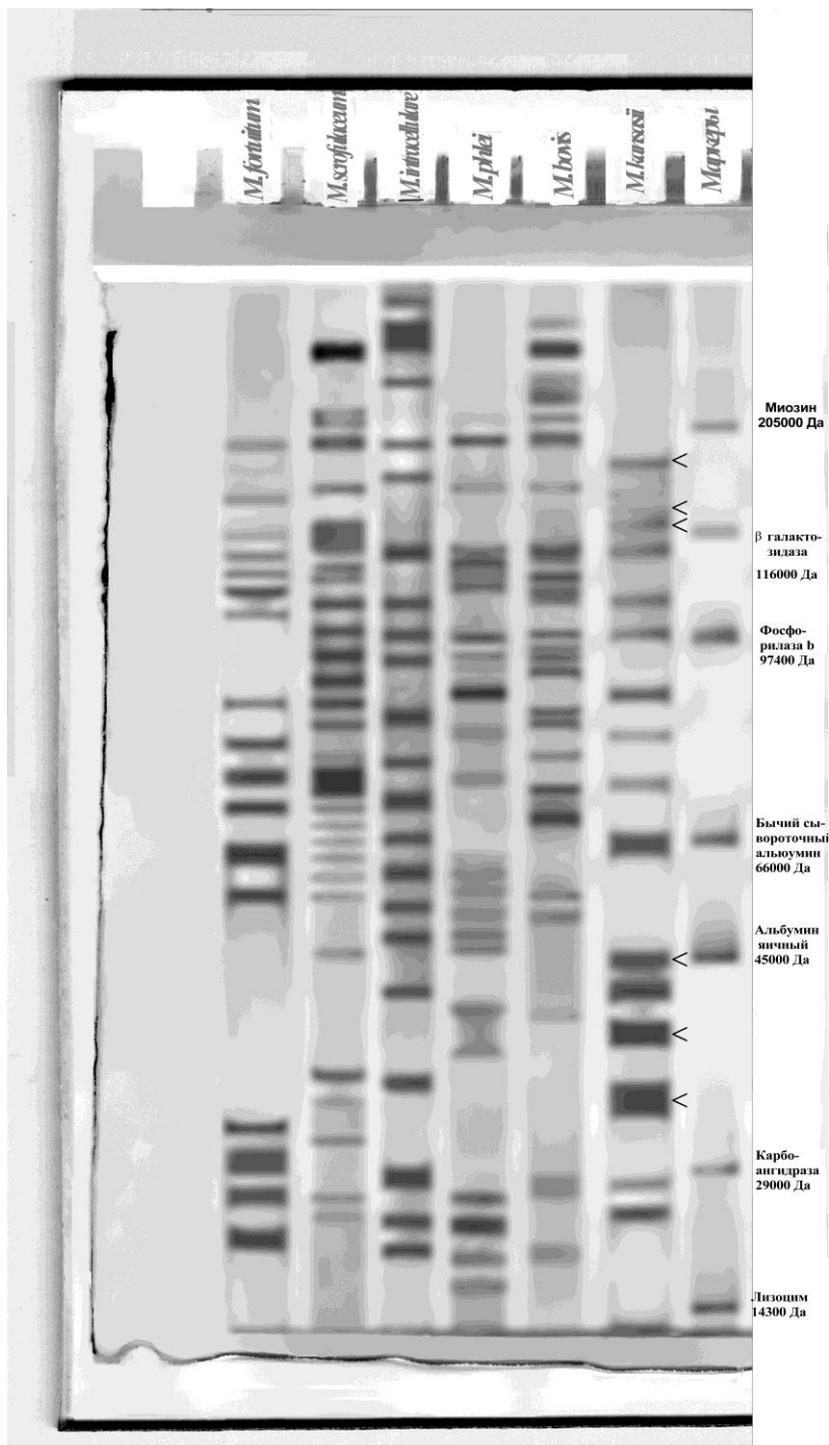


Рис. 3.4. Результаты электрофоретического разделения экстрактов поверхностных компонентов различных видов микобактерий в ПААГ в системе Laemmli. Стрелками отмечены «характерные» по электрофоретической подвижности фракции экстрактов *M. kansasii*.

Электрофореграммы анализировали, обращая внимание, главным образом, на различия в расположении и интенсивности окрашивания отдельных электрофоретических фракций экстрактов разных видов микобактерий. Необходимо отметить, что на этом этапе мы применяли окраску только белковых компонентов экстрактов по методике, описанной в разделе 2. Экстракты сравниваемых видов микобактерий располагали таким образом, чтобы они сформировали соседние треки. Как видно из рисунка 3.4 все исследованные штаммы отличались по числу выявленных электрофоретических фракций. Наибольшее количество фракций (до 41) обычно получали при электрофорезе экстракта *M. bovis*. В среднем же, фореграммы содержали по 20 – 30 фракций. В сравниваемых экстрактах имеется значительное количество фракций, не отличающихся или мало отличающихся по электрофоретической подвижности. В то же время, в экстрактах микобактерий каждого вида имеются фракции, характерные только для него. В частности, электрофореграмма экстракта *M. kansasii* содержит 6 таких фракций.

Молекулярную массу фракций определяли по методике, описанной в разделе. При этом для экстракта *M. kansasii* получены данные, отраженные в таблице 3.4.

Таблица 3.4.

Молекулярная масса электрофоретических фракций
экстракта *M. kansasii*

Молекулярная масса фракций, кДа	
«Характерных»	Общих с другими видами микобактерий
169,8; 128,8; 118,9; 46,8; 38; 32,4	141,3; 109,6; 102,3; 94,4; 86,1; 79,4; 72,4; 63,8; 43,7; 24; 21,4

Наличие значительного количества фракций экстрактов поверхностных компонентов *M. kansasii* и других видов микобактерий позволяет сделать

вывод о многокомпонентности экстрактов, полученных по описанному нами методу. Тем самым, несмотря на обилие компонентов с одинаковыми или близкими значениями молекулярных масс, повышается вероятность найти в экстрактах видоспецифические компоненты. Наличие 6 компонентов, свойственных только экстракту *M. kansasii*, может в принципе позволить идентифицировать этот микроорганизм по его электрофореграмме. Необходимо, однако, отметить, что наличие “уникальных” по молекулярной массе компонентов само по себе не означает их биологической специфичности. В то же время, свойственные разным видам микобактерий, одинаковые по молекулярной массе фракции, могли оказаться биологически различными.

Электрофорез в ПААГ в присутствии ДСН по Лэммли позволяет разделить компоненты смеси преимущественно по одному показателю – молекулярной массе. Детергент сообщает белковой молекуле большой избыток диссоциированных сульфогрупп, что приводит к разрушению высших структур белка, разворачиванию белковой молекулы и формированию ее эллипсоидной конфигурации. При этом собственный заряд белковой молекулы нивелируется, «теряясь» в общем сильноотрицательном заряде, сообщенном ДСН. 2 – меркаптоэтанол также способствует конформационным изменениям, поскольку разрушает дисульфидные связи. Таким образом, достигается возможность проводить разделение независимо от формы белковой молекулы и ее заряда и определить молекулярную массу разделяемых молекул.

Таким образом, на данном этапе исследований было показано, что получаемые экстракты поверхностных компонентов атипичных микобактерий представляют собой многокомпонентные системы, которые могут быть успешно разделены с помощью электрофореза в ПААГ по Лэммли. Многокомпонентность экстрактов делает возможным выявление среди их фракций видоспецифических компонентов. Наличие среди электрофоретических фракций экстрактов “характерных” по молекулярной массе косвенно подтверждают это предположение, однако с целью обнаружения и выделения

видоспецифических в биологическом отношении компонентов необходимо применение других методов.

3.3. Изучение физико–химических свойств экстрактов микобактерий методом ионообменной хроматографии

Для исследования основных физико-химических свойств экстрактов микобактерий использовали ионообменную хроматографию, спектрофотометрическое исследование хроматографических фракций экстракта *M. kansasii*, изучение их методами тонкослойной хроматографии и электрофореза в ПААГ.

3.3.1. Использование ионообменной хроматографии для фракционирования экстрактов микобактерий. Исследовали экстракты *M. kansasii*. Для определения оптимальных условий хроматографии проводили разделение цельных экстрактов, используя ступенчатую элюцию при различных значениях pH исходного буферного раствора и на различных типах ионообменников. Исследование поведения экстрактов при различной кислотности среды показало, что при pH менее 6,0 и использовании ацетатного буферного раствора наблюдается выпадение осадка из них. Это явление затрудняло разделение препаратов на катионообменниках - КМ–целлюлозе и КМ–сефадексе. Тем не менее, разделение на катионообменниках фильтрата экстракта *M. kansasii* при использовании различных условий не привело к удовлетворительным результатам, поскольку раствор, наносимый на колонку при использованных pH содержал слишком малое количество белка, попытки же повысить pH приводили к тому, что белки не закреплялись на колонке и выходили без разделения.

Такие затруднения с использованием катионообменников побудили нас использовать анионообменники. Вначале также провели ориентировочные эксперименты по подбору оптимального типа анионообменника, для чего использовали ДЭАЭ–целлюлозу и ДЭАЭ–сефадекс. В результате мы остано-

вили свой выбор на ДЭАЭ–целлюлозе, поскольку особенности поведения сефадекса (легкая деформируемость и малая стойкость гранул к механическим воздействиям, зависимость объема геля от ионной силы элюирующего буферного раствора) не давали возможности получать серийно воспроизводимые результаты.

Для получения оптимальных результатов ионообменной хроматографии на ДЭАЭ–целлюлозе вначале провели подбор рН и ионной силы исходного и элюирующих буферных растворов. Наличие белка во фракциях контролировали по Lowry и по Bradford, а также по поглощению при 260 и 280 нм. На рисунке 3.5 представлена выходная кривая по белку, наиболее типичная для первых экспериментов.

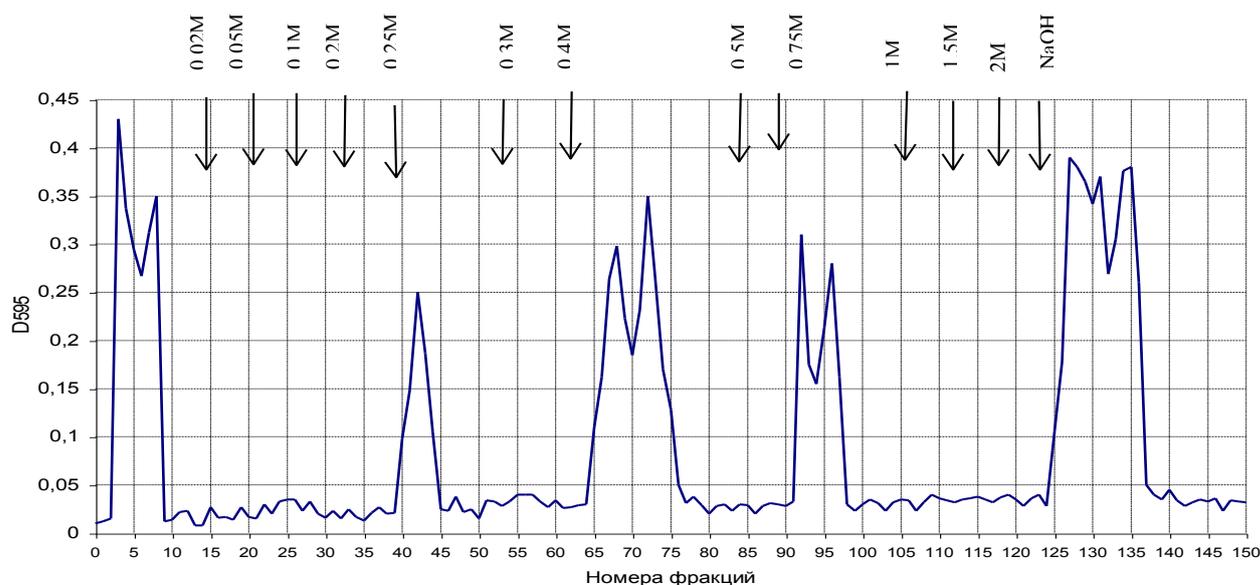


Рис.3.5. Хроматограмма 1 экстракта *M. kansasii*.

— - оптическая плотность фракций, D595; 0,02 М – 2 М – концентрации NaCl в 0,1 М трис-HCl буферном растворе; Фракции 1 – 14 – группа «А», фракции 15 – 124 – группа «В», фракции 125 – 150 – группа «С».

Эта хроматограмма получена путем определения поглощения по Bradford, поскольку в этом случае нивелировалось влияние примесей, в частности, нуклеиновых кислот.

Мы проводили ступенчатое увеличение концентрации NaCl (а, значит, и ионной силы) в элюирующем буферном растворе от 0,02 М до 2 М, что и отображено на хроматограмме. Как видно из рис.3.5, некоторые компоненты элюировались еще до начала повышения концентрации хлорида натрия. Такое явление отмечалось постоянно, несмотря на то, что в ориентировочных экспериментах мы варьировали рН буферных растворов от 6,0 до 10. Только снижение молярности исходного буферного раствора до 0,05 М позволяло адсорбировать на колонке такие компоненты. Увеличение концентрации хлорида натрия от 0,02 М до 0,2 М практически не вызывало элюции белка с колонки. Применение же концентрации соли 0,25 М вызвало образование выраженного пика. Очередные пики были получены лишь в результате применения высоких концентраций NaCl - 0,4 М и 0,75 М. При этом оба пика были двойными. Дальнейшее же повышение концентрации соли, вплоть до 2 М не приводило к появлению белка в элюате. Лишь применение 1 н. раствора NaOH позволило получить выход достаточно большого количества белка, при этом полученный пик также был двойным.

На основании результатов этого эксперимента можно было сделать вывод, что постепенное увеличение содержания соли от 0,02 М до 0,1 М нецелесообразно, поскольку это не приводило к элюции значительных количеств белка. Принимая во внимание, что большинство пиков были двойными, мы предположили неоднородность фракций, отвечающих этим пикам. Поэтому для разделения этих фракций предпочтительнее было использование более высокоразрешающего метода, каким является ионообменная хроматография с градиентной элюцией. Учитывая то, что белковые компоненты, формирующие на хроматограмме двойные пики должны были элюироваться при очень незначительном нарастании концентрации соли, при элюции было необходи-

мо создать весьма пологий градиент. В то же время, концентрации NaCl, при которых элюировались компоненты, формировавшие отдельные пики отличались значительно. Поэтому создание пологого градиента, охватывающего весь диапазон концентраций соли, наталкивалось на необходимость значительно увеличить время эксперимента и количество собираемых фракций. Такое проведение эксперимента было трудновыполнимо, поскольку увеличение его продолжительности влекло за собой опасность бактериального загрязнения колонки и фракций и разрушения содержащихся в них компонентов. Учитывая все это, мы предпочли вначале провести хроматографию с относительно крутым градиентом, разделить полученные фракции на 3 группы, а затем подвергнуть эти группы рехроматографии. Для удобства описания мы обозначили группы фракций буквами латинского алфавита. Группа А содержала компоненты, элюировавшиеся при рН и ионной силе исходного буферного раствора, то есть неадсорбированные протеины. Этой фракции соответствовали компоненты, адсорбировавшиеся при пониженной концентрации исходного буферного раствора – 0,05 М (по трис–HCl). Результаты рехроматографии этой группы фракций приведены на рисунке 3.6.

Как видно из рисунка, мы начинали рехроматографию с концентрации хлорида натрия в элюирующем буферном растворе 0,02 М. Очевидно, появление соли уже в столь незначительной концентрации оказалось достаточным для элюирования значительного количества протеинов. Дальнейшее постепенное наращивание концентрации хлорида натрия до значения 0,065 М привело к появлению второго, несколько меньшего, белкового пика.

Руководствуясь графиком хроматографии 1, мы повышали концентрацию соли до значения 0,1 М, что, однако, уже не приводило к появлению белка в элюате. Таким образом, в результате рехроматографии группа фракций А разделилась на хорошо дифференцированных субфракции, которые мы обозначили А₁ и А₂.

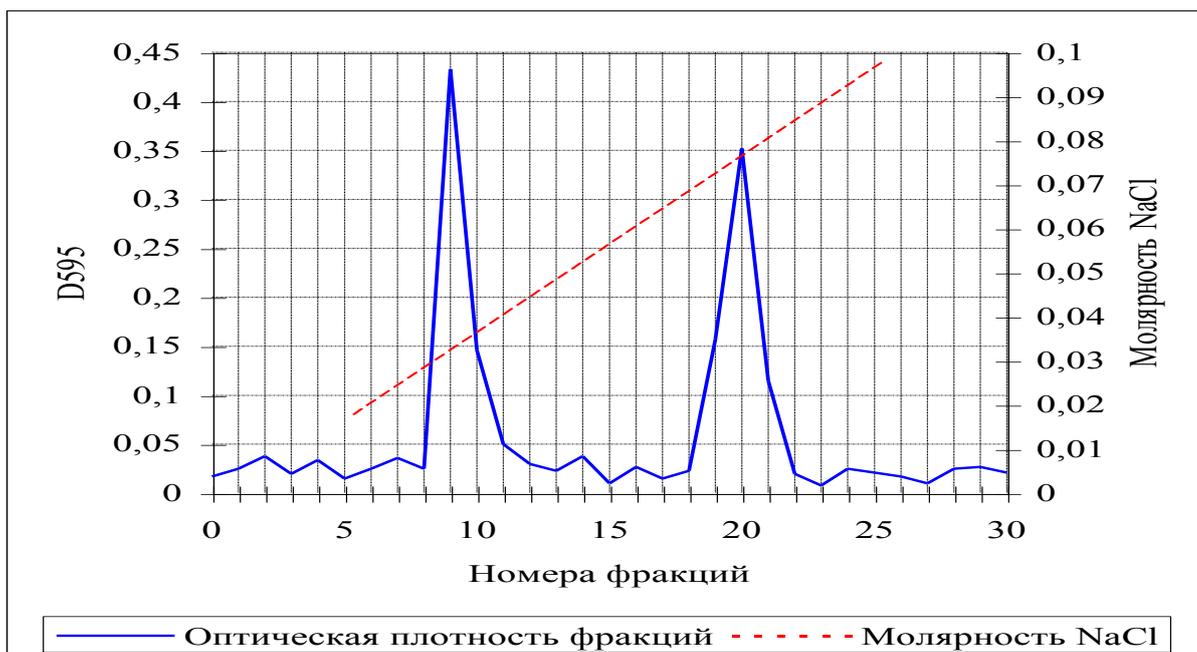


Рис. 3.6. Рехроматограмма фракций группы А экстракта *M. kansasii*.

Далее мы проводили рехроматографию фракций группы В, т.е. тех, которые адсорбировались на ионообменнике в 0,1 М трис–HCl буферном растворе рН 6,8, содержащем хлорид натрия в концентрации 0,2 М. Группа фракций В характеризовалась значительно более прочной адсорбцией на ионообменнике и элюировалась в диапазоне концентраций соли от 0,25 М до

0,8 М. По описанным выше причинам мы разделили эту группу фракций на две части – элюирующуюся в промежутках между 0,25 М – 0,3 М и 0,4 М – 0,8 М. Вначале подвергали дополнительному разделению фракцию, элюирующуюся под влиянием 0,25 М раствора соли. Результаты этого эксперимента демонстрирует рисунок 3.7.

Поскольку уже на хроматограмме 1 данный пик одинарный, мы и при рехроматографии не ожидали появления дополнительных пиков. Тем не менее, мы с осторожностью подошли к наращиванию концентрации хлорида натрия в элюирующем буферном растворе. Прежде всего, диапазон изменения концентрации был невелик – от 0,2 до 0,28 М, а распространялся он на 9

фракций, т.е. градиент получался достаточно пологим, что могло выявить дополнительные белковые пики.

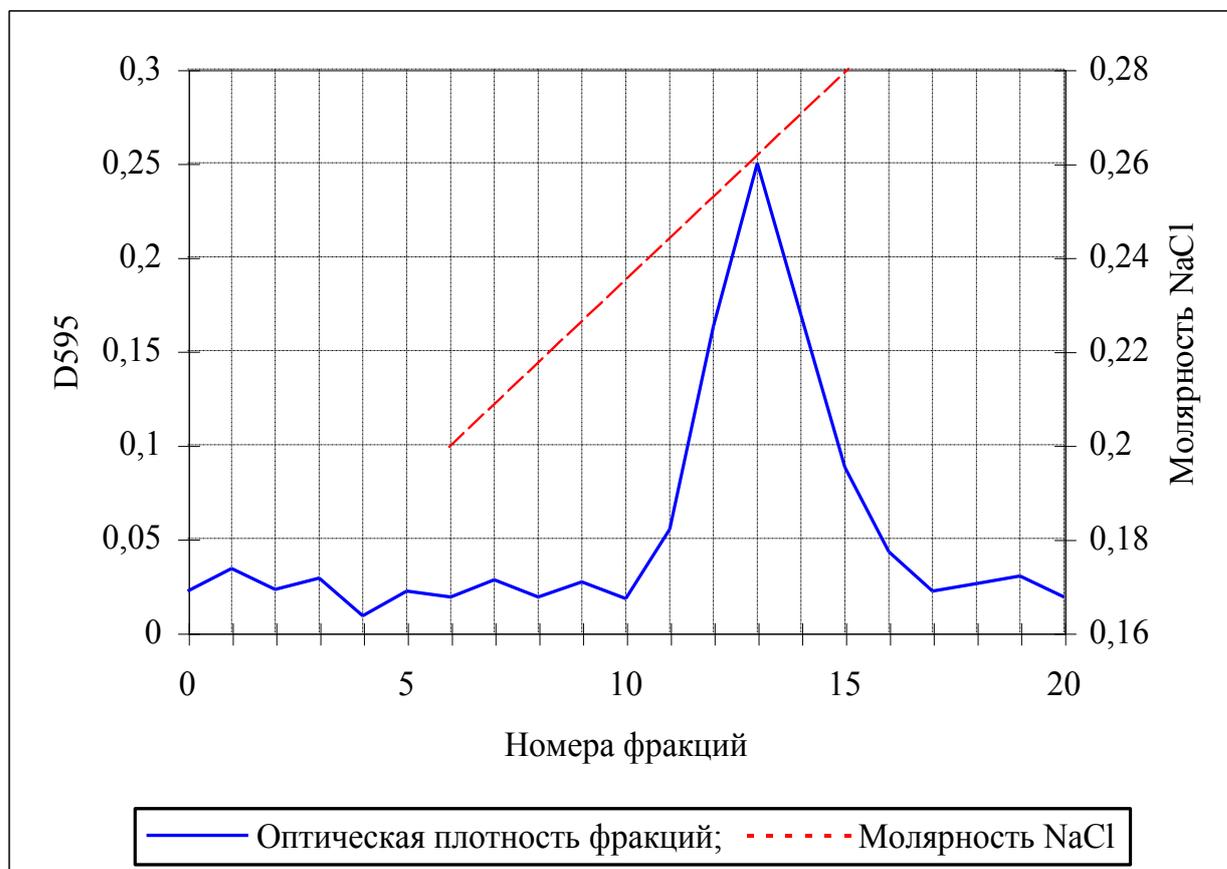


Рис.3.7. Рехроматограмма 1 фракций группы В экстракта *M. kansasii*.

Однако этого не происходило, что свидетельствовало о неделимости данной фракции в выбранных условиях. Эту фракцию мы обозначили B_1 .

Далее проводили рехроматографию фракций, элюировавшихся в диапазоне концентраций хлорида натрия 0,4 М – 0,8 М. Это привело к результатам, отображенным на рисунке 3.8.

Как видно из рис.3.8, двойные фракции группы В удовлетворительно разделились на субфракции. При этом обнаруживались фракции, элюировавшиеся при 0,41 М, 0,48 М, 0,75 М и 0,81 М. Эти фракции мы обозначили соответственно B_2 , B_3 , B_4 , B_5 .

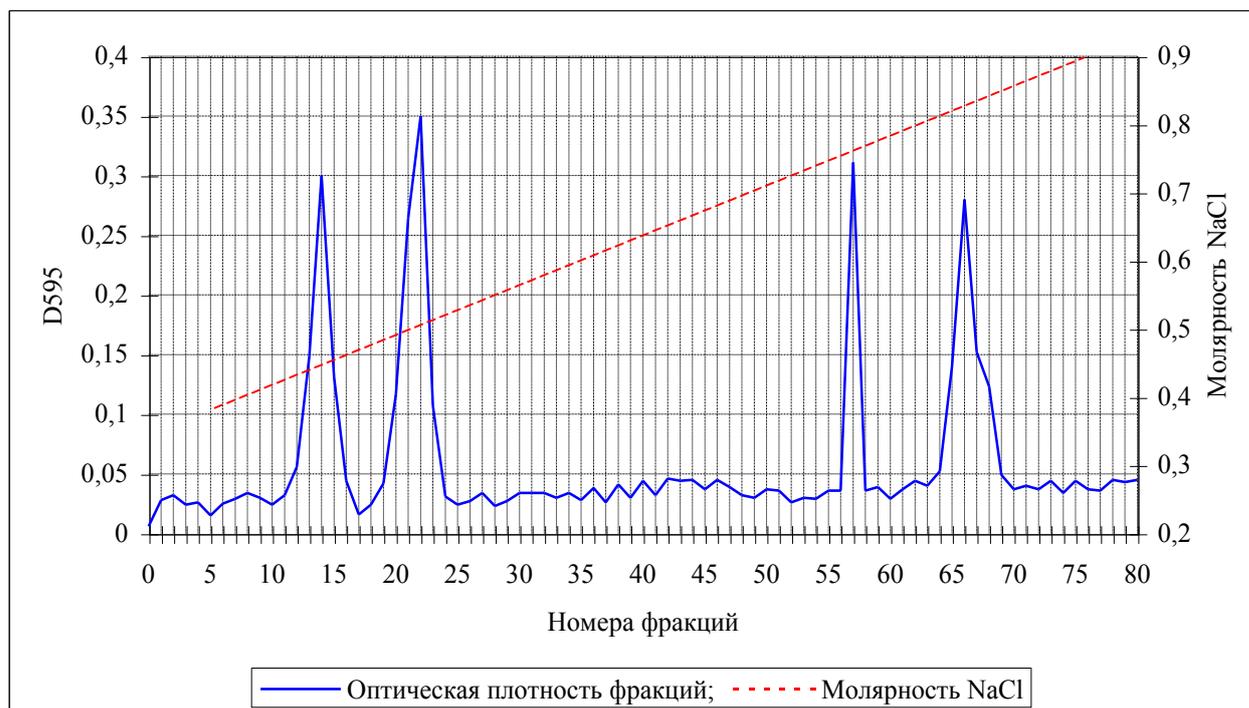


Рис.3.8. Рехроматограмма 2 фракций группы В экстракта *M. kansasii*.

Фракции группы С не могли быть элюированы лишь повышением ионной силы буферного раствора (в ориентировочных экспериментах мы делали попытки элюировать такие компоненты с применением хлорида калия в концентрации до 10 М, что не привело к сколько – нибудь удовлетворительным результатам). Лишь применение 1 н. NaOH позволяло элюировать такие компоненты. Учитывая то, что пик фракций С на хроматограмме не был однородным, мы применяли для рехроматографии градиентную элюцию с постепенным повышением рН от 8,5 до 12, что демонстрирует рисунок 3.9.

В результате рехроматографии фракции С экстракта *M. kansasii*, как это видно из рис.3.9, получены 3 хроматографические фракции с наивысшим содержанием белка. Фракции, элюировавшиеся под влиянием рН буферного раствора 8,9; 9,8; 11,1 мы обозначили соответственно С₁, С₂, С₃.

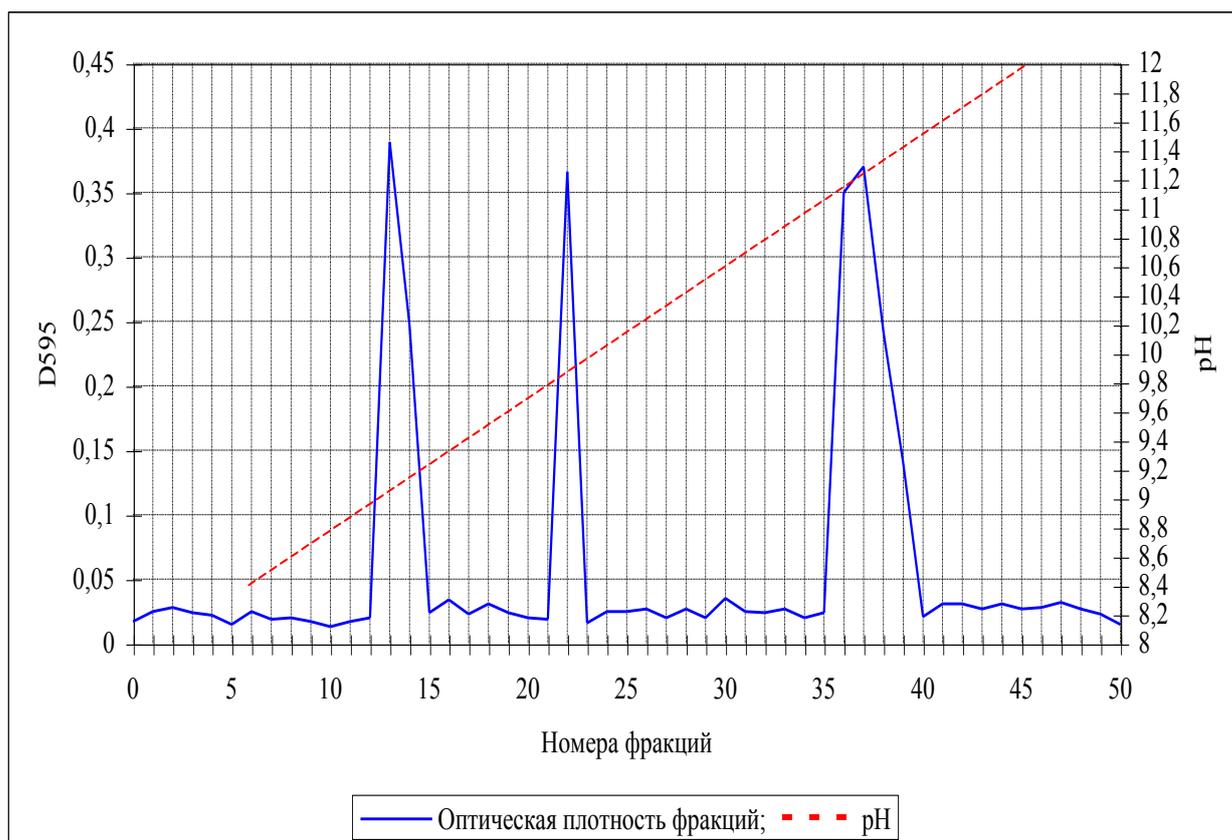


Рис. 3.9. Рехроматограмма фракций группы С экстракта *M. kansasii*

Таким образом, в результате хроматографического разделения экстракта *M. kansasii* получены 10 фракций. Поскольку исследование экстракта того же вида методом электрофореза в ПААГ привело к получению 17 электрофоретических фракций, есть основания полагать, что выделенные хроматографические фракции все же не являются в полной мере однородными. Для дальнейшего их исследования было необходимо изучить физико-химические свойства и состав фракций методами спектрофотометрии и тонкослойной хроматографии.

3.3.2. Спектрофотометрическое исследование хроматографических фракций экстракта *M. kansasii*. Для спектрофотометрического исследования мы объединили все фракции каждой группы. Исследовали поглощение каждой группы фракций при 260 и 280 нм,

а также применяя методы Lowry и Bradford. Полученные в результате объединения фракции содержали значительное количество белка, которое, однако, можно было оценить, пользуясь калибровочной кривой для метода Bradford. Для определений же по Lowry пробы обычно приходилось разводить вдвое, а затем результаты экстраполировать на неразведенные препараты. Поскольку в ходе ионообменной хроматографии можно было ожидать неодинакового распределения РНК по фракциям, было необходимо контролировать ее наличие в них. Несмотря на то, что в наносимом на колонку экстракте не содержалось ДНК в определяемых количествах, нельзя было исключить ее выхода с колонки в виде небольшого, но концентрированного пика. Таким образом, необходимо было контролировать содержание обоих видов нуклеиновых кислот. Для этого применяли орциновый и дифениламиновый методы. Ввиду незначительного содержания нуклеиновых кислот их определения приходилось вести с большим объемом (10 см^3) образца с последующим пересчетом в $\text{мкг}/\text{см}^3$. Результаты этой серии экспериментов сведены в таблицу 3.5.

Как следует из табл. 3.5, фракции весьма переменны в отношении содержания белка. Это можно объяснить присутствием в цельном экстракте протеинов, характеризующихся большими различиями в способности сорбироваться на ионообменнике при выбранных нами условиях.

Так, фракция A_1 , которая вообще не адсорбировалась на ДЭАЭ-целлюлозе при обычно применявшихся нами концентрациях исходного буферного раствора ($0,1 - 0,2 \text{ М трис-НCl}$), содержала $320 \text{ мкг}/\text{см}^3$ белка. В группе фракций В, которые адсорбировались при обычных концентрациях исходного буферного раствора и элюировались при повышении ионной силы раствора, наибольшей концентрацией белка отличалась фракция B_3 , содержавшая его $250 \text{ мкг}/\text{см}^3$. Фракции С все содержали значительное количество белка, однако наибольшая концентрация его отмечалась во фракции C_1 .

Таблица 3.5.

Результаты спектрофотометрического изучения фракций экстракта *M. kasii*, полученных методом ионообменной хроматографии

Наименование фракции	Изучаемое свойство						
	D ₂₆₀	D ₂₈₀	D _{Lowry}	D _{Bradford}	Содержание белка, мкг/см ³	Содержание РНК, мкг/см ^{3*}	Содержание ДНК, мкг/см ^{3*}
A ₁	0,163	0,284	2,100	0,260	320	-	-
A ₂	0,13	0,225	1,734	0,220	250	-	-
B ₁	0,025	0,047	0,464	0,030	51	-	-
B ₂	0,103	0,180	1,522	0,200	203	-	-
B ₃	0,129	0,225	1,742	0,221	250	-	-
B ₄	0,105	0,183	1,544	0,213	205	-	-
B ₅	0,110	0,174	1,464	0,192	188	0,6	-
C ₁	0,473	0,422	1,962	0,241	295	13,9	-
C ₂	0,435	0,384	1,862	0,231	270	12,6	-
C ₃	1,044	0,703	1,902	0,242	280	34,6	-

*) Примечание. Прочерки в этих столбцах означают, что нуклеиновые кислоты в пробах не обнаружены. По-видимому, это могло свидетельствовать либо об их полном отсутствии, либо о том, что их содержание не превышало нижней границы чувствительности применяемых методов детектирования.

Из таблицы 3.5 следует, что ДНК не определялась ни в одной из фракций. По нашему мнению, это служит еще одним доказательством отсутствия ее в исходном экстракте. В то же время РНК обнаруживалась во фракциях группы С и, в незначительном количестве, во фракции В₅. При этом

наибольшая концентрация РНК отмечена во фракции С₃, элюировавшейся при наиболее высоких значениях рН. Такое перераспределение РНК между фракциями в процессе ионообменной хроматографии объясняется, по нашему мнению, высокой способностью нуклеиновых кислот к адсорбции на анионообменниках. Этому способствует как общий отрицательный заряд молекул РНК, так и значительное число ионогенных группировок в них, что и приводит к значительной прочности связывания этих макромолекул с матрицей ионообменника. Поскольку во фракциях С определяется также белок, можно предположить, что в них имеются рибонуклеопротеиды.

В то же время, такой характер распределения нуклеиновых кислот между фракциями, по-видимому, может свидетельствовать в пользу достаточной степени очистки других фракций от РНК.

3.3.3. Исследование полученных фракций методом тонкослойной хроматографии. Поскольку экстракты, помимо белка и нуклеиновых кислот могли содержать соединения другого химического состава, мы провели исследование экстрактов и их фракций на присутствие веществ углеводной и липидной природы. Методики исследования детально были описаны в разделе 2.3. Результаты этих экспериментов сведены в таблицу 3.6.

Как видно из данных табл. 3.6, цельный экстракт *M. kansasii* содержит как углеводы (проявление с помощью ультрафиолетового излучения, паров йода и реагента Шиффа), так и вещества липидной природы (проявление парами йода, родамином 6 G, суданом черным). Однако распределение этих компонентов между хроматографическими фракциями неодинаково. Обращает на себя внимание наличие сахаров во всех фракциях группы С и во фракции В₅. Учитывая то, что в этих же фракциях, по данным спектрофотометрического исследования и колориметрических реакций отмечалось наличие РНК, можно предположить, что эти сахаристые вещества образовались в ре-

зультате частичного разрушения этой нуклеиновой кислоты в результате предшествовавших манипуляций и в ходе проявления хроматограммы.

Таблица 3.6.

Результаты исследования экстракта *M. kansasii* и его фракций на присутствие компонентов липидной и углеводной природы методом тонкослойной хроматографии

Исследуемый препарат	Метод проявления хроматограммы				
	Реактив Шиффа	УФ - излучение	Пары йода	Родамин 6G	Судан черный
A ₁	+	+	+	-	-
A ₂	+	+	+	-	-
B ₁	-	-	-	-	-
B ₂	-	-	-	+	+
B ₃	-	-	-	-	-
B ₄	-	-	+	-	+
B ₅	+	+	+	+	+
C ₁	+	+	+	-	-
C ₂	+	+	+	-	-
C ₃	+	+	+	-	-
Цельный экстракт	+	+	+	+	+

Углеводы, однако, выявлялись и в хроматографических фракциях A₁ и A₂. Обе эти фракции значительно хуже адсорбировались на колонке, чем фракции других групп, однако уменьшением ионной силы исходного буферного раствора все же удавалось провести этот процесс. Поэтому можно предположить, что молекулы сахаров, входящих в состав фракций A₁ и A₂, либо сами несут слабый отрицательный заряд, либо связаны с белками и, таким

образом, формируют гликопротеиды. Компоненты липидной природы были сосредоточены лишь во фракциях В₂, В₄ и В₅. При этом только во фракции В₅ липидные компоненты присутствовали совместно с углеводными. Остальные две липидсодержащие фракции были свободны от углеводного компонента. Все три фракции давали реакцию на липопротеиды, что, по-видимому, отвечает природе этих липидсодержащих компонентов. Отсутствие же у фракции В₄ взаимодействия с родамином G 6, возможно, вызвано относительно невысоким содержанием липидного компонента в ней.

Таким образом, в результате исследования химического состава цельного экстракта *M. kansasii* и его фракций было показано, что в результате проведения ионообменной хроматографии достигается разделение не только белковых компонентов, но и веществ иной химической природы. Тем самым еще раз была подтверждена многокомпонентность экстрактов, что вызывало необходимость более четко определить характер разделения и распределения различных веществ, формирующих экстракт. С этой целью мы применили электрофорез в ПААГ.

3.3.4. Исследование хроматографических фракций экстракта *M. kansasii* методом электрофореза в ПААГ. Поскольку в ходе ионообменной хроматографии экстракта *M. kansasii* мы получили 10 фракций, а электрофорез в ПААГ позволял выявить в том же экстракте не менее 17 протеиновых компонентов, было очевидно, что не все хроматографические фракции являются однокомпонентными. Изучение же химического состава этих фракций лишней раз подтвердило этот вывод. Разделение при электрофорезе в системе Laemmli происходит, главным образом, в зависимости от молекулярной массы разделяемых компонентов и, в меньшей степени, в зависимости от конформации молекул. Разделение же при ионообменной хроматографии в конкретных условиях происходит по признаку распределения зарядов в молекуле, что, в определенной степени также зависит от конформации молекулы. Следовательно, было достаточно сложно

сопоставить результаты хроматографического и электрофоретического разделения экстракта. Для анализа этих данных, а также для определения характера распределения протеинов между хроматографическими фракциями, мы подвергли их электрофорезу в ПААГ. Техника проведения электрофореза не отличалась от описанной в разделе 2. Результаты разделения приведены на рис. 3.10.

Как видно из рисунка, в основном, электрофоретические фракции сохранили свою подвижность и после ионообменной хроматографии. Лишь фракции группы С приобрели несколько более высокую подвижность, что, возможно, связано с частичной дезинтеграцией входившего в их состав белка под действием щелочи. По нашему мнению, сохранность относительной подвижности белков может свидетельствовать о том, что разрушение макромолекул в процессе проведения ионообменной хроматографии не было значительным. Необходимо отметить, что распределение бактериопротеинов между хроматографическими фракциями было неравномерным. Фракции А₁, А₂, В₁, В₄, С₃ содержали по одному компоненту, тогда как фракции В₂, В₃, В₅, С₁ – по два. Фракция С₂ содержала даже три компонента. Однако общее количество вновь полученных электрофоретических фракций (16) все же меньше, чем было при электрофорезе цельного экстракта (17).

Рассмотрение электрофореграммы показывает, что утрачена фракция с молекулярной массой 141,3 кДа, которая и в исходном образце была слабо выражена, что свидетельствовало о низком содержании компонента, формирующего эту фракцию. Возможно, именно по этой причине стало невозможным детектировать его после проведения ионообменной хроматографии.

Полученная электрофореграмма была подвергнута анализу с целью определения молекулярных масс протеиновых компонентов, присутствующих на ней. Данные этого анализа сведены в таблицу 3.7.

Из табл. 3.7 видно, что хроматографические фракции, содержащие более одного компонента, объединяют протеины с различными молекулярными массами.

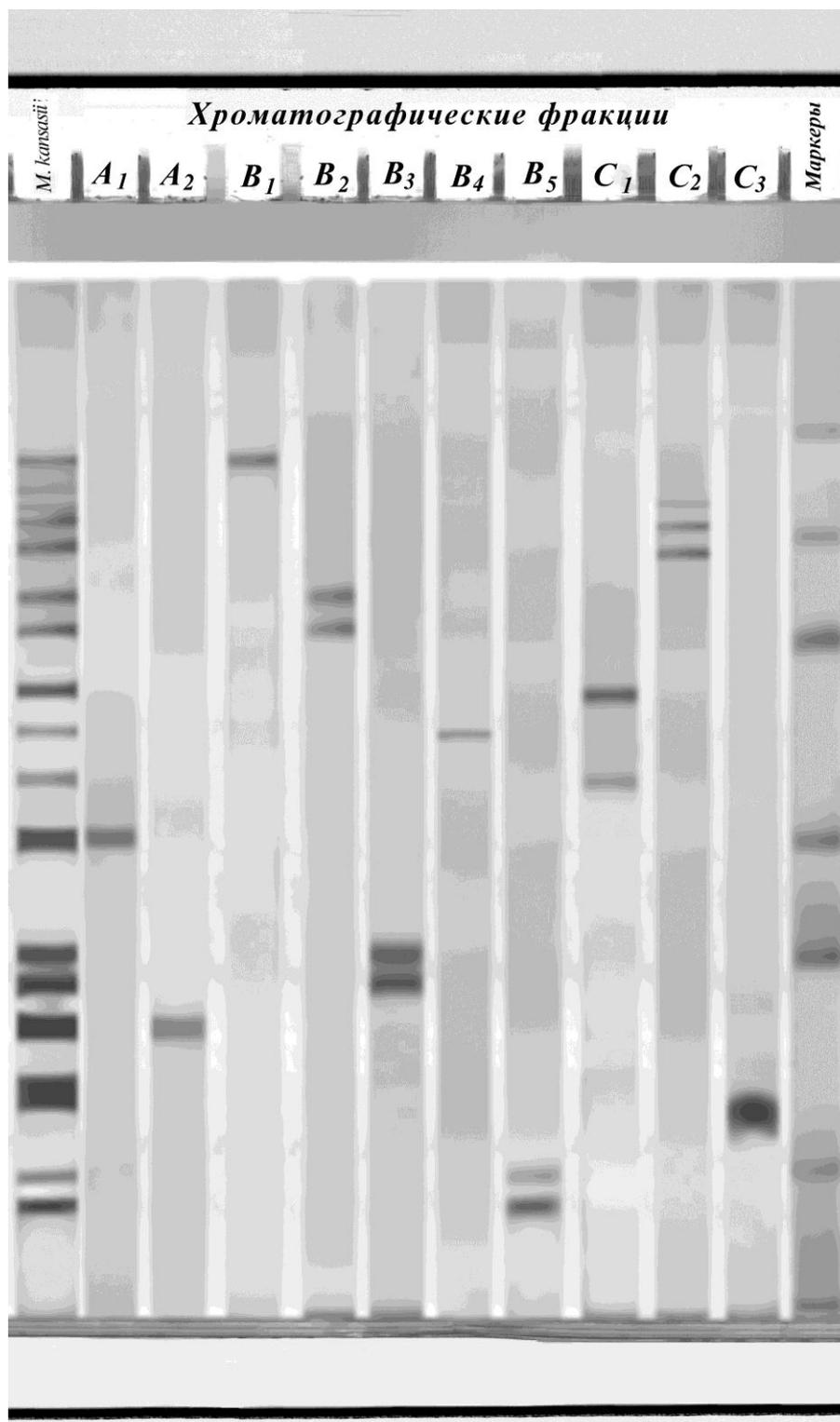


Рис. 3.10. Результаты электрофоретического разделения в ПААГ хроматографических фракций экстракта поверхностных компонентов *M. kansasii*.

Таблица 3.7.

Молекулярная масса компонентов, входящих в состав фракций, полученных при ионообменной хроматографии

Фракция	Исследуемое свойство		
	Rf	IgM	M _r , кДа
A ₁	0,55	4,805	63,8
A ₂	0,733	4,58	38,0
B ₁	0,18	5,23	169,8
B ₂	0,31	5,01	102,3
	0,35	4,975	94,4
B ₃	0,67	4,67	46,8
	0,69	4,64	43,7
B ₄	0,44	4,9	79,4
B ₅	0,88	4,38	24,0
	0,9	4,39	21,4
C ₁	0,49	4,86	72,4
	0,4	4,935	86,1
C ₂	0,23	5,11	128,8
	0,24	5,075	118,9
	0,27	5,04	109,6
C ₃	0,8	4,51	32,4

При этом, видно, что хроматографические фракции, содержащие более одного компонента, объединяют протеины с различными молекулярными массами. В некоторых фракциях, как, например, В₃ и В₅, это различие мало выражено, тогда как в других – В₂, С₁, С₂ оно более значительно. Поэтому говорить о молекулярной массе конкретной хроматографической фракции можно лишь в приложении к однокомпонентным фракциям.

По нашему мнению, отсутствие разделения этих фракций в результате ионообменной хроматографии и электрофореза в ПААГ, является достаточной гарантией их однокомпонентности. Многокомпонентные хроматографические фракции могли содержать компоненты, гетерогенные как по молекулярной массе, так и по электрофоретической подвижности. Поэтому здесь можно говорить об усредненном значении молекулярной массы, вычисленном, исходя из молекулярной массы каждого компонента и его массовой доли в во фракции в целом, определенной по данным денситометрического анализа. Однако подобное исследование выходило за рамки целей и задач нашей работы.

Таким образом, в результате проведения ионообменной хроматографии и и разностороннего исследования полученных фракций было подтверждено, что экстракт поверхностных компонентов *M. kansasii* является многокомпонентной системой. Были подобраны условия адсорбции и элюирования компонентов экстракта, причем было показано, что методом ионообменной хроматографии он удовлетворительно разделяется на десять фракций. Некоторые из полученных фракций на основании исследований по дальнейшему разделению и изучения химического состава могли быть признаны однокомпонентными. В то же время, оказалось, что другие фракции неоднородны, что может ставить задачу дальнейшего их разделения. Ионообменная хроматография, в целом, позволяет контролируемым образом перераспределить продукты небелковой природы между фракциями и тем самым, очистить некоторые из них. Среди полученных хроматографических фракций физико–химическими

методами не были выявлены видоспецифические компоненты, что требует для достижения этой цели применения иных, в частности иммунологических, методов.

3.4. Изучение антигенной структуры экстрактов *M. kansasii*

3.4.1. Изучение антигенной активности фракций экстракта *M. kansasii* и его фракций в РПГ. Высокая специфичность представляет собой важнейшее преимущество методов иммунологического анализа, причем для них характерна одновременно и высокая чувствительность. В частности, при концентрации белка $50 - 5 \text{ мкг/см}^3$ еще наблюдается образование преципитатов в РПГ [28, 31]. При этом разброс данных в сериях определений не превышает 3 - 7 %. Однако постановка РПГ, как и других иммунологических реакций требует определенного соотношения между реагентами. Принцип метода обеспечивает «автоматическое» формирование необходимого соотношения антиген–антитело в слое геля. За счет этого явления преципитат может сформироваться в достаточно широком интервале соотношений реагентов, вносимых в резервуары для диффузии. Тем не менее, избыток одного из реагентов негативно влияет на результаты реакции – полосы преципитатов становятся размытыми, сливаются, меняется и их взаимное расположение, что может повлечь получение ненадежных данных. В то же время невозможно чрезмерно уменьшать концентрации реагентов, поскольку требуемое минимальное их количество диктуется возможностью формирования видимого преципитата. Резкое несоответствие концентраций реагентов может привести и к другой группе артефактов – полному размыванию полос и к их ложному раздвоению. Таким образом, для сравнения препаратов по числу компонентов необходимо выполнить раститровку антигена с различными разведениями сыворотки вплоть до абсолютного предела чувствительности реакции, а также произвести иммуноэлектрофоретическое определение числа антигенов.

Использованные в наших экспериментах экстракты, в частности, *M. kansasii*, представляли собой многокомпонентную систему, причем компоненты, очевидно, присутствовали в различных концентрациях. Это существенно затрудняло подбор оптимальных разведений экстрактов и сывороток, поскольку концентрация, пригодная для определения одного антигенного компонента могла оказаться совершенно неприменимой для другого. В связи с этим для цельного экстракта приходилось считать оптимальным такое соотношение реагентов, которое обеспечивало максимальное количество преципитационных линий.

Для определения оптимального соотношения реагентов экстракт *M. kansasii* и соответствующую антисыворотку разбавляли до такого разведения, в котором уже не наблюдалось образования видимого преципитата. Пример такого определения приведен на рисунке 3.11, а результаты – в таблице 3.8.

Из данных таблицы 3.8 видно, что наибольшее количество преципитационных линий наблюдалось при разведении антисыворотки 1 : 2 и неразведенном экстракте (лунка № 2 на рисунке 3.11).

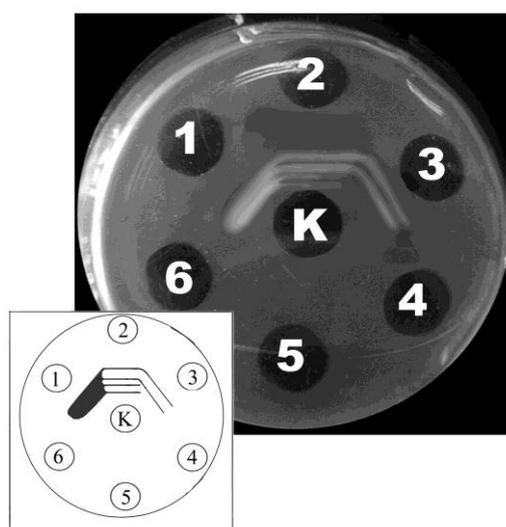


Рис. 3.11. Определение оптимального соотношения реагентов для РПГ с участием экстракта *M. kansasii*: К – цельный экстракт *M. kansasii*; 1 – цельная

антисыворотка к *M. kansasii*; 2 – разведение 1 : 2 антисыворотки к *M. kansasii*; 3 - разведение 1 : 4 антисыворотки к *M. kansasii*; 4 - разведение 1 : 4 антисыворотки к *M. kansasii*; 5 – 0,15 М трис-НСl буферный раствор; 6 – нормальная кроличья сыворотка.

Таблица 3.8.

Реакция преципитации в геле с участием экстракта *M. kansasii* в “шахматной расстановке”

Разведение антисыворотки <i>M. kansasii</i>	Количество линий преципитации при разведении экстракта						
	1 (исх.)	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64
1 (исх.)	3	3	2	2	2*	1*	0
1 : 2	4	3	2	2*	1	1*	0
1 : 4	3	3	2	2*	1	0	0
1 : 8	3	2	2	2*	1	0	0
1 : 16	3	2	1	1*	1*	0	0
1 : 32	2	1	1*	1*	1*	0	0
1 : 64	0	0	0	0	0	0	0

*) Примечание. Знак * означает, что указанное количество полос преципитации появлялось после обработки 0,065 % водным раствором CdSO₄.

Фракции экстрактов, полученные в ходе ионообменной хроматографии могли содержать антигенные компоненты в концентрациях, отличающихся от таковых в исходном экстракте. Поэтому для каждой фракции было необходимо отдельно определять оптимальное соотношение реагентов. Техника таких определений не отличалась от описанной для цельного экстракта *M. kansasii*. Предварительно содержание белка во всех фракциях было приведено к 1 мг/см³. Полученные в результате этих экспериментов данные сведены в таблицу 3.9.

Как можно видеть из таблицы 3.9, только некоторые фракции оказались реакционноспособными. Для них были определены оптимальные соотношения реагентов, которые мы и применяли в дальнейшем. Прочие же фракции - A₂, B₂, B₅, C₂, C₃, несмотря на примененный широкий диапазон концентраций ингредиентов, не давали видимой преципитации.

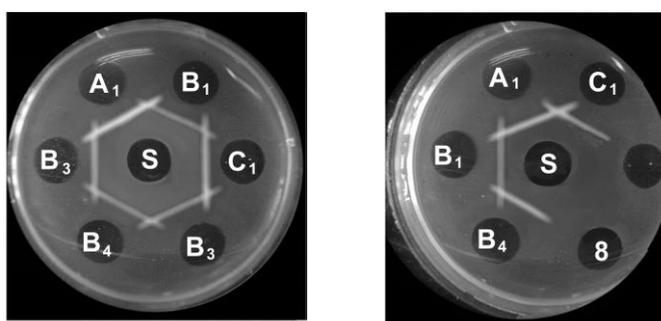
Таблица 3.9.

Оптимальные соотношения реагентов при постановке РПГ с фракциями экстракта *M. kansasii* и соответствующей антисывороткой

Наименование фракции	Оптимальные разведения реагентов	
	Фракция экстракта <i>M. kansasii</i>	Антисыворотка “ <i>M. kansasii</i> ”
A ₁	1 : 4	Цельная
A ₂	Нет реакции	Нет реакции
B ₁	Цельный	1 : 2
B ₂	Нет реакции	Нет реакции
B ₃	1 : 2	Цельная
B ₄	1 : 2	Цельная
B ₅	Нет реакции	Нет реакции
C ₁	1 : 4	Цельная
C ₂	Нет реакции	Нет реакции
C ₃	Нет реакции	Нет реакции

По-видимому, это можно объяснить отсутствием в этих фракциях компонентов, несущих антигенные детерминанты, их низкой концентрацией либо низкой антигенностью. Таким образом, уже на этом этапе удалось разграничить фракции по признаку содержания в них антигенных компонентов, поэтому оказалось возможным ограничить круг дальнейших исследований реакционноспособными фракциями.

В процессе экспериментов по определению оптимального соотношения антиген – антисыворотка выяснилось, что все реакционноспособные фракции давали в РПГ только одну линию, тогда как цельный экстракт давал четыре линии. Это могло свидетельствовать о достигаемом в ходе ионообменной хроматографии разделении антигенных компонентов, входящих в состав цельного экстракта. Поэтому было необходимо определить, насколько сопоставимы антигенные свойства хроматографических фракций друг с другом и с цельным экстрактом. Для решения этой задачи в центральную лунку вноси-



ли антисыворотку *M. kansasii*, а по периферии – хроматографические фракции одноименного экстракта. Все антигенные компоненты, взятые в этот эксперимент, были реакционноспособными. Поэтому для сравнения получаемых линий требовалось разместить антигены так, чтобы каждый из них хотя бы раз оказался в паре с другим и с цельным экстрактом, что и отражает рисунок 3.12.

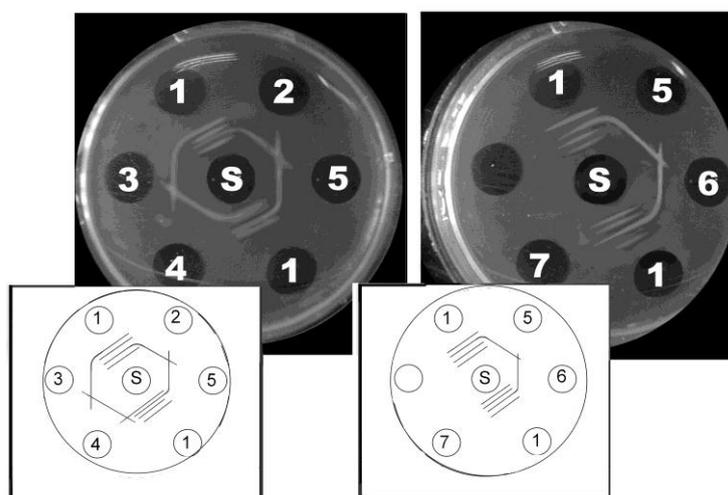


Рис. 3.12. Антигенные свойства реакционноспособных фракций хроматографических фракций экстракта *M. kansasii* в сравнении с цельным экстрактом и друг с другом: S – антисыворотка к *M. kansasii*; K – цельный экстракт *M. kansasii*; A₁, B₁, B₃, B₄, C₁ – соответствующие фракции экстракта *M. kansasii*; T – 0,15 М трис–HCl буферный раствор; 8 – изотонический раствор хлорида натрия.

Из рисунка можно видеть, что большинство фракций оказались неродственными в антигенном отношении, т.е. содержали разные антигенные детерминанты.

Только фракции B₄ и C₁ давали реакцию «частичной антигенной идентичности» по отношению друг к другу. «Частичная идентичность» фракций B₄ и C₁ может быть объяснена тем, что какой-либо антигенный компонент фракции C₁ в ходе ионообменной хроматографии подвергся изменениям, что могло частично изменить и его антигенную специфичность. Компоненты, формирующие эти две фракции различны по их способности к адсорбции на ДЭАЭ–целлюлозе и имеют различную подвижность при электрофорезе в ПААГ, но при этом мало отличаются по антигенным свойствам. Это может объясняться тем, что некоторые общие антигенные детерминанты находятся на поверхности молекул с различным составом и свойствами.

В целом, сопоставление полученных в ходе электрофореза в ПААГ данных и иммунологических свойств хроматографических фракций позволяет предположить их антигенную неоднородность. Так, фракции B₃ и C₁, содержавшие по 2 компонента с различной электрофоретической подвижностью, давали по одной линии преципитации. При оценке результатов РПГ необходимо было учитывать относительно невысокую разрешающую способность метода, а также возможность появления артефактов, вызванных различными причинами. Поэтому для дальнейшего анализа сложной смеси антигенов, какой является экстракт *M. kansasii*, мы применили метод иммуноэлектрофореза в агарозном геле.

3.4.2 Изучение антигенной активности экстракта *M. kansasii* и его фракций методом иммуноэлектрофореза. Поскольку метод иммуноэлектрофореза обладает значительно большей разрешающей способностью в определении числа антигенов по сравнению с РПГ, было интересным изучить состав экстракта *M. kansasii* и его хроматографических фракций. Для этого проводили электрофоретическое разделение цельного экстракта *M. kansasii* параллельно с каждой из его хроматографических фракций, что иллюстрирует рисунок 3.13.

Как видно из рисунка 3.13, цельный экстракт *M. kansasii* разделился в ходе электрофореза на 9 компонентов, что значительно больше, чем было выявлено методом РПГ. При этом компоненты, формировавшие преципитационные дуги, различались по электрофоретической подвижности. Можно видеть, что, если большинство компонентов двигалось по направлению к аноду, то компоненты фракции A_1 мигрировали, хотя и в небольшой степени, к катоду. Учитывая то, что в качестве гелеобразующего вещества использовали агарозу для электрофореза, можно было надеяться, что явление электроэндоосмоса было сведено к минимуму и компоненты мигрировали в соответствии с их собственной электрофоретической подвижностью. Поэтому можно предполагать, что компоненты фракции A_1 в данной системе несут противоположный остальным компонентам заряд.

Обращает на себя внимание также и то, что, по результатам электрофореза в ПААГ и ионообменной хроматографии, фракция A_1 содержала лишь один компонент, в процессе иммуноэлектрофореза же было выявлено два компонента. Это явление может быть объяснено тем, что в этих методах для разделения используются различные свойства компонентов. В частности, как указывалось, электрофорез по Лэммли позволяет разделить молекулы по молекулярной массе, конформация же молекулы при этом имеет весьма ограниченное значение. При ионообменной хроматографии разделение происходит в зависимости от распределения зарядов на поверхности молекулы, а, следо-

вательно, конформация играет намного большую роль. При иммуноэлектрофорезе разделение происходит в зависимости как от суммарного заряда белковой молекулы, так и от ее конформации и размеров. Проявление же иммунофореграммы осуществляет иммунная сыворотка, выявляющая лишь антигенные компоненты. Таким образом, можно предположить, что антигенные компоненты фракции A_1 характеризуются близкими значениями молекулярных масс, и аналогичным распределением зарядов в молекуле, что подтверждает и их конформационное сходство.

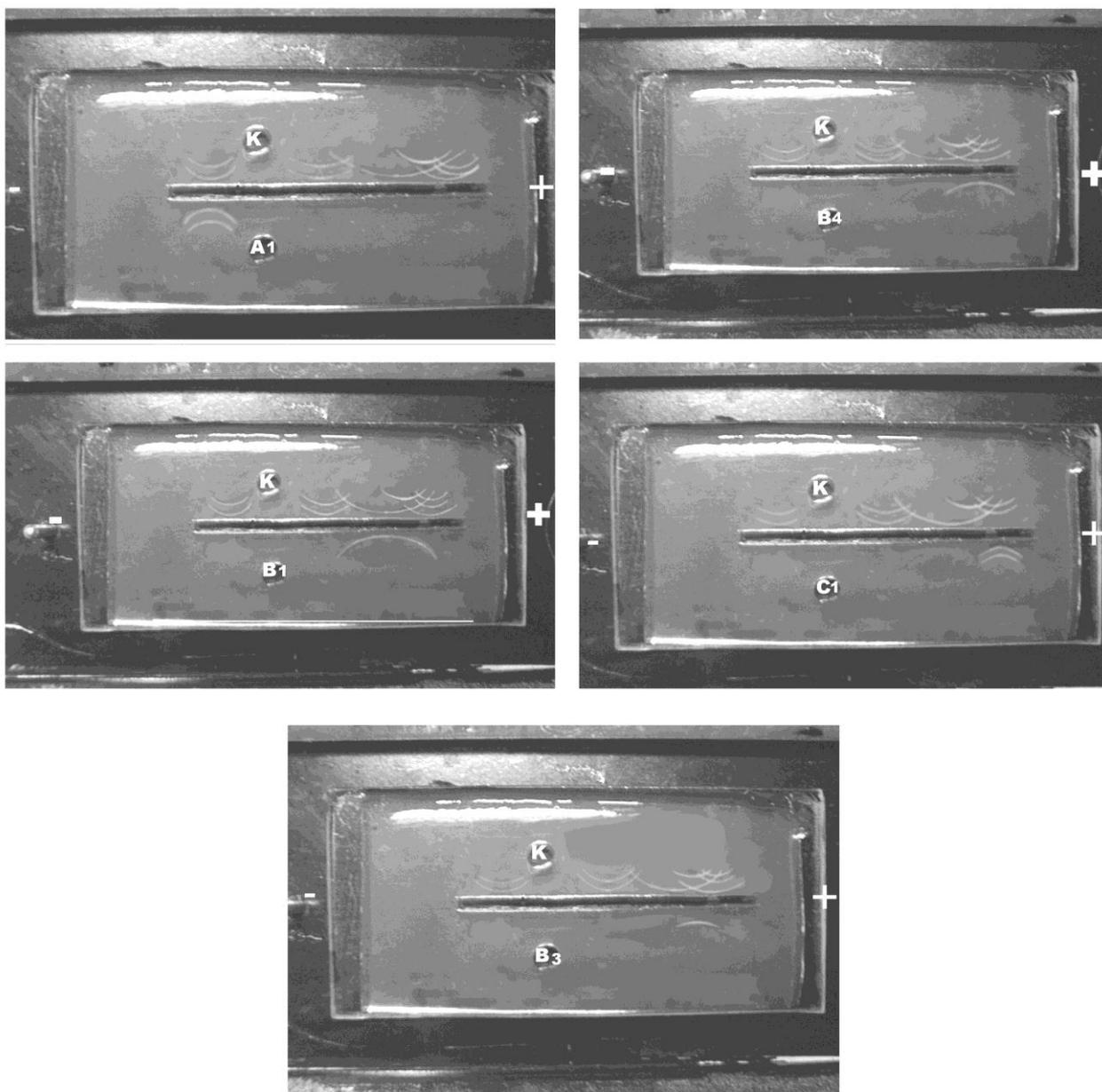


Рис. 3.13. Результаты разделения цельного экстракта *M. kansasii* и его хроматографических фракций, активных в антигенном отношении методом иммуноэлектрофореза: К – цельный экстракт поверхностных компонентов *M. kansasii*; А₁ – хроматографическая фракция А₁; В₁ – хроматографическая фракция В₁; В₃ – хроматографическая фракция В₃; В₄ – хроматографическая фракция В₄; С₁ – хроматографическая фракция С₁; в траншеях – антисыворотка к *M. kansasii*.

Это подтверждается также тем, что эти компоненты и на иммуноэлектрофореграмме имели одинаковую подвижность.

Тем не менее, полосы, отвечающие этим компонентам, все же достаточно четко отграничены друг от друга, что может быть обусловлено либо несколько различающейся скоростью диффузии этих компонентов и отвечающих им антител, либо, кроме того, иммунологическими различиями компонентов. Более детально исследовать это явление нам представлялось целесообразным лишь после выяснения вопроса о возможности получения видоспецифических компонентов из фракции А₁.

Фракция В₁, как видно из рис. 3.13, не подверглась разделению методом иммуноэлектрофореза. Это, в совокупности с данными электрофореза в ПААГ, дает основание предполагать, что фракция В₁ действительно однокомпонентна.

Фракция В₃, по данным электрофореза в ПААГ, содержала 2 компонента с различными, хотя и близкими, значениями молекулярных масс. В результате разделения ее методом иммуноэлектрофореза обнаружилось, что она содержит лишь один антигенный компонент. Так же эта фракция вела себя и в РПГ. На основании этих данных можно предположить, что либо оба компонента этой фракции обладают одинаковыми антигенными свойствами, несмотря на несколько различную молекулярную массу, либо их разделение в ходе электрофореза в ПААГ было обусловлено артефактом. В том или другом

случае было бы правильным проверить возможность выделения из этой фракции видоспецифических компонентов.

Фракция В₄ по результатам всех примененных нами методов фракционирования оказалась монокомпонентной.

Фракция С₁ в процессе иммуноэлектрофореза, также, как и в ходе электрофореза в ПААГ разделилась на два компонента. При этом в результате проведения РПГ с участием этой фракции было установлено, что она дает с антисывороткой *M. kansasii* только одну преципитационную линию. Одновременно было установлено, что по отношению к фракции В₄ фракция С₁ дает реакцию “частичной идентичности”. По нашему мнению, такое явление может объясняться тем, что один из компонентов фракции С₁ является родственным антигенному компоненту фракции В₄, в то время как второй, возможно, несет лишь некоторые общие с фракцией В₄ детерминанты.

Таким образом, было произведено сравнительное исследование хроматографических фракций экстракта *M. kansasii* и цельного экстракта. При этом была получена более полная, чем в результате РПГ, картина распределения иммунологически активных компонентов во фракциях и было выяснено, в какой мере компоненты каждой фракции отражают антигенные свойства экстракта в целом.

Далее было необходимо изучить взаимодействие компонентов фракций экстракта *M. kansasii* с сыворотками против других видов микобактерий. Для исследования использовали сыворотки *M. kansasii*, *M. bovis*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*, *M. phlei*. На рисунке 3.14 представлены результаты этого эксперимента. Как можно видеть, из рис.3.14, цельный экстракт *M. kansasii*, разделенный методом электрофореза в агарозе, вступает в реакцию с антисыворотками всех исследованных видов микобактерий. Однако при этом наблюдаются различия в характере распределения линий в зависимости от проявляющей антисыворотки. Было показано, что линии, получаемые в ходе иммуноэлектрофореза цельного экстракта могли быть

соотнесены с линиями, получаемыми в результате иммуноэлектрофореза хроматографических фракций. Поэтому была возможность, разделяя цельный экстракт *M. kansasii* исследовать его реакции как с гомологичной, так и с гетерологичными сыворотками и сопоставить полученные результаты с составом хроматографических фракций.

Из рис. 3.14 видно, что все антисыворотки выявляли в экстракте общий антигенный компонент, который, по нашему мнению, может являться общеродовым. В то же время присутствовали два компонента, выявляемые сывороткой против *M. kansasii*, но не выявляемые сыворотками против других видов микобактерий, что видно из схемы к рисунку 3.14. Схема получена нами путем наложения иммуноэлектрофореграмм, изображенных на рис. 3.14.

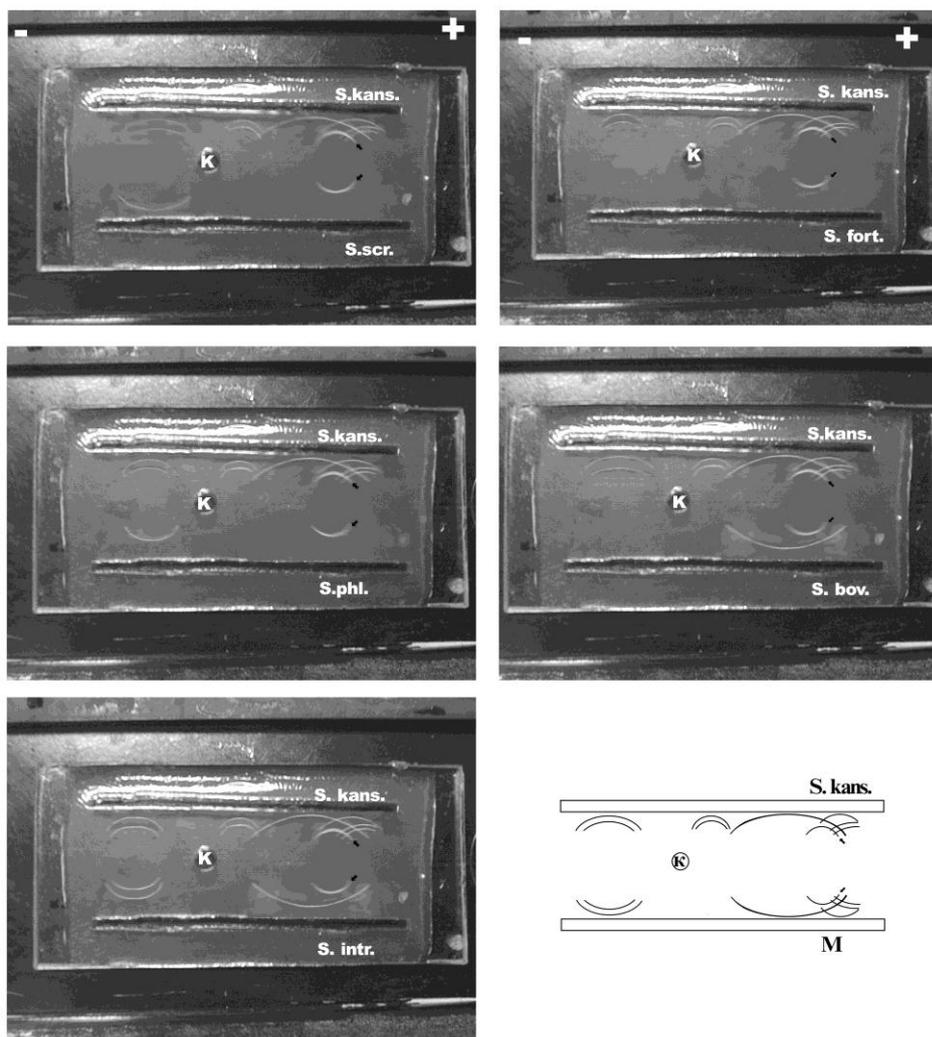


Рис. 3.14. Результаты иммуноэлектрофореза экстракта *M. kansasii* с участием антисывороток против различных видов микобактерий: К – экстракт *M. kansasii*; S_{kans} – антисыворотка к *M. kansasii*; S_{fort} – *M. fortuitum* S_{intr} – *M. intracellulare*; S_{phl} – *M. phlei* S_{bov} – *M. bovis*; S_{scr} – *M. scrofulaceum*; М – предполагаемая смесь антисывороток к *M. fortuitum*, *M. intracellulare*, *M. phlei*, *M. bovis*, *M. scrofulaceum*. Стрелками указаны линии, соответствовавшие антигену, который присутствовал во всех исследованных экстрактах.

Единственный компонент, выявляемый антисывороткой к *M. fortuitum* относится он к фракции V_3 и выявляется и антисыворотками к другим видам микобактерий. Антисыворотка *M. intracellulare* выявляет, кроме него, еще три антигенных компонента, два из которых относятся к фракции A_1 , а третий – к фракции V_1 . Антисыворотка *M. phlei* выявляет, кроме общего, еще один антигенный компонент, который, по-видимому, также относится к фракции A_1 . В реакции с антисывороткой *M. bovis* выявляются антигены, относящиеся к фракциям V_1 и V_3 . Антисыворотка же *M. scrofulaceum* реагирует с антигенами, находящимися во фракциях A_1 и V_3 .

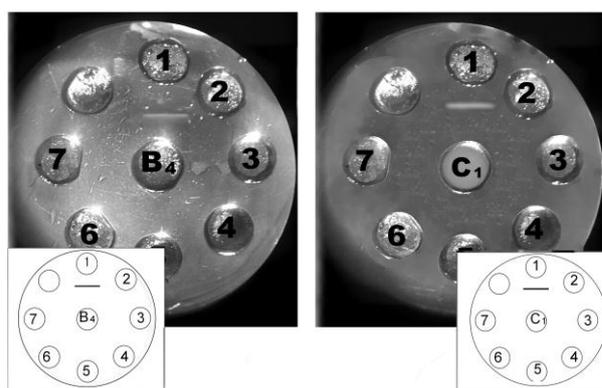
Таким образом, в результате проведенных экспериментов можно сделать вывод о том, что компоненты, содержащиеся в хроматографических фракциях A_1 , V_1 и V_3 экстракта *M. kansasii*, содержатся также в экстрактах других видов микобактерий. Поэтому было целесообразно исследовать наличие видоспецифических компонентов во фракциях V_4 и C_1 .

3.4.3. И н д и к а ц и я в и д о с п е ц и ф и ч е с к и х к о м п о н е н т о в в х р о м а т о г р а ф и ч е с к и х ф р а к ц и я х э к с т р а к т а *M. k a n s a s i i*. Для обнаружения видоспецифических компонентов во фракциях V_4 и C_1 провели РПГ в такой аранжировке, чтобы каждая из фракций могла реагировать с антисыворотками микобактерий разных видов. Результаты этого эксперимента иллюстрирует рисунок 3.15.

Как видно из рис. 3.15, как фракция V_4 , так и C_1 не дают образования видимого преципитата ни с одной из взятых в опыт гетерологичных антисы-

вороток. Одноименные же сыворотки в реакцию вступают. Такая картина может означать наличие в этих фракциях видоспецифических антигенных компонентов, однако для более достоверного их выявления было необходимо применить моноспецифические антисыворотки.

Наибольший интерес представляло выявление с помощью моноспецифических антисывороток антигенов *M. kansasii* в смеси экстрактов различ-



ных видов. Прежде всего, было необходимо получить сами моноспецифические антисыворотки.

Рис. 3.15. Реакционная способность фракций B_4 и C_1 по отношению к сывороткам против разных видов микобактерий: B_4 – хроматографическая фракция B_4 экстракта *M. kansasii*; C_1 – хроматографическая фракция C_1 экстракта *M. kansasii*; 1 – антисыворотка к *M. kansasii*; 2 – антисыворотка к *M. intracellulare*; 3 – антисыворотка к *M. bovis*; 4 – антисыворотка к *M. fortuitum*; 5 – антисыворотка к *M. phlei*; 6 – антисыворотка к *M. scrofulaceum*; 7 – нормальная кроличья сыворотка.

Их получали путем истощения исходной антисыворотки к *M. kansasii* экстрактами микобактерий следующих видов: *M. bovis*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*, *M. phlei*. Затем сыворотку дополнительно истощали всеми активными в антигенном отношении фракциями экстракта *M. kansasii*, кроме B_4 и, таким образом, оставляли в ней антитела только к этой

фракции. Аналогично получали и моноспецифическую сыворотку к фракции C_1 .

Далее проверяли активность антисывороток к фракциям B_4 и C_1 по сравнению с цельной антисывороткой “*M. kansasii*”. В качестве антигенов использовали: смесь экстрактов *M. bovis*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*, *M. phlei* вместе с экстрактом *M. kansasii*; смесь этих же экстрактов, но без экстракта *M. kansasii*; смесь этих же экстрактов с добавлением соответственно фракций B_4 и C_1 . Результаты этого эксперимента приведены на рисунке 3.16.

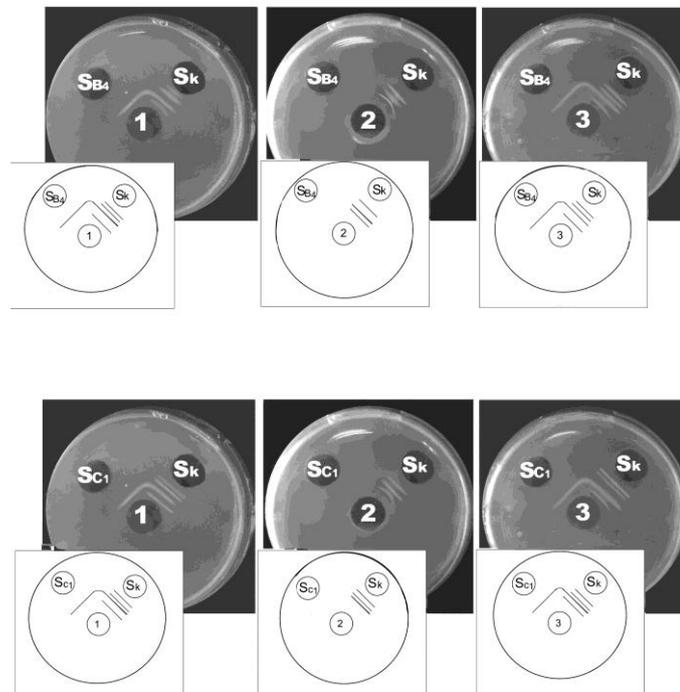


Рис. 3.16. Выявление антигенов *M. kansasii* в смеси экстрактов с помощью моноспецифических сывороток, полученных методом истощения: SB_4 – моноспецифическая сыворотка против фракции B_4 ; SC_1 – моноспецифическая сыворотка против фракции C_1 ; SK – антисыворотка к *M. kansasii*; 1 – смесь экстрактов *M. bovis*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*, *M. phlei*, *M. kansasii*; 2 – смесь экстрактов *M. bovis*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*, *M. phlei*; 3 – смесь экстрактов *M. bovis*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*, *M. phlei*, фракция B_4 экстракта *M. kansasii*; 4 – смесь

экстрактов *M. bovis*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*, *M. phlei*, фракция C_1 экстракта *M. kansasii*.

Как видно из рисунка 3.16, моноспецифические антисыворотки “ B_4 и C_1 ” оказались активными в РПГ. Кроме того, в случае отсутствия в смеси антигенов цельного экстракта *M. kansasii* моноспецифические сыворотки переставали давать видимый преципитат, в то время как полиспецифическая антисыворотка вступала в реакцию. При этом, однако, количество преципитационных линий было на одну меньше. Уточнить природу этой линии позволяли эксперименты, где к смеси экстрактов микобактерий добавляли фракции, соответственно B_4 и C_1 . При этом в обоих случаях оказалось, что появляется четвертая преципитационная линия в реакции с полиспецифической антисывороткой *M. kansasii* и линия – в реакции с одноименной моноспецифической сывороткой. При этом эти линии образовывали картину “полной идентичности”. Следовательно, моноспецифические антисыворотки “ B_4 и C_1 ”, в отличие от других сывороток, оказались в состоянии выявить соответствующие им компоненты экстракта *M. kansasii* среди экстрактов других видов микобактерий.

3.4.4 Сравнительное изучение антигенной структуры фракций, которые могут содержать видоспецифические компоненты. Ранее нами было показано, что фракции B_4 и C_1 при их сравнительном анализе показывают реакцию “частичной идентичности”. В то же время они не реагируют с сыворотками других исследованных видов микобактерий. При этом фракция C_1 , по данным иммуноэлектрофореза и электрофореза в ПААГ, двухкомпонентна. Было бы полезно изучить, насколько сходны компоненты, содержащиеся в этих двух фракциях. Для этого мы провели РПГ в аранжировке, позволяющей обеим фракциям взаимодействовать с антителами, содержащимися в мноспецифических антисыворотках “ B_4 и C_1 ”, что изображено на рисунке 3.17.

Полученные данные, как видно из рисунка 3.17, подтверждают частичную идентичность фракций.

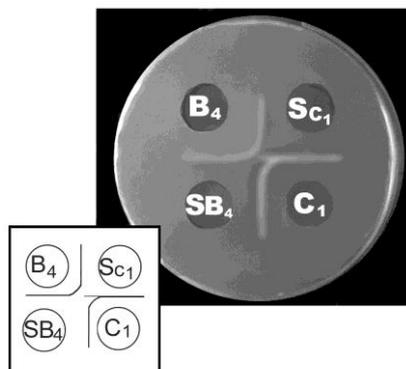


Рис. 3.17. Сравнение антигенных свойств фракций B_4 и C_1 в РПГ: SB_4 – моноспецифическая сыворотка против фракции B_4 ; SC_1 – моноспецифическая сыворотка против фракции C_1 ; B_4 – фракция B_4 экстракта *M. kansasii*; C_1 – фракция C_1 экстракта *M. kansasii*.

В самом деле, моноспецифические антисыворотки “ B_4 и C_1 ” реагируют с одноименными фракциями, формируя линию преципитата. В то же время, фракция B_4 реагирует с моноспецифической антисывороткой “ C_1 ”, а фракция C_1 реагирует, соответственно, с антисывороткой “ B_4 ”. При этом формируется плавное слияние преципитационных линий, что свидетельствует в пользу антигенного сродства компонентов, содержащихся во фракциях. В то же время антисыворотка “ C_1 ” образует с одноименной фракцией “шпору”, что говорит о реакции “частичной идентичности”. Такая картина, в целом, может быть объяснена тем, что фракция C_1 содержит два антигенных компонента, один из которых идентичен антигену фракции B_4 , а второй – содержит только часть идентичных ему антигенных детерминант. Эти фракции элюируются при ионообменной хроматографии непосредственно друг за другом и молекулярные массы их компонентов лежат в достаточно узком диапазоне. Все это говорит в пользу схожести их строения. В то же время во фракции B_4

выявляются вещества липопротеидной природы, тогда как во фракции C_1 – углеводной природы, что может указывать и на различия в структуре антигенных компонентов. Тем не менее, иммунологические свойства этих компонентов, как уже говорилось, могут быть сходны, если предположить, что идентичные антигенные детерминанты могут быть связаны с различными построением молекулами. Более детальный анализ взаимодействия между антигенами фракции C_1 был бы возможен в случае их препаративного разделения. В нашем же случае, по-видимому, было достаточно установить идентичность компонентов фракций “ B_4 и C_1 ” и применять в диагностических целях их смесь.

Принимая во внимание связанные с микобактериозами диагностические проблемы, было целесообразным изучить возможности выявления антител к *M. kansasii* в сыворотках. Для этого мы вновь провели РПГ, причем в качестве антигенного материала использовали, с одной стороны, смесь фракций B_4 и C_1 , с другой – цельный экстракт *M. kansasii*. В качестве антител использовали: смесь антисывороток “*M. bovis*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*, *M. phlei*” вместе с антисывороткой “*M. kansasii*”; смесь этих же сывороток, но без антисыворотки “*M. kansasii*”; смесь этих же сывороток с добавлением соответственно моноспецифических антисывороток “ B_4 и C_1 ”. Тем самым решался вопрос, способны ли компоненты экстракта *M. kansasii* B_4 и C_1 выявить специфические антитела в сыворотках лабораторных животных. Результаты этого эксперимента демонстрирует рисунок 3.18.

Из рис.3.18 видно, что в случае присутствия в смеси как полиспецифической антисыворотки “*M. kansasii*”, так и моноспецифических антисывороток “ B_4 ” и “ C_1 ” наблюдается образование четырех преципитационных линий в реакции с цельным экстрактом *M. kansasii* и одной – в реакции со смесью фракций B_4 и C_1 .

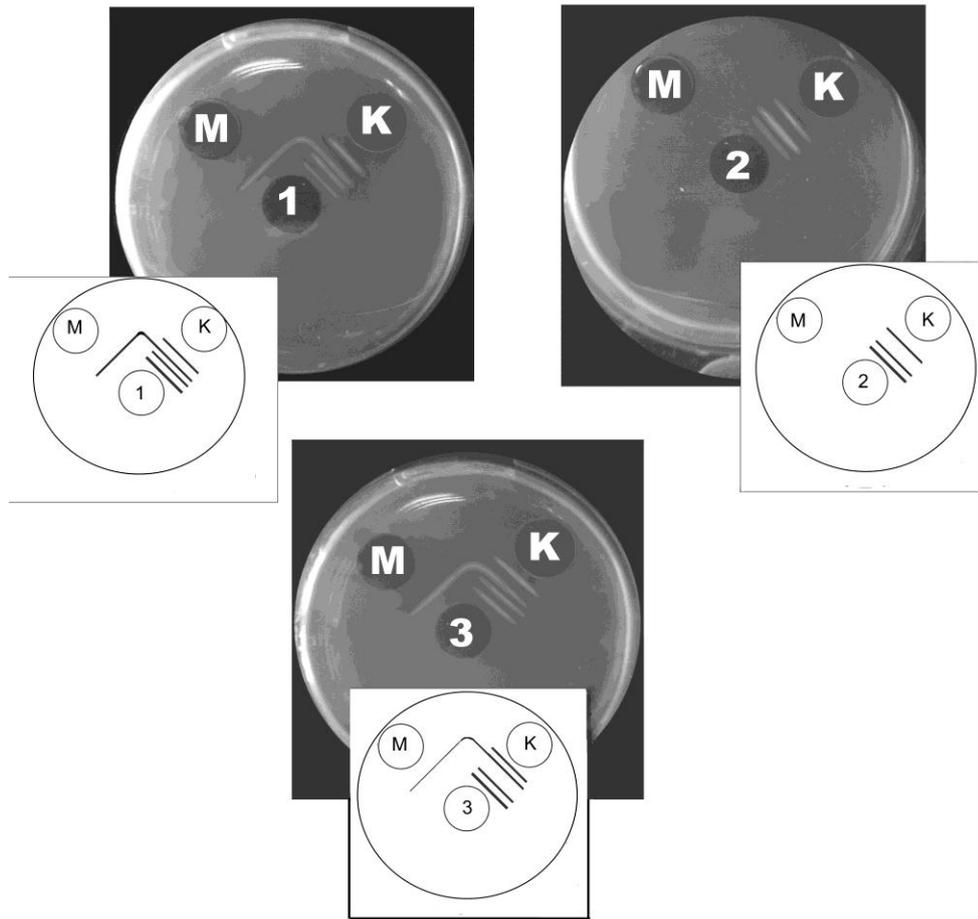


Рис. 3.18. Определение возможности выявления специфических антител в антисыворотке к *M. kansasii* с помощью компонентов фракций B_4 и C_1 : 1 – смесь антисывороток к *M. bovis*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*, *M. phlei*, *M. kansasii*; 2 – смесь антисывороток к *M. bovis*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*, *M. phlei*; 3 – смесь антисывороток к *M. bovis*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*, *M. phlei*, к фракции B_4 экстракта *M. kansasii*, к фракции C_1 экстракта *M. kansasii*; М – смесь фракций B_4 и C_1 ; К – цельный экстракт *M. kansasii*.

В то же время смесь сывороток, не содержащая ни антисыворотки “*M. kansasii*”, ни моноспецифических антисывороток, давала в реакции с цельным экстрактом *M. kansasii* только линии преципитации, а со смесью фракций не реагировала вовсе.

Таким образом, можно считать, что хроматографические фракции В₄ и С₁ экстракта *M. kansasii* содержали как минимум, один антигенный компонент, который по результатам проведенных исследований, мог считаться видоспецифическим. Молекулярная масса этого компонента лежала в пределах 72 – 86 кДа. Это вещество белковой природы, возможно, содержащее в качестве простетической группы углеводный или липидный компонент. По-видимому, на основе хроматографических фракций В₄ и С₁ экстракта *M. kansasii* в дальнейшем возможно создание препарата для диагностики микобактериозов, вызванных этим микроорганизмом.

АНАЛИЗ И ОБОБЩЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Резкое увеличение заболеваемости микобактериозами практически По всему миру является следствием неадекватности программ по контролю за заболеваемостью, возрастания частоты поражения больных штаммами микобактерий с множественной, в том числе и первичной, лекарственной устойчивостью. Помимо этого, увеличилось число случаев сочетания микобактериозов с ВИЧ–инфекцией [8, 47, 79, 96, 112, 126, 153, 182]. Эпидемиологическая значимость микобактериозов подтверждается данными многих исследований, проведенных как в странах бывшего СССР, так и за рубежом [59, 75, 99, 135, 141, 142, 172, 177, 178, 193, 194, 201]. Значительные трудности в выявлении микобактерий связаны с такими их биологическими особенностями, как разнообразие условно–патогенных видов, медленная скорость их роста, избирательные питательные потребности, изменчивость. Наиболее сложными оказываются индикация и идентификация атипичных микобактерий, которые в настоящее время все чаще становятся этиологическим фактором заболеваний человека [33].

Значительную роль в заболеваемости человека и животных играют в настоящее время фотохромогенные микобактерии и основной их представитель – *M. kansasii*. Заболевания, вызываемые этим микроорганизмом, характеризуются многообразием, тяжестью течения и сложностью лечения, нередко генерализацией процесса и тяжелыми исходами, что часто обусловлено их манифестацией при иммунодефицитных состояниях, а также первичной антибиотикорезистентностью возбудителя [125]. Существенное значение имеет также то, что микробиологическая диагностика микобактериозов часто оказывается запоздалой.

До настоящего времени основными в идентификации микобактерий остаются культуральный и биохимический методы, несмотря на их дорого-

визну, длительность и малую доступность некоторых реагентов. Аллергический метод, широко используемый для диагностики туберкулеза у человека и животных, оказался малоприменимым для выявления и дифференциации микобактериозов вследствие значительной выраженности перекрестных реакций. Поэтому не вызывает сомнения целесообразность усовершенствования известных и поиски новых методов выявления микобактерий, определения их биологических свойств и ускоренной оценки чувствительности к противотуберкулезным препаратам. В последние годы для диагностики микобактериозов начали успешно использовать новые подходы. Одним из методов, считающимся достаточно перспективным, является ПЦР. Это связано с высокой чувствительностью и избирательностью метода. Однако ПЦР не лишена и недостатков. Одним из препятствий, затрудняющих широкое внедрение метода является малая доступность и дороговизна аппаратуры. Кроме того, изменения ДНК возбудителя, связанные с хранением и консервированием исследуемого материала могут привести к диагностическим ошибкам [210].

Внимание многих исследователей привлекают иммунологические методы диагностики заболеваний, вызванных микобактериями. Это связано с простотой выполнения, высокой специфичностью и экономическими преимуществами таких методов. Разработка диагностических приемов, базирующихся на такой основе, требует всестороннего изучения как антигенной структуры микроорганизма, так и особенностей иммунного ответа макроорганизма в связи с внедрением возбудителя. Все это, в свою очередь, определяет пути создания вакцины на основе микобактериальных антигенов и, таким образом, к решению проблемы контроля над микобактериозами.

Исследования в таком направлении ведутся в течение продолжительного времени, однако до настоящего времени не создано достаточно эффективных препаратов для иммунологической диагностики туберкулеза и микобактериозов. Одной из главных причин этого является значительное антигенное сходство микобактерий разных видов. Ситуация усугубляется тем, что многие

микобактериальные субстанции обладают слабыми антигенными и иммуногенными свойствами. Все это делает целесообразным дальнейшее углубленное исследование антигенной структуры микобактерий.

Как в отечественной, так и в зарубежной литературе уделяется большое внимание исследованию антигенной структуры микобактерий. Однако изучаются, в основном, вещества, выделяющиеся при разрушении микобактерий с использованием различных способов [2, 39, 57]. Исследование преимущественно клеточных дезинтегратов обусловлено наличием в них значительного количества антигенных компонентов, что повышает вероятность нахождения среди них и видоспецифических. Изучению же поверхностных антигенных компонентов уделяется значительно меньшее внимание. По-видимому, это можно объяснить тем, что достаточно сложно получить поверхностные антигенные компоненты достаточных для анализа количествах, в неденатурирующих условиях и без разрушения бактериальных клеток, приводящего к выделению внутриклеточных компонентов. Однако исследование именно поверхностных антигенов представляет большой интерес, поскольку иммунная система макроорганизма, в первую очередь, контактирует с ними, и иммунный ответ развивается в первую очередь на них [80, 129, 134, 141, 200]. Кроме того, именно поверхностные антигены доступны для выявления при серологической идентификации выделенных культур и индикации бактерий в исследуемом материале.

Таким образом, было необходимо разработать методы выделения именно поверхностных компонентов микобактерий. Для этого мы изучили условия получения поверхностных компонентов микобактерий различных видов в мягких условиях. Было показано, что применение в качестве детергента додецилсульфата натрия (ДСН) в концентрации 0,5 % при температуре 37 °С приводит к экстрагированию заметных количеств клеточных компонентов при незначительном разрушении клеток микобактерий. Данные литературы свидетельствуют, о том, что ДСН успешно применялся в значительно более

высокой концентрации –порядка 4 %. Нам же удалось установить, что существенное снижение концентрации этого экстрагента не приводит к уменьшению выхода белка. Более того, содержание белка в экстракте *M. kansasii* с понижением концентрации ДСН от 4 % до 0,5 % даже возрастает. Это явление благоприятствует выделению поверхностных компонентов микобактерий в относительно мягких, неденатурирующих условиях.

В то же время, на примере *M. kansasii* было установлено, что применение только ДСН не приводит к исчерпывающему экстрагированию. Применение тритона X–100 позволяло экстрагировать дополнительные компоненты. Принимая во внимание сложности разделения смеси, содержащей такие различные детергенты, как ДСН и тритон X–100, а также повышенный риск разрушения клеток при их одновременном действии, мы применяли последовательную обработку бактериальной массы каждым из этих детергентов. При этом было установлено, что экстрагируемые компоненты активны в антигенном отношении, причем после обработки ДСН, тритон X–100 дополнительно экстрагирует, как минимум, один антигенный компонент. Применение же таких детергентов, как твин–80 и холат натрия не привело к сколько–нибудь заметному экстрагированию клеточных компонентов.

Для доказательства того, что микобактерии в процессе экстрагирования не разрушаются мы проверяли их тинкториальные свойства до и после обработки детергентами. С этой целью применяли окрашивание по Цилю – Нильсену. При этом было показано, что и после экстрагирования клетки сохраняют кислотоустойчивость. Это, по нашему мнению, являлось достоверным доказательством отсутствия существенных повреждений клеточных стенок микобактерий. Кроме того, исследование полученных препаратов с применением колориметрических методов и спектрофотометрии в ультрафиолетовой области спектра показало, что основным компонентом экстрактов является белок. Содержание же нуклеиновых кислот, в частности РНК, было невысо-

ким. Это лишний раз могло свидетельствовать в пользу сохранности клеток после экстрагирования.

Поскольку детергенты не обладают узкой направленностью действия в процессе экстрагирования, можно было предполагать, что получаемые экстракты представляют собой сложную смесь веществ различной химической природы, с различными значениями молекулярных масс. Данные литературы свидетельствуют о том, что экстракты микобактерий, получаемые различными способами, всегда представляют собой многокомпонентные системы [63, 65, 66]. При этом нередко в таких сложных смесях удавалось обнаружить и специфические по определенным параметрам компоненты [65, 66]. Однако по целому ряду причин такие компоненты до настоящего времени не удавалось использовать для практической идентификации и индикации микобактерий [19]. Одной из основных причин следует считать значительные сложности выявления и выделения отдельных веществ из получаемых сложных препаратов. Кроме того, это связано с невысокой специфичностью таких компонентов и наличием большого числа перекрестнореагирующих. Использование же ДНК-зондов, химических и изотопных методов выявления видоспецифических компонентов наталкивается на значительные сложности в исполнении и высокую стоимость [12, 15, 19, 30, 33, 106]. Ограничение круга исследований только поверхностными компонентами позволяло с большей точностью ориентироваться в составе получаемых экстрактов, что повышало вероятность обнаружения видоспецифических компонентов.

Однако получение поверхностных компонентов бактериальных клеток в более или менее очищенном виде является непростой задачей. Приводимые в литературе способы обработки микобактерий для получения клеточных компонентов, являются, в большинстве, весьма жесткими. Так, экстрагирование клеточных компонентов проводили с применением повышенных температур, кислот, мочевины, концентрированных растворов ДСН – до 4% и т.п. [35, 37]. Такая обработка неизбежно приводила к дезинтеграции клеток, а, возможно,

и к изменению физико–химических и антигенных свойств экстрагированных веществ. Однако, поскольку в этих случаях преследовалась цель получить клеточные дезинтеграты, такие обстоятельства лишь способствовали решению этой задачи. Получение же поверхностных компонентов микобактерий требовало применения значительно более мягких условий, что могло привести к экстрагированию не всех поверхностных компонентов клеток. Кроме того, отсутствие разрушения клеток могло значительно уменьшить количество антигенных компонентов в составе экстракта. Тем самым можно было ожидать получения экстрактов с невысокой концентрацией белка и небольшим содержанием антигенных компонентов. Поэтому особую важность приобретал подбор условий экстрагирования, который позволил бы выделить максимальное количество клеточных компонентов без разрушения микобактерий.

Необходимо отметить, что полученные нами экстракты поверхностных компонентов микобактерий также представляли собой сложные многокомпонентные системы. Однако можно было предполагать, что присутствующих в них компонентов значительно меньше, чем в клеточных дезинтегратах. Действительно, проведение электрофореза в ПААГ по системе Laemmli позволило установить наличие в полученных экстрактах *M. kansasii* не менее 17 компонентов, имеющих белковую природу, были также определены их молекулярные массы.

В литературе нам не удалось встретить упоминания об электрофоретическом разделении экстрактов поверхностных компонентов микобактерий. Однако сопоставление электрофоретических картин, полученных нами с данными других исследователей, показало, что количество полученных нами поверхностных компонентов в составе цельного экстракта лишь незначительно уступало клеточным дезинтегратам. Так, приводятся данные о наличии порядка 17 – 24 фракций в составе клеточных дезинтегратов микобактерий [35, 65].

Определение молекулярных масс полученных электрофоретических фракций экстрактов *M. kansasii* показало, что 6 из них являются характерными по их молекулярным массам. Это были фракции с молекулярными массами 169,8; 128,8; 118,9; 46,8; 38 и 32,4 кДа. Остальные же компоненты имели аналоги и в электрофоретических спектрах других исследованных видов микобактерий.

Сама по себе молекулярная масса конкретного компонента экстракта и его расположение на электрофореграмме, конечно, не могла свидетельствовать о его биологической специфичности. Однако в совокупности, наличие таких компонентов формировало характерный спектр экстракта исследуемого микроорганизма, что, в принципе, могло служить и целям его идентификации при клинических исследованиях. Подобные же соображения высказаны и в работах других исследователей, однако, только по отношению к экстрактам, полученным с разрушением клеток микобактерий [66].

Учитывая многокомпонентность экстрактов, наличие большого количества сходных по многим параметрам компонентов весьма затрудняло анализ такой сложной смеси. Для более детального исследования полученных экстрактов поверхностных компонентов *M. kansasii* было необходимо разделить его на отдельные фракции. С этой целью мы использовали метод ионообменной хроматографии. При этом было установлено, что разделение полученных нами экстрактов на катионообменниках не удастся вследствие неустойчивости экстрактов в подкисленных средах. Разделение же на ДЭАЭ–целлюлозе позволило получить десять хроматографических фракций. Сопоставление количества полученных ранее электрофоретических фракций (17) с количеством хроматографических (10) позволило нам предположить неоднородность последних. Это предположение было подтверждено спектрофотометрическим и химическим исследованиями состава фракций. Обнаружилось, что основу всех хроматографических фракций составляют протеины, однако их количество значительно варьирует в каждой фракции. В то же время, при-

существовавшее в исходном экстракте небольшое количество РНК сосредотачивается во фракциях, элюировавшихся с колонки лишь под действием щелочи. Такое явление, с одной стороны, хорошо согласуется со свойством РНК как кислоты довольно прочно сорбироваться на анионообменнике, каким является

ДЭАЭ–целлюлоза. С другой стороны, отмечалось наличие значительных количеств белка в этих фракциях. Невозможность его элюции отдельно от нуклеиновой кислоты даже в условиях, когда активные группировки ионообменника блокированы ее анионами, заставляет предположить наличие достаточно прочной связи нуклеиновая кислота–белок. Иными словами, содержащиеся в последних хроматографических фракциях компоненты могли представлять собой рибонуклеопротеиды.

Одновременно все остальные хроматографические фракции, по данным проведенных исследований, оказались свободными от определяемых количеств нуклеиновых кислот. Тем самым, ионообменная хроматография привела к отделению рибонуклеопротеидов от других компонентов экстракта *M. kansasii*.

Данные литературы свидетельствуют о том, что среди поверхностных компонентов микобактерий, в том числе, *M. kansasii* встречаются вещества различной химической природы. В частности, на поверхности клеток *M. kansasii* встречаются представители фенольных гликолипидов, ацилтрегалозусодержащих липоолигосахаридов и полярных гликопептидолипидов. Все эти соединения обладают антигенной активностью [38, 107, 109, 110, 130]. При этом можно констатировать, что, несмотря на различия в химической структуре, во всех этих группах веществ присутствует углеводный компонент. Однако отмечают, что именно протеиновым компонентам, в большей степени свойственна видовая специфичность, тогда как полисахариды зачастую обуславливают появление перекрестных взаимодействий в серологических реакциях [93, 200]. Поэтому было бы неправильным ограничивать круг исследо-

ваний компонентами только одной химической группы, хотя протеины, очевидно, являются наиболее перспективными с точки зрения обнаружения у них видовой специфичности. В связи с этим необходимо было определить химическую природу веществ, составлявших каждую хроматографическую фракцию. Такое определение проводили, пользуясь методом тонкослойной хроматографии. При этом обнаружено, что хроматографические фракции действительно содержали компоненты различной химической природы. Показано, в частности, что углеводы содержались во фракциях группы А, т.е. элюировавшихся при минимальном значении ионной силы раствора, и во фракциях группы С, элюировавшихся, напротив, лишь с применением щелочи. Если во фракциях группы С углеводы могли явиться продуктами разрушения РНК, то во фракциях группы А они, по-видимому, присутствуют в качестве компонента исходного экстракта.

Компоненты липидной природы были сосредоточены во фракциях группы В, т.е. в тех, для последовательной элюции которых требовалось постепенное возрастание ионной силы раствора. При этом они были сосредоточены во фракциях В₂, В₄ и В₅, элюировавшихся при концентрациях хлорида натрия соответственно 0,41 М, 0,75 М и 0,81 М. Все эти фракции давали реакцию на липопроотеиды. Фракция же В₅, кроме того, давала реакцию на углеводы. Интерпретировать такое явление можно, исходя из предположения, что в этой фракции содержатся как липидные, так и углеводные компоненты. Однако необходимо принять во внимание и то, что инозитолсодержащие липоиды могут также вступать во взаимодействие с реагентом Шиффа, тем более, что по литературным данным, липоиды такого состава встречаются в клеточной стенке микобактерий [114].

В целях определения состава и молекулярной массы компонентов, входящих в хроматографические фракции, мы провели их электрофоретическое исследование в сравнении с цельным экстрактом *M. kansasii*. Это позволило установить, что лишь некоторые хроматографические фракции являются од-

нокомпонентными, другие же содержат 2 – 3 компонента. При этом оказалось, что в составе каждой хроматографической фракции содержатся, в основном, компоненты с близкими значениями молекулярных масс.

Однако исследования, базирующиеся только на применении химических методов анализа не позволили выявить видоспецифические компоненты экстракта *M. kansasii*. Поэтому мы обратились к иммунологическим методам их обнаружения. Применение реакции двойной радиальной иммунодиффузии в агаровом геле позволило установить, что лишь фракции A₁, B₁, B₃, B₄, C₁ оказались активными в антигенном отношении. Остальные фракции, несмотря на примененный широкий диапазон их концентраций и концентраций антисывороток оказались нереакционноспособными в РПГ. Получение таких результатов согласуется с данными литературы о том, что большинство антигенных компонентов довольно прочно связаны с бактериальными клетками и переходят в раствор лишь после распада микобактерий [38]. В связи с этим, поскольку экстрагирование мы проводили в относительно мягких условиях, с применением невысоких концентраций детергентов, трудно было ожидать значительного выхода антигенных компонентов.

Было обнаружено, что антигенные компоненты, содержащиеся в цельном экстракте отделились друг от друга в процессе ионообменной хроматографии. Это доказывает, что различия в конформации и распределении зарядов в молекулах различных антигенов достаточны для их разделения методом ионообменной хроматографии. В литературе нам не удалось встретить упоминания о разделении экстрактов поверхностных компонентов атипичных микобактерий этим методом. Однако имеется указание о позитивных результатах применения ионообменной хроматографии для разделения антигенов *M. tuberculosis*, хотя и отмечается необходимость комбинации этого метода с другими [38].

Было также показано, что антигенные компоненты, содержащиеся в различных фракциях, не являются идентичными. Только фракции B₄ и C₁

показывали “реакцию частичной идентичности”. Учитывая невысокую разрешающую способность метода РПГ, для подробного исследования антигенных свойств хроматографических фракций и цельного экстракта мы применили иммуноэлектрофорез в геле агарозы. При этом выяснилось, что в цельном экстракте поверхностных компонентов *M. kansasii* удается выявить 9 антигенных компонентов. Некоторые авторы упоминают об обнаружении в ультразвуковых дезинтегратах и культуральных фильтратах микобактерий до 11 антигенных компонентов, обнаруживаемых методами иммунодиффузии и иммуноэлектрофореза [133]. Таким образом, полученные нами экстракты поверхностных компонентов *M. kansasii* по числу антигенных компонентов ненамного уступали описанным этими авторами. Необходимо отметить, что применение такого высокоразрешающего метода, как двумерный электрофорез с последующим иммуноблоттингом увеличивает количество определяемых компонентов приблизительно до 100 [89]. Следует, однако подчеркнуть, что и в этом случае шла речь о клеточных дезинтегратах, тогда как мы исследовали лишь поверхностные компоненты микобактерий. Таким образом, полученные нами результаты подтверждают многокомпонентность исходного экстракта. Распределение же антигенных компонентов между хроматографическими фракциями позволило, в некоторых случаях, обнаружить их неоднородность там, где этого не удалось добиться другими методами.

Однако, само по себе, количество антигенных компонентов, не может служить целям микробиологической диагностики заболеваний, индикации и идентификации возбудителя. В связи с этим было целесообразно исследовать выявленные антигенные компоненты с точки зрения их видовой специфичности. В литературе выделяют ряд групп антигенов микобактерий, среди которых: антигены, общие для микобактерий и других микроорганизмов; антигены, присущие только медленно размножающимся микобактериям; антигены, присущие быстроразмножающимся микобактериям и видоспецифические антигены [183]. Из данных литературы известно, что поверхностные антиге-

ны микобактерий чаще всего принадлежат к трем основным классам веществ: фенольные гликолипиды, ацилтрегалозу–содержащие липоолигосахариды и полярные гликопептидолипиды [110]. Как уже упоминалось, наиболее перспективными с точки зрения видоспецифичности признаются антигены, содержащие белковые компоненты [95, 200].

Проведение иммуноэлектрофореза фракций экстракта *M. kansasii* с перекрестным использованием сывороток против микобактерий разных видов позволило установить, прежде всего, наличие общеродового антигена, выявленного во фракции В₃. По данным наших исследований, это протеин с молекулярной массой в пределах 43,7 – 46,8 кДа, элюирующийся с колонки при концентрации хлорида натрия 0,48 М, не содержащий ни углеводов, ни липидных компонентов. Кроме того, в составе фракций А₁ и В₁ обнаружен ряд перекрестнореагирующих с сыворотками разных видов микобактерий антигенов.

Антигенные компоненты фракции А₁ представляли собой, по–видимому, два гликопротеина с очень близкими адсорбционными свойствами и значениями молекулярных масс около 63,8 кДа. Они отличались друг от друга, возможно, лишь строением, специфичностью или количеством антигенных детерминант и концентрациями в составе фракции А₁.

Антигенный компонент фракции В₁ представлял собой протеин с молекулярной массой около 169,8 кДа, не содержащий ни углеводной, ни липидной части и элюировавшийся с ионообменной колонки при концентрации хлорида натрия 0,25 М.

По данным, полученным в ходе иммуноэлектрофореза в агарозе, только фракции В₄ и С₁ не содержали антигенов, выявляемых антисыворотками к другим видам микобактерий. Было необходимо выяснить, являются ли активные антигенные компоненты видоспецифичными для *M. kansasii* и родственными ли они друг другу. С помощью специфических антисывороток к В₄ и С₁, полученных путем истощения поливалентных сывороток различными фрак-

циями экстракта *M. kansasii*, было показано, что в смеси экстрактов микобактерий разных видов может быть выявлен как экстракт *M. kansasii*, так и компоненты фракций V_4 и C_1 . Дальнейшее исследование антигенных свойств этих двух фракций показало, что они являются родственными, но не идентичными в антигенном отношении. Показано, что фракция C_1 содержит, кроме идентичного, антигенный компонент, лишь частично идентичный антигену во фракции V_4 . Это неплохо согласуется с данными электрофореза в ПААГ о двухкомпонентности фракции C_1 , однако затруднительно делать выводы относительно антигенной специфичности каждого из компонентов без выделения каждого из них.

Тем не менее, антигенные компоненты фракций V_4 и C_1 , по-видимому, могут служить основой для изготовления антигенных диагностических препаратов.

Антигенный компонент фракции V_4 представляет собой протеин с молекулярной массой около 79,4 кДа, с невысоким содержанием липидного компонента, элюирующийся в буферном растворе с концентрацией NaCl 0,75 М.

Антигенные компоненты фракции C_1 , возможно, представляют собой рибонуклеопротеиды с молекулярной массой от 72,4 до 86,1 кДа, элюирующиеся при рН элюирующего буферного раствора 8,9. Сделать вывод о наличии углеводной простетической группы затруднительно ввиду присутствия в препарате РНК.

Таким образом, полученные результаты показывают принципиальную возможность получения экстрактов поверхностных компонентов *M. kansasii* и некоторых других микобактерий без заметной примеси внутриклеточных компонентов. Относительно небольшое количество поверхностных компонентов, очевидно, не исчерпывает всего их многообразия. Однако расширение спектра таких компонентов может потребовать дополнительного изучения условий экстрагирования. Необходимо отметить, что получение описываемых в литературе диагностических препаратов, базирующихся на различиях

в антигенной структуре микобактерий, требует, как правило, дезинтеграции клеток [3, 34, 39, 59, 121]. Это, безусловно, повышает вероятность обнаружения видоспецифических компонентов [3]. Тем не менее, до настоящего времени не создано диагностикума, обладающего строгой специфичностью по отношению к отдельным видам атипичных микобактерий, в частности, *M. kansasii*. Более того, показано, что иммунная система макроорганизма реагирует, в первую очередь, на общеродовые антигены, что в лабораторных условиях способно маскировать проявления реакций с участием видоспецифических компонентов [3]. В связи с этим получение препаратов, в достаточной степени очищенных от общеродовых и других перекрестно реагирующих антигенов, несомненно, может иметь немалое практическое значение.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны метод и условия экстрагирования поверхностных компонентов *Mycobacterium kansasii* путем применения детергентов с различными механизмами солубилизирующего действия. Показано, что последовательное применение ДСН в концентрации 0,5 % и тритона X-100 в концентрации 0,4 % позволяет экстрагировать из инактивированных фенолом микобактерий большее количество антигенных компонентов, чем применение каждого из детергентов в отдельности. Полученные таким способом экстракты *M. kansasii* содержат преимущественно поверхностные компоненты бактериальных клеток, о чем свидетельствует сохранение микобактериями кислотоустойчивости и отсутствие в экстрактах примеси дезоксирибонуклеиновой кислоты.
2. Экстракты поверхностных компонентов *M. kansasii* представляют собой многокомпонентные системы, содержащие по данным тонкослойной хроматографии и электрофореза в полиакриламидном геле вещества белковой, липидной и полисахаридной природы.
3. Экстракт *M. kansasii* в результате электрофореза в полиакриламидном геле разделяется на 17 компонентов, различавшихся по электрофоретической подвижности. Сравнение электрофоретических картин разделения экстрактов *M. kansasii*, *M. bovis*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*, *M. phlei* показывает, что в электрофоретическом спектре *M. kansasii* можно выделить 6 компонентов, которые по своей молекулярной массе и электрофоретической подвижности характерны для этого микроорганизма и могут быть ис-

пользованы для идентификации электрофоретического спектра *M. kansasii*.

4. Экстракт *M. kansasii* методом колоночной ионообменной хроматографии на ДЭАЭ – целлюлозе и последующей рехроматографии был разделяется на 10 фракций, которые различаются прочностью связи с ионообменником и химическим составом. По данным электрофореза в полиакриламидном геле компоненты фракций различаются молекулярной массой, а в реакции преципитации в геле проявляют неодинаковые антигенные свойства. Среди антигенных компонентов есть как общие для ряда фракций, так и индивидуальные, присущие только одной фракции.
5. Среди выделенных фракций обнаружены антигены, которые могут быть признаны видоспецифическими для *M. kansasii*. Видоспецифичность этих компонентов установлена в реакции преципитации в геле и иммуноэлектрофорезе, в том числе и с использованием иммунных сывороток, истощенных экстрактами *M. bovis*, *M. fortuitum*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*, *M. phlei*. Подобные антигены не встречаются у ни у одного из представителей основных групп микобактерий. Эти компоненты находятся во фракциях В₄ (элюируется при концентрации хлорида натрия 0,75 М) и С₁ (элюируется при рН буферного раствора до 8,9) и представляют собой вещества белковой природы с молекулярной массой в пределах 72 – 86 кДа, включающие в себя углеводный и липидный компоненты. Оба антигена дают реакцию неполной антигенной идентичности в реакции преципитации в геле.
6. Выявленные видоспецифические компоненты *M. kansasii* могут служить основой для разработки диагностической тест-системы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Авдиенко В.Г., Крамник И.Б., Апт А.С., Литвинов В.И. Получение и испытание сингенных антиидиотипических антител против антимикобактериальных моноклональных антител // Пробл. туберкулеза. – 1993. - №1. – С. 47 - 50.
2. Авербах М.М., Литвинов В.И. Иммунобиологические основы противотуберкулезной вакцинации. – М.: Медицина, 1970. – 223 с.
3. Агеева Т.Н. Антитела, иммунные комплексы, антигены при туберкулезе крупного рогатого скота и инфицировании атипичными микобактериями: Дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03. – Минск, 1993. – 168 с.
4. Антитела. Методы: В 2 т. – Пер. с англ. - М.: Мир, 1991. – Т. 1. - 287 с.
5. Бадукшанова Н.М. Значение белковых фракций в таксономии и идентификации клинических штаммов микобактерий: Автореф. дис. ... канд. биол. наук: 03.00.07 / Москва., 1985. – 28 с.
6. Бадукшанова Н.М., Брусина Л.И., Шабанов М.А., Фадеева Н.И., Касирская Н.Г., Хамидулина Х.Х., Шитова Н.А. Сравнительное изучение замедленной гиперчувствительности, вызванной микобактериями и выделенными из них белковыми фракциями // Журн. микробиол. – 1987. - №7. - С. 84 – 87.
7. Бадукшанова Н.М., Воробьев А.А. Антигены микобактерий и их диагностическая ценность // Журн. микробиол. – 1991. - № 5 – С. 54 – 59.
8. Бибергаль Е. А. Типирование микобактерий методом специфических ингибиторов // Лаб. дело. - 1991. - №6. - С. 47 - 48.
9. Биологические мембраны. Методы /Под ред. Дж. Финдлея, У. Эванза: Пер. с англ. – М.: Мир, 1990. – 423 с.

10. Блохина И.Н., Леванова Г.Ф. Геносистематика бактерий. - М.: Наука, 1976. – 152 с.
11. Борщевский В.В., Калечиц О.М., Богомазова А.В. Эпидемиологическая ситуация по туберкулезу в Республике Беларусь // Пробл. туберкулеза. – 1999. - №6. – С. 4 – 6.
12. Буряк Е.И. Эффективность разных способов прижизненной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота // Ветеринария. – 1986. - № 6. – С. 23 – 26.
13. Вейсфейлер Ю.К. Биология и изменчивость микобактерий туберкулеза и атипичных микобактерий: Экспериментальные и теоретические исследования. – Будапешт: Издательство АН Венгрии, 1975. – 335 с.
14. Виноградова Р.П., Цудзевич Б.А., Храпунов С.Н. Физико - химические методы в биохимии. – Киев: Вища школа, 1983. - 287 с..
15. Воробьев А.А., Бадукшанова Н.М., Дорожкова И.Р., Сухова Т.Т., Ходоровская В.А. Кассирская Н.Г., Рыбакова А.М. Идентификация микобактерий методом ГЖХ // Пробл. туберкулеза. – 1990. - №7. – С. 46 – 49.
16. Воробьев А.А., Бадукшанова Н.М., Фадеева Н.И. Антигенные и иммуногенные субстанции микобактерий и проблема создания молекулярной вакцины // Журн. микробиол. – 1989. - № 12. – С. 87 – 93.
17. Вязов О.Е., Ходжаев Ш.Х. Руководство по иммунологии. – М.: Медицина, 1973. – 391 с.
18. Гитис С.С., Глаз А.И., Иванов А.В. Практикум по органической химии. – М.: Высш. шк., 1991. – 303 с.
19. Гольшевская В.И., Корнеев А.А., Черноусова Л.Н., Сафонова С.Г., Гришина Т.Д. Биологические особенности *M. tuberculosis* и трудности микробиологической диагностики туберкулеза // Пробл. туберкулеза. – 1995. - № 2. – С. 30 – 33.

20. Грузевский А.А. Современные данные о роли фотохромогенных микобактерий в патологии человека (обзор литературы) // Пробл. туберкулеза. – 1999. - № 6. – С. 58 – 61.
21. Грузевський О.А. Вивчення видоспецифічних компонентів *Mycobacterium kansasii* за допомогою імунодифузійних методів // Буковинський медичний вісник. – 2000. – т. 4, № 1. – С. 170 – 174.
22. Грузевський О. А., Протченко П. З., Філіповський О. В. Вивчення протеїнових екстрактів деяких видів атипівих мікобактерій методом іонообмінної хроматографії // Одеський медичний журнал. – 1999. - №4. – С. 12 - 15.
23. Грузевський О.А., Філіповський О.В. // Нові технології у навчальному процесі, теоретичній та клінічній медицині (Додаток до “Одеського медичного журналу”). – 1999. – С. 156 – 159.
24. Гунченко О.М., Кожан Н.С. ВИЧ-інфекція у пенитенціарієв України // Журн. мікробиол. - 1999. – № 1. - С. 31 – 33.
25. Детерман Г. Гель – хроматографія: Пер. с нем. - М.: Мир, 1970. - 252 с.
26. Досон Р., Эллиот Д., Эллиот У., Джонс К. Справочник биохимика: Пер. с англ. – М.: Мир, 1991. – 543 с.
27. Дыхно М.М., Фадеева Н.И., Першин Г.Н., Сарычева И.М. Характеристика белковых спектров отдельных представителей микобактерий // Журн. мікробиол. - 1975. - № 1 - С. 108 - 113.
28. Зильбер Л.А. Основы иммунологии. – М.: Медгиз, 1958. – 599 с.
29. Зыков М.П., Ильина Т.Б. Потенциально - патогенные микобактерии и лабораторная диагностика микобактериозов. - М.: Медицина, 1978. – 175 с.
30. Ильина Т.Б. Бактериологическая и биохимическая идентификация микобактерий // Пробл. туберкулеза. - 1981. - №7. - С. 68 - 73.
31. Иммунологические методы. / Под ред. Г. Фримеля.: Пер. с нем. – М.: Медицина, 1987. – 472 с.

32. Ковалев Г.К. О гипотезе природной очаговости туберкулеза // Пробл. туберкулеза. – 1993. - № 3. – С. 58 – 61.
33. Куликовская Н.В., Капина М.А., Калинина О.А., Черноусова Л.Н. Получение и характеристика моноклональных антител к микобактериям *M. smegmatis* и *M. kansasii* // Пробл. туберкулеза. – 1996. - №1. – С.43 - 46;
34. Кучеренко Н.Е., Бабенюк Ю. Д., Васильев А.Н. Биохимия. Практикум.– Киев: Выща школа, 1988. – 128 с.
35. Лазовская А. Л., Блохина И. Н. Патогенные и условно-патогенные микобактерии. - Горький.: Волго-Вятское книжное издательство, 1979. – 115 с.
36. Липкан Г.Н. Туберкулез // Лабораторная диагностика. – 1999. - №1. – С. 55 – 61.
37. Литвинов В.И. Моноклональные антитела против антигенов микобактерий // Пробл. туберкулеза. - 1990. - № 5 - С. 71 - 74.
38. Литвинов В.И., Гильбурд Б.Ш., Черноусова Л.Н., Романова Р.Ю. Антигены микобактерий туберкулеза // Пробл. туберкулеза. – 1989. - №10. – С. 68 – 72.
39. Лысенко А. П. Антигены *M. bovis* и атипичных микобактерий. Изучение и применение для дифференциальной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота: Автореф. дис. ... д-ра. вет. наук: 16.00.03 / Белорус. НИИ эксперим. ветерин. – Минск, 1994. - 36 с.
40. Макаревич Н.М., Каминская А.А. Изучение различных детергентов с целью улучшения бактериологической диагностики туберкулеза // IX Всесоюз. съезд фтизиатров: Тез. докл. – Кишинев, 1979. – С. 170 – 171.
41. Макаревич Н.М., Яблокова Т.Б., Ильина Т.Б., Леви Д.Т. и др. Нетуберкулезные микобактерии, выделенные на некоторых территориях СССР // IX Всесоюз. съезд фтизиатров: Тез. докл. – Кишинев, 1979. – С. 181 – 182.

42. Мальков И.Г., Артюшин С.К., Фомин Б.А., Коромыслов Г.Ф. Разработка метода идентификации микобактерий бычьего и человеческого видов с использованием реакции цепной полимеризации // Молекулярная генетика, микробиол. и вирусол. - 1993. - № 2 - С. 27 - 30.
43. Маурер Г. Диск – электрофорез: Теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле: Пер. с англ. – М.: Мир, 1971 – 247 с.
44. Мельник В.М. Проблеми епідеміології та профілактики туберкульозу // Медичні вісті. – 1997 - №1. – С. 10 – 13.
45. Мурашкина Г. С., Донченко А. С. Влияние эпизоотического неблагополучия на туберкулезу на основные эпидемиологические показатели по туберкулезу // Пробл. туберкулеза. - 1992. - №11 - 12. - С. 12 – 14.
46. Найманов А.Х. Аллергическая диагностика микобактериальных инфекций крупного рогатого скота. Автореф. дис. ... д-ра. вет. наук: 16.00.03 / Всерос. НИИ эксперим. ветеринар. – М., 1993. – 29 с.
47. Олисаев В. Б., Гвоздилкин Г. И., Ковалев Г. К. СПИД и микобактериальные инфекции // Журн. микробиол. - 1992. - №11. - С. 67 - 70.
48. Остерман Л.А. Исследование биологических макромолекул электрофокусированием, иммуноэлектрофорезом и радиоизотопными методами. – М.: Наука, 1983. – 304 с.
49. Остерман Л.А. Методы исследования белков и нуклеиновых кислот. Электрофорез и ультрацентрифугирование. - М.: Наука, 1981. – 286 с.
50. Остерман Л.А. Хроматография белков и нуклеиновых кислот.- М.: Наука, 1985. - 535 с.
51. Павлова Л.П., Сайдакова Н.А., Камышан И.С., Кириченко С.А. Туберкулез мочевых и половых органов среди населения Украины // Пробл. туберкулеза. – 1999. - №5. – с. 9 – 11.
52. Практикум по общей биохимии / Под ред. Мешковой Н.П. и Северина С.Е. – М.: Изд. МГУ, 1979. – 429 с.

53. Протченко П.З. Изучение биохимических свойств и биологического действия стрептококкового аллергена: Дис. ... канд. мед. наук, - Одесса, 1968. – 362 с.
54. Протченко П.З., Грузевский А.А., Филиповский А.В., Александрова Л.В. Изучение протеинового состава и антигенных свойств некоторых видов микобактерий // Экспериментальная и клиническая медицина. – 1999. - №2 – с. 78 - 80.
55. Прохорова М.И., Тупикова З.Н. Большой практикум по углеводному и липидному обмену. – Ленинград: Изд. Ленинград. Университ., 1965. – 220 с.
56. Пухлик Б.М. Проблема химиорезистентного туберкулеза и возможности ее решения // Пробл. туберкулеза. – 1999. - № 6. – С. 17 – 20.
57. Романова Р.Ю. Использование дифференциального центрифугирования для выделения субклеточных компонентов микобактерий туберкулеза // Пробл. туберкулеза. – 1981. - №7. – С. 54 – 56.
58. Рыбка Л.Н., Макаревич Н.М., Виноградова Р.Г. Нетуберкулезные микобактерии во внешней среде // Пробл. туберкулеза. – 1981. - № 7. – С. 57 – 60.
59. Сибірна Р.І., Сибірний А.В., Креймер Н.Я. Захворюваність мікобактеріозами та імунобактеріологічні критерії їх діагностики // XIII з'їзд Укр. наукового товариства мікробіологів, епідеміологів та паразитологів ім. Д.К. Заболотного: Тез. доп. – Київ – Вінниця, 1996. – С. 137 – 138.
60. Скоупс Р. Методы очистки белков: Пер. с англ. – М.: Мир, 1985. – 358 с.
61. Совершенствование и стандартизация бактериологических исследований при туберкулезе: Сб. науч. тр. / Кирг. НИИ туберкулеза; под ред. проф. Е.А. Финкель. – Фрунзе, 1985. – 114 с.
62. Современные методы в биохимии / Под ред. В.Н. Ореховича – М.: Медицина, 1964. – 348 с.

63. Созінов В.О., Протченко П.З., Грузевський О.А. та співавт. Дослідження протеїнового складу та антигенної структури деяких видів мікобактерій // XIII з'їзд Укр. наукового товариства мікробіологів, епідеміологів та паразитологів ім. Д.К. Заболотного: Тез. доп. – Київ – Вінниця, 1996. - С. 139.
64. Сосновская А.В. Идентификация туберкулезных и нетуберкулезных микобактерий // Пробл. туберкулеза. - 1991. - № 3 - С. 65 - 66.
65. Фадеева Н.И., Голышевская В.И., Бибергаль Е.А., Сафонова С.Г. Белковый спектр микобактерий в зависимости от их таксономической принадлежности и устойчивости к противотуберкулезным препаратам // Пробл. туберкулеза. - 1991. - № 6 - С. 65 – 68.
66. Фадеева Н.И., Дыхно М.М., Кочемасова З.Н., Кассирская Н.Г., Дегтярева И.Н., Першин Г.Н., Карась Л.И. Значение состава внутриклеточных белков в таксономии микобактерий туберкулеза // Пробл. туберкулеза. – 1981. - №3. - С. 63-67.
67. Фещенко Ю.І. Епідеміологічна ситуація щодо туберкульозу в Україні на сучасному етапі // Журн. АМН України. – 1998. - № 1. – С. 104 – 117.
68. Фещенко Ю.И. Туберкулез: новый взгляд на старую проблему // Еже-недельник Аптека. – 2000.- №13. – С. 9.
69. Фещенко Ю.И., Поддубный А.Ф., Куничкина С.А., Антоняк С.М. Туберкулез органов дыхания и синдром приобретенного иммунодефицита на Украине (первое сообщение) // Пробл. туберкулеза. – 1997. - № 4 – С. 55 – 57.
70. Филиппович Ю.Б., Егорова Т.А., Севастьянова Г.А. Практикум по общей биохимии.– М.: Просвещение, 1975 – 318 с.
71. Філіповський О. В., Протченко П. З., Грузевський О. А. Використання аніонного детергенту додецилсульфату натрію для екстракції поверхневих протеїнівміщуючих компонентів мікобактерій // Одеський медичний журнал. – 1999. - №3 – С. 19 - 22.

72. Электрофоретические методы анализа белков / Под ред. Р.К. Саляева, П.Д. Решетова. – Новосибирск: Изд. “Наука”, Сибирское отделение, 1981. – 120 с.
73. Ahn C.H., Lowell J.R., Ahn S.S., Hurst G.A. Short-course chemotherapy for pulmonary disease caused by *Mycobacterium kansasii* // *Am. Rev. Respir. Dis.* – 1983. – Vol. 128, № 6. – P. 1048 - 1050.
74. Abed Y., Bollet C. Demonstration of *Mycobacterium kansasii* species heterogeneity by the amplification of the 16S – 23S spacer region // *J. Med. Microbiol.* – 1995. - Vol. 43, № 2. - P. 156 – 158.
75. Akita Y., Nishio M., Yamada Y. Nontuberculous mycobacterial disease in a general hospital // *Kekkaku.* – 1999. – Vol.74, № 2. – P. 107 –130.
76. Alcaide F., Benitez M.A., Martin R. Epidemiology of *Mycobacterium kansasii* // *Ann. Intern. Med.* – 1999. – Vol.131, №2. – P. 107 –130
77. Anzalone G., Cei M., Vizzaccaro A., Tramma B., Bisetti A. *M. kansasii* pulmonary disease in idiopathic CD4+ T-lymphocytopenia // *Eur. Respir. J.* – 1996. – Vol. 9, № 8. – P. 1754 – 1756.
78. Bacon M.E. Whelan T.V., Mahoney M.D., Patel T.G., Judson P.L. Pericarditis due to *Mycobacterium kansasii* in a patient undergoing dialysis for chronic renal failure // *J. Infect. Dis.* – 1985. – Vol.152, № 4. – P. 846 - 847.
79. Banks J., Hunter A.M., Campbell I.A., Jenkins P.A., Smith A.P. Pulmonary infection with *Mycobacterium kansasii* in Wales, 1970-9: review of treatment and response // *Thorax.* – 1983. – Vol. 38, № 4. – P. 271 - 274.
80. Barbolini G., Bisetti A., Colizzi V., Damiani G., Migaldi M., Vismara D. Immunohistologic analysis of mycobacterial antigens by monoclonal antibodies in tuberculosis and mycobacteriosis // *Hum. Pathol.* – 1989. – Vol. 20, № 11. – P. 1078 - 1083.

81. Barclay R., Furst V., Smith I. A simple and rapid method for the detection and identification of mycobacteria using mycobactin (⁵⁵F) // J. Med. Microbiol. - 1992. – Vol. 37, № 4. – P. 286 - 290.
82. Bennett C., Vardiman J., Golomb H. Disseminated atypical mycobacterial infection in patients with hairy cell leukemia // Am. J. Med. – 1986. – Vol. 80, № 5. – P. 891 - 896.
83. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Ninth Edition / J.G. Holt, N.R. Krieg, P.H. Sneath. – 1994. – Williams and Wilkins
84. Bhakdi S. Removal of SDS from proteins for immunochemical analyses: a simple method utilizing ultracentrifugation in sucrose density gradients containing non-ionic detergent // J. Biochem. and Biophys. Meth. – 1980. - Vol. 2. – P. 79 - 90
85. Bloom B.R., Murray C.J.L. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer // Science. – 1992. – Vol. 257. – P. 1055 – 1064.
86. Bottger E.C. Molecular genetic method of amplification for detection and identification of mycobacteria // Klin. Lab. – 1991. - Vol. 37. – № 9. – P. 243 – 251.
87. Burton K. Sequence determination in nucleic acids // Essays Biochem. – 1965. – Vol. 1. – P. 57 - 58.
88. Chaparas S.D., Maloney C.I., Hedrick C.R. Specificity of Tuberculins and Antigens from various species of Mycobacteria // Am. Rev. ResP. Dis. – 1970. – Vol. 101. – P. 74 – 83.
89. Closs O., Harboe M., Axelsen N.M. The antigens of Mycobacterium bovis, strain BCG, studied by crossed immunoelectrophoresis: a reference system // Scand. J. Immunol. – 1980. – Vol. 12. №. 3 – P. 249 - 263.
90. Dailloux M., Petitpain N., Henry C., Weber M. In vitro determination of the sensitivity of mycobacteria to fluoroquinolones // Pathol. Biol (Paris). – 1989. – Vol. 37, № 5. – P. 346 - 349.

91. Daniel T.M., Anderson P.A. The use of immunoabsorbents for the purification of mycobacterial antigens // *J. Lab. clin. Med.* – 1977. – Vol. 90, № 2. – P. 354 – 360.
92. Daniel T.M., Conchoroff N., Katzman J. Specificity of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 5 determined with mouse monoclonal antibodies // *Infect. and Immun.* – 1984. – Vol. 45, № 1. – P. 52 – 55.
93. Daniel T.M., Janicki B.W. Mycobacterial antigens: a review of their isolation, chemistry, and immunological properties // *Microbiol. Rev.* – 1978.- Vol. 42. - P. 84 – 113.
94. Delanois L., Garrino M.G. Manifestations, diagnosis and treatment of Non – tuberculous mycobacterial infections in – immunodepressed patients // *Rev. Mal. Respir.* – 1997. – Vol. 14, № 5. – P. 130 – 141.
95. Dillon J., Millson C., Morris I. *Mycobacterium kansasii* infection in the wrist and hand // *Br. J. Rheumatol.* – 1990. – Vol. 29, № 2. – P. 150 - 153.
96. Dionisio D., Tortoli E., Simonetti M.T., di Lollo S., Meli M., Farese A., Fontana R., Sterranti№ G., Leoncini F. Intestinal mycobacterial infections in AIDS. Clinical course and treatment of infections caused by *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium genavense* // *Recenti Prog. Med.* – 1994. – Vol. 85, № 11. – P. 526 - 536.
97. Drabick J.J., Hoover D.L., Roth R.E., Sauri M.A., Apgar R.G. Ulcerative perineal lesions due to *Mycobacterium kansasii* // *J. Acad. Dermatol.* – 1988. – Vol.18, № 5. – P. 1146 – 1147.
98. Drobniowski F.A., Pozniak A.L., Uttley A.H.C. Tuberculosis and AIDS // *The Journal of Medical Microbiology.* – 1995. – Vol. 43. №. 2. – P. 85 – 91.
99. Engel H.W., Berwald L.G., Havelaar A.H. The occurrence of *Mycobacterium kansasii* in tapwater // *Tubercle.* – 1980. – Vol. 61, № 1. – P. 21 - 26.

100. Engel H.W., Berwald L.G., Lindeboom B.W., Havelaar A.H. *Mycobacterium kansasii* infections in the Netherlands: a brief summary // *Rev. Infect. Dis.* – 1981. – Vol. 3, № 5. – P. 1024.
101. Engers H.D., Aguado Sanchez G., Malik A., Tougne C. Simplification and standartization of serodiagnostic tests for leprosy based on phenolic glycolipid – I (PG-I) antigen // *Lepr. Rev.* – 1986. – Vol. 57. – P. 83 – 93.
102. Evans S.A., Colville A., Evans A.J., Crisp A.G., Johnston I.D. Pulmonary *Mycobacterium kansasii* infection: comparison of the clinical features, treatment and outcome with pulmonary tuberculosis // *Thorax.* – 1996. – Vol. 51, № 12. – P. 1248 - 1252.
103. Ewig S., Kuhnen E., Niese D., Musch E., von Kempis J. Tuberculosis and atypical mycobacterioses in HIV infection. Results from the Bonn Center 1985 to 1989 // *Med. Klin.* – 1990. – Vol. 85, № 6. – P. 355 - 360.
104. Jacobson K.L., Teira R., Libshitz H.I., Raad I., Rolston K.V., Tarrand J., Whimbey E. *Mycobacterium kansasii* infections in patients with cancer // *Clin. Infect. Dis.* – 2000. – Vol.30, № 6. – P. 965 – 969.
105. Jochen F., Patel Rubina J. Revealing of untreated mycobacteria using PCR and specific DNA – probes // *J. Clin. Microbiol.* – 1991.- Vol. 29. – № 8.- P. 1744 – 1747.
106. Jorgensen J.H., Salinas J.R., Paxson R., Magnon K., Patterson J.E., Patterson T.F. False-positive Gen-probe direct *Mycobacterium tuberculosis* amplification test for patients with pulmonary *M. kansasii* and *M. avium* infections // *J. Clin. Microbiol.* – 1999.- Vol. 37. – № 1.- P. 175 – 178.
107. Fournie J.J, Riviere M., Puzo G. Absolute configuration of the unique 2,6 – dideoxy – 4 – O – methyl – arabino – hexopyranose of the major phenolic glycolipid antigen from *Mycobacterium kansasii* // *Eur. J. Biochem.* – 1987. – Vol. 168, № 1. – P. 181 - 183.
108. Garewal H.S. A procedure for the estimation of microgram quantities of triton X-100 // *Anal. Biochem.* – 1973. – Vol. 54. – P. 319 – 324.

109. Gilleron M., Puzo G. Lipooligosaccharidic antigens from *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium gastri* // *Glyconj. J.* – 1995. – Vol.12, № 3. – P. 298 - 308.
110. Gilleron M., Venisse A., Fournie J.J., Riviere M., Dupont M.A., Gas N., Puzo G. Structural and immunological properties of the phenolic glycolipids from *Mycobacterium gastri* and *Mycobacterium kansasii* // *Eur. J. Biochem.* – 1990. – Vol. 189, № 1. – P. 167 - 173.
111. Glikstein S.L., Nashel D.J. *Mycobacterium kansasii* septic arthritis complicating rheumatic disease: case report and review of the literature // *Semin. Arthritis Rheum.* – 1987. – Vol.16, № 3. – P. 231 - 235.
112. Godlee F. WHO at the crossroads // *Brit. Med. J.* – 1993. – Vol. 306. – P. 1143 – 1144.
113. Goren M.B. Immunoreactive substances of mycobacteria // *Am. Rev. resp. Dis.* – 1982. – Vol. 125. – P. 50 – 69.
114. Goren M.B. Cord factor revisited: a tribute to the late Dr. Hubert Bloch // *Tubercle.* – 1975. - Vol. 56, № 1. – P. 65 – 71.
115. Gormley E., Sandall L., Hong C., Lawton D., Murray A. Identification and differentiation of mycobacteria using the PAN promoter sequence from *Mycobacterium paratuberculosis* as a DNA probe // *FEMS. Microbiol. Lett.* – 1997. – Vol. 147, № 1. – P. 63 - 68.
116. Grabar P., Williams C.A. Methode permettant l'etude conjuguee des propriete electrophoretiques et immunochimiques d'un melange de proteines // *Biochim. et biophys. acta.* – 1953. - Vol. 10. – P. 193 – 194.
117. Grange G.M. The humoral immune response in tuberculosis: its nature, biological role and diagnostic usefulness // *Advanc. Tubercul. Res.* – 1984. – Vol. 21. – P. 1 – 78.
118. Guest P.G., Britton M.G., Grundy H.S., Yates M.D. Pulmonary *Mycobacterium kansasii* infection successfully treated with a regimen containing erythromycin // *Thorax.* – 1989. – Vol. 43, № 6. – P. 488 - 489.

119. Hartmann S., Minnikin D.E., Mallet A.I., Ridell M., Rigouts L., Portels F. Fast atom bombardment mass spectrometry of mycobacterial phenolic glycolipids // *Biol. Mass Spectrom.* – 1994. – Vol. 23, № 6. – P. 362 - 368.
120. Helenius A., Simons K. Solubilization of membranes by detergents // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1975. – Vol. 415, № 1. – P. 29 – 79.
121. Hepper N.G., Karlson A.G., Leary F.G., Soule E.H. Genitourinary infection due to *Mycobacterium kansasii* // *Mayo Clin. Proc.* – 1971. – Vol. 46, № 6. – P. 387 - 390.
122. Hirasuna J.D. Disseminated *Mycobacterium kansasii* infection in the acquired immunodeficiency syndrome // *Ann. Intern. Med.* – 1987. – Vol. 107, № 5. – P. 784.
123. Hjelmeland L.M., Chrambach A. *Methods in Enzymology.* – Academic press, New York and London. – 1984. – Vol. 104. – P. 305.
124. Horikawa S., Ogawara H. A simple and rapid procedure for removal of triton X-100 from protein solution // *Anal. Biochem.* - 1979. – Vol. 97. – P. 116 – 119.
125. Ho I.I., Chan C.Y., Cheng A.F. Aminoglycoside resistance in *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium avium* – *M. intracellulare*, and *Mycobacterium fortuitum*: are aminoglycoside-modifying enzymes responsible? // *Antimicrob. Agents Chemoter.* - 2000. – Vol. 44, № 1. – P. 39 – 42.
126. Horsburg C. R. *Mycobacterium avium* complex infection in the acquired immunodeficiency syndrome // *N. Eng. J. Med.* - 1991. - Vol. 324, №19. - P. 1332 - 1338.
127. Huang Z.H., Ross B.C., Dwyer B. Identification of *Mycobacterium kansasii* by DNA hybridization // *J. Clin. Microbiol.* – 1991. – Vol. 29 , № 10. – P. 2125 – 2129.
128. Huchzermeier R., Tanenbaum S.W., Flashner M. Radioimmunoassay of *Arthrobacter neuraminidase*: applications to catalytic and taxonomic studies // *Anal. Biochem.* – 1980. – Vol. 105. – P. 454 – 460.

129. Hunter S.W., Barr V.L., McNeil M., Jardine I., Brennan P.J. Trehalose-containing lipooligosaccharide antigens of *Mycobacterium* sp.: presence of a mono-O-methyltri-O-acyltrehalose "core" // *Biochemistry*. – 1988. – Vol. 27, № 5. – P. 1549 – 1556.
130. Hunter S.W., Jardine I., Yanagihara D.L., Brennan P.J. Trehalose – containing lipooligosaccharides from mycobacteria: structure of the oligosaccharide segments and recognition of a unique N – acylkanosamine – containing epitope // *Biochemistry*. – 1985. – Vol. 24, № 11. – P. 2798 - 2805.
131. Iijima M., Sasaki S. Cutaneous atypical mycobacteriosis due to *Mycobacterium kansasii* - a case report and a review of the literature // *Nippon Hifuka Gakkai Zasshi* – 1990. – Vol. 100, № 6. – P. 711 - 720.
132. Jackson R.K., Juras R.A., Stiefel S.M., Hall J.E. *Mycobacterium kansasii* in a rhesus monkey // *Lab. Anim. Sci.* – 1989. – Vol. 39, № 5. – P. 425-428.
133. Janicki B.W., Chaparas S.D., Daniel T.M. // *Amer. Rev. resp. Dis.* – 1971. – Vol. 104. - № 4. – P. 602 – 604.
134. Jardine I., Hunter S.W., Brennan P.G., McNeal C.J., Macfarlane R.D. Heterogeneity of bacterial antigenic lipooligosaccharides determined by californium – 252 plasma desorption mass spectrometry // *Biomed. Environ. Mass Spectrom.* – 1986. – Vol. 13, № 6. – P. 273 - 276.
135. Kaustova J., Olsovsky Z., Kubin M., Zatloukal O., Pelikan M., Hradil V. Endemic occurrence of *Mycobacterium kansasii* in water-supply systems // *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* – 1981. – Vol. 25, № 1. – P. 24 - 30.
136. Klausner R.D., Van Renswoude J., Blumenthal R., Rivnay B. Receptor Biochemistry and Methodology. – Vol. 3 - New York. – 1984. – P. 209.
137. Kleeberg H., Nel E.E. Occurrence of environmental atypical mycobacteria in South Africa // *Ann. Soc. Belge Med. trop.* – 1973. - Vol. 53, № 4 – P. 405 - 418.

138. Klein J.L., Corbett E.L., Stade P.M., Miller R.F., Coker R.J. *Mycobacterium kansasii* and human immunodeficiency virus co-infection in London // *J. Infect.* – 1998. – Vol. 37, № 3 – P. 252 - 259.
139. Kos S., Dura J., Jirasek J. Lethal extrapulmonary mycobacteriosis // *Eur. Respir. J.* – 1989. – Vol. 2, № 1. – P. 96 - 97.
140. Krest'apol M., Kolk A.H., Kaustova J. Rapid species identification of wild mycobacterial isolates by monoclonal antibodies in ELISA // *Cent. Eur. J. Public Health.* – 1993. – Vol. 1, № 1. – P. 31 - 34.
141. Kubin M., Jandejsek J., Wisingerowa E., Havelkova M., Kuncova V. A monoclonal antibody to *Mycobacterium kansasii*: preparation and properties // *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.* – 1987. – Vol. 31, № 2. – P. 215 - 222.
142. Kubin M., Svandova E., Medek B., Chobot S., Olsovsky Z. *Mycobacterium kansasii* infection in an endemic area of Czechoslovakia // *Tubercle.* – 1980. – Vol. 61, № 4. – P. 207 – 212.
143. Kuwabara S. Purification and properties of tuberculin-active protein from *Mycobacterium tuberculosis* // *J. biol. Chem.* – 1975. – Vol. 250, № 7. – P. 2556 – 2562.
144. Kuze F., Kurasawa T., Bando K., Lee Y., Maekawa N. In vitro and in vivo susceptibility of atypical mycobacteria to various drugs // *Rev. Infect. Dis.* – 1981. – Vol. 3, № 5. – P. 885 – 897.
145. La tuberculose en France Comment a/refer l'epidemie actuelle // *Rev. Mal. ResP.* - 1995. – Vol.12. – P. 132 – 157.
146. Laemmli U.K., Molbert E., Showe M. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 // *Nature.* – 1970. – Vol. 227. – P. 680 – 685.
147. Lamb J.R., Ivanyi J., Rees A.D., Rothbard J.B. Mapping of T cell epitopes using recombinant antigens and synthetic peptides // *EMBO J.* – 1987. – Vol. 6, № 5. – P. 1245 – 1249.

148. Leader M., Revell P., Clarke G. Synovial infection with *Mycobacterium kansasii* // *Ann. Rheum. Dis.* – 1984. – Vol. 43, № 1. – P. 80 - 82.
149. Levy – Frebault V., David H.L. *Mycobacterium kansasii*: drinking water contaminant of a hospital // *Rev. Epidemiol. Sante Publique.* – 1983. – Vol.31, № 1. – P. 11 – 20.
150. Lichtenberg D., Robson R.J., Dennis E.A. Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1983. – Vol. 737, № 2. – P. 285 – 304.
151. *Manual of clinical microbiology* / Balows A., Hausler Jr.W.J., Hermann K.L., Isenberg H.D., Shadomy H.J. – Washington, D.C., 1991. – 1364 p.
152. Martin-Scapa C., Gomez-Criado C., Ortega-Nunez A., Bouza E. Disseminated infection caused by *Mycobacterium kansasii* presenting as fever of unknown origin // *Eur. J. Clin. Microbiol.* – 1987. – Vol. 6, № 4. – P. 501 - 502.
153. McGeady S.J., Murphey S.A. Disseminated *Mycobacterium kansasii* infection // *Clin. Immunol. Immunopathol.* – 1981. – Vol. 20, № 1. – P. 87 - 98.
154. Mead G.M., Dance D.A., Smith A.G. Lymphadenopathy complicating hairy cell leukaemia. A case of disseminated *Mycobacterium kansasii* infection // *Acta Haematol.* – 1983. – Vol. 70, № 5. – P. 335 – 336.
155. Meissner G, Schmiedel A. *Mycobacterien und mycobacterielle Krankheiten.* – Jena. - 1967. – 269 P.
156. Minden P., Kelleher P.J., Freed J.H., Nielsen L.D. Immunological evaluation of a component isolated from *Mycobacterium bovis* BCG with a monoclonal antibody to *M. bovis* BCG // *Infect. and Immun.* – 1984. – Vol. 46, № 2.– P. 519 –525.
157. Mizutani S. Chemotherapy of pulmonary *Mycobacterium kansasii* infection // *Kekkaku.* – 1996. – Vol. 71, № 9. – P. 527 - 531.

158. Moreno F., Sharkey-Mathis P.K., Mokulis E., Smith J.A. *Mycobacterium kansasii* pericarditis in patients with AIDS // *Clin. Infect. Dis.* – 1994. – Vol. 19, № 5. – P. 967 – 969.
159. Murray C.J.L., Styblo K., Rouillon A. Tuberculosis in developing countries: burden, intervention and cost // *Bull. Int. Union Tuberc. Lung Dis.* – 1990. – Vol. 65. – P. 6 – 24.
160. Naito M., Ohara N., Matsumoto S., Yamada T. Immunological characterization of alpha antigen of *Mycobacterium kansasii*: B-cell epitope mapping // *Scand. J. Immunol.* – 1998. – Vol. 48, № 1. – P. 73 – 78.
161. Oftung F., Mustafa A.S., Husson R., Young R.A. Human T cell clones recognize two abundant *Mycobacterium tuberculosis* protein antigens expressed in *Escherichia coli* // *J. Immunol.* – 1987. – Vol. 138, № 3. - P. 927 – 931.
162. Ouchterlony O. Antigen-antibody reactions in gels // *Acta Path. Microbiol. Scand.* – 1953. – Vol. 32. – P. 231.
163. Pang C.S. *Mycobacterium kansasii* infections in Western Australia (1962-1987) // *Respir. Med.* – 1991. – Vol. 85, № 3. – P. 213 - 218.
164. Panyim S., Thitiopongranich R., Supatimusro D. A simplified gel electrophoretic system and its validity for molecular weight determinations of protein-cetyltrimethylammonium complexes // *Anal. Biochem.* – 1977. – Vol. 81, № 2. – P. 320 – 327.
165. Papa F., Riviere M., Fournie J.J., Puzo G., David H. Specificity of a *Mycobacterium kansasii* phenolic glycolipid (mycoside A) immunoserum // *J. Clin. Microbiol.* – 1987. – Vol. 25, № 12. – P. 2270 - 2273.
166. Pezzia W., Raleigh J.W., Bailey M.C., Toth E.A., Silverblatt J. Treatment of pulmonary disease due to *Mycobacterium kansasii*: recent experience with rifampin // *Rev. Infect. Dis.* – 1981. – Vol. 3, № 5. – P. 1035 - 1039.
167. Pintado V., Gomez-Mampaso E., Martin-Davila P., Cobo J., Navas E., Quereda C., Fortun J., Guerrero A. *Mycobacterium kansasii* infection in pa-

- tients infected with the human immunodeficiency virus // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 1999. – Vol. 18, № 8. – P. 582 – 586.
168. Raviglione M.C., Snider D.E., Kochi A. Global epidemiology of tuberculosis. Morbidity and mortality of a worldwide epidemic // *JAMA.* – 1995. – Vol. 273, № 3. – P. 220 – 226.
169. Reynolds J.A. *Lipid – Protein Interactions*, Wiley, New York, 1982. - Vol. 2. – P. 93.
170. Runyon E.H. Anonymous mycobacteria in pulmonary disease // *Med. Clin. N. Am.* - 1959. - Vol. 43. – P. 273 – 290.
171. Saito H., Yamaoka K., Kiyotani K., Masai H. A new heat-stable acid phosphatase test for mycobacteria // *Am. Rev. Respir. Dis.* – 1976. – Vol. 114, № 2. – P. 407 - 409.
172. Sakatani M. Epidemiology of non-tuberculous mycobacteriosis (NTM) // *Nippon Kyobu Shikkan Gakkai Zasshi.* – 1994. – Vol. 32. – P. 211 – 215.
173. Sanger J.R., Stamphl D.A., Franson T.R. Recurrent granulomatous synovitis due to *Mycobacterium kansasii* in a renal transplant recipient // *J. Hand. Surg.* – 1987. – Vol. 12, №. 3 – P. 436 – 441.
174. Savrda J. Synthesis and biological assays of a peptide from a tuberculin-active protein // *Infect. and Immun.* – 1980. – Vol. 30. №. 3 – P. 686 – 693.
175. Schoningh R., Verstijnen C.P., Kuijper S., Kolk A.H. Enzyme immunoassay for identification of heat-killed mycobacteria belonging to the *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* complexes and derived from early cultures // *J. Clin. Microbiol.* – 1990. – Vol. 28, № 4. – P. 708 – 713.
176. Seldenrijk C.A., Drexhage H.A., Meuwissen S.G. T – cellular immune reactions (in macrophage inhibition factor assay) against *Mycobacterium paratuberculosis*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium avium* in patients with chronic inflammatory bowel disease // *Gut.* – 1990. – Vol. 31, № 5. – P. 529 – 535.

177. Selik R.M., Starcher E.T., Curran J.W. Opportunistic diseases reported in AIDS patients: frequencies, associations, and trends // AIDS. – 1987. – Vol.1. – P. 175 – 182.
178. Sherer R., Sable R., Sonnenberg S. Disseminated infection with *Mycobacterium kansasii* in the Acquired immunodeficiency Syndrome // Ann. Intern. Med. – 1986. – Vol.105. – P. 710 – 712.
179. Small D.M. The Bile Acids. Plenum Press. New York and London. – 1971. – P. 249.
180. Smith G.R., van Belle G., Loop J.W. Pattern discrimination in matching chest radiographs // Radiology. - 1978. - Vol. 127, № 3. - P. 595 - 599.
181. Somi H., Scurnic M. Detection and identification of mycobacteria by amplification of gene segment coding by 32 kD protein // J. Clin. Microbiol. – 1992. - Vol. 30. – №8.- P. 2025 – 2028.
182. Sriyabhaya N., Wongwatana S. Pulmonary infection caused by atypical mycobacteria: a report of 24 cases in Thailand // Rev. Infect. Dis. – 1981. – Vol. 3, № 5. – P. 1085 - 1089.
183. Stanford J.L., Grange J.M. The meaning and structure of species as applied to mycobacteria // Tubercle. – 1974. – Vol. 55, № 2. – P.143 – 152.
184. Studier F.W. Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels // J. Mol. Biol. – 1973. – Vol. 79, № 2. – P. 237 – 248.
185. Terland O., Slinde E., Skotland T., Flatmark T. Inhibition of dopamine beta-mono-oxygenase by non-ionic detergents of the triton X-series // FEBS Lett. - Vol. 76, № 1. – P.86 - 90.
186. Texier - Maugein J., Mormede M., Fourche J., Bebear C. In vitro activity of four fluoroquinolones against eighty-six isolates of mycobacteria // Eur. J. Clin. Microbiol. – 1987. – Vol. 6, № 5. – P. 584 - 586.
187. Tietz A., Tamm M., Battegay M. *Mycobacterium kansasii* abscess of the chest wall after drainage of bacterial empyema // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2000. – Vol. 19, № 1. – P. 72 – 73.

188. Thayer W.R., Coutu J.A., Chiodini R.J., Van Kruiningen H.J., Merkal R.S. Possible role of mycobacteria in inflammatory bowel disease. II. Mycobacterial antibodies in Crohn's disease // *Dig. Dis. Sci.* – 1984. – Vol. 29, № 12. – P. 1080 - 1085.
189. Thole J.E., Danwerse H.G., Das P.K., Groothuis D.G. Cloning of *Mycobacterium bovis* BCG DNA and expression of antigens in *Escherichia coli* // *Infect. and Immun.* – 1985. – Vol. 50, № 3 – P. 800 – 806.
190. Tortoli E., Simonetti M.T., Lavinia F. Evaluation of reformulated chemiluminescent DNA probe (AccuProbe) for culture identification of *Mycobacterium kansasii* // *J. Clin. Microbiol.* – 1996. – Vol. 34, № 11. – P. 2838 – 2840.
191. Tsukamura M. Sulfadimethoxine as a promising drug in the treatment of infections caused by *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium xenopi* – differentiation between *M. kansasii* and *M. marinum* and between *M. goodii* and *M. scrofulaceum* by the susceptibility testing to sulfadimethoxine // *Kekkaku.* – 1989. – Vol. 64, № 4. – P. 313 - 317.
192. Tsukamura M. Evaluation of cycloserine in the treatment of infections caused by nontuberculous mycobacteria viewed from in vitro experiments // *Kekkaku.* – 1989. – Vol. 64, № 5. – P. 345 - 349.
193. Tsukamura M., Kita N., Shimoide H., Arakawa H. Studies on the epidemiology of non-tuberculous mycobacteriosis in Japan // *Amer. Rev. Resp. Dis.* – Vol. 137. – P. 1280 - 1284.
194. Tsukamura M., Shimoide H., Kita N., Kawakami K. A study on the geographic distribution of «atypical» mycobacteria in Japan // *Kekkaku.* – 1978. – Vol. 53, № 5. – P. 283 –286.
195. Utrup L.G., Moore T.D., Actor P., Poupard J.A. Susceptibilities of nontuberculosis mycobacterial species to amoxicillin – clavulanic acid alone and in combination with antimycobacterial agents // *Antimicrob. Agents Chemoter.* – 1995. – Vol. 39, № 7. – P. 1454 - 1457.

196. Wang J. W. Preparing a monoclonal antibody specific to *Mycobacterium kansasii* and its corresponding antigen // *Chung Hua Chieh Ho Ho Hu Hsi Tsa Chin* . – 1987. – Vol. 10, № 6. – P. 340 -343.
197. Watanabe M, Aoyagi Y., Ohta A., Minnikin D.E. Structures of phenolic glycolipids from *Mycobacterium kansasii* // *Eur. J. Biochem.* – 1997. – Vol. 248, № 1. – P. 93 - 98.
198. Watkin S.W., Bucknall R.S., Nisar M., Agnew R.A. Atypical mycobacterial infection of the lung in rheumatoid arthritis // *Ann. Rheum. Dis.* – 1989. – Vol. 48, № 4. – P. 336 - 338.
199. Weiss N., Kracht M. Bacterial nomenclature service provided by Deutsche Sammlung von Microorganismen und Zellkulturen GmbH. – Braunschweig. - 1997.
200. Wisingerova E., Janota J., Havelkova M., Kubin M. Characterization of a monoclonal antibody to *Mycobacterium kansasii* // *Zentralbl. Bakteriол. Mikrobiol. Hyg.* – 1988. – Vol. 268, № 4. – P. 470 - 475.
201. Wolynsky E. Nontuberculous mycobacteria and associated diseases // *Am. Rev. Respir. Dis.* – 1979. - Vol. 119. – P. 107 – 159.
202. Wong C.S., Palmer G.S., Cynamon M.H. In-vitro susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium kansasii* to amoxycillin and ticarcillin in combination with clavulanic acid // *J. Anti-microb. Chemother.* – 1988. – Vol. 22, № 6. – P. 863 - 866.
203. Woolford A.J., Hewinson R.G., Woodward M., Dale J.W. Sequence heterogeneity of an *mpb70* gene analogue in *Mycobacterium kansasii* // *FEMS. Microbiol. Lett.* – 1997. – Vol. 148, № 1. – P. 43 - 48.
204. Wright E.P., Collins C.H., Yates M.D. *Mycobacterium xenopi* and *Mycobacterium kansasii* in a hospital water supply // *J. HosP. Infect.* – 1985. – Vol. 6, № 2. - P. 175 – 178.
205. Yamada H., Kohyama T., Terashi K., Mori H., Yamaguchi A., Arima N., Tanaka H. Fatal pulmonary infection due to multidrug-resistant *Mycobacte-*

- rium kansasii which developed in an immunocompetent young man // Intern. Med. – 1997. – Vol. 36, № 4. – P. 298 – 300.
206. Yanez M.A., Coppola M.P., Russo D.A., Delaha E., Chaparas S.D., Yeager H.Jr. Determination of mycobacterial antigens in sputum by enzyme immunoassay // J. Clin. Microbiol. – 1986. – Vol. 23, № 5. – P. 822 - 825.
207. Young L.S., Berlin O.G., Interlied C.B. Activity of ciprofloxacin and other fluorinated quinolones against mycobacteria // Am. J. Med. – 1987. – Vol. 82, № 4. - P. 23 - 26.
208. Young R.A., Bloom B.R., Grosskinski C.M., Ivanyi J. Dissection of Mycobacterium tuberculosis antigens using recombinant DNA // Proc. nat. Acad. Sci. USA. – 1985. – Vol. 82, № 9. – P. 2583 – 2587.
209. Young L.S., Interlied C.B., Berlin O.G. Mycobacterial infections in AIDS patients with emphasis on the Mycobacterium avium complex // Rev. Infect. Dis. - 1986. - Vol. 8. – P.1024 – 1033.
210. Zimmermann D.R., Stadel – Brodbeck R., Ajmo M., Dours-Zimmermann M.T. Molecular pathologic detection of mycobacteria // Verh. Dtsch. Ges. Pathol. – 1997. – Vol. 81. – P. 273 – 280.
211. Zvetina J.R., Difilippo N.M., Ali M.M., Vandrunen M. Mycobacterium kansasii empyema // Tubercle. – 1981. – Vol. 62, № 2. – P.135 – 138.