



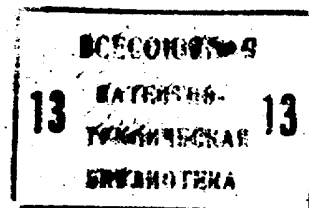
СОЮЗ СОВЕТСКИХ
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ
РЕСПУБЛИК

(19) **SU** (11) **1069783** **A**

3(5) А 61 В 10/00

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ



- (21) 3413780/28-13
(22) 22.03.82
(46) 30.01.84. Бюл. № 4
(72) С.Н.Головачева, В.Н.Алексеева,
Б.А.Лянда-Геллер, Э.А.Степанова,
Б.И.Фейгельман и М.П.Зыков
(71) Ленинградский научно-иссле-
довательский институт вакцин и сыро-
ток и Ленинградский ордена Трудового
Красного Знамени педиатрический ме-
дицинский институт
(53) 615.375(088.8)
(56) 1.Takahashi Y. and Katsuo O.
Study on the Passive Hemagglutina-
tion Reaction by the Phosphatide
of M. Tuberculosis. 2 Conditions
of the Reaction. - Amer. Rev. Resp.
Dis., 1961, № 83, p. 386-393.

(54)(57) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ТУБЕРКУ-
ЛЕЗНОГО ДИАГНОСТИКУМА, включающий
культивирование микобактерий тубер-
кулеза, выделение и очистку фосфа-
тидного антигена из микробной мас-
сы ацетоном и метанолом с последу-
ющей сенсibilизацией им сорбента,
отличающийся тем, что,
с целью повышения активности целе-
вого продукта, культивируют микоба-
терии Dt/St и Valu, после метаноло-
вой очистки фосфатидный антиген вы-
паривают до появления осадка, обра-
батывают хлороформом и сенсibilизи-
руют эритроциты из расчета 0,4 -
1,0 мг антигена на 1 мл 10%-ной
взвеси эритроцитов.

(19) **SU** (11) **1069783** **A**

Изобретение относится к медицине и может быть использовано для получения антигенного эритроцитарного туберкулезного диагностикума.

Известен способ получения туберкулезного диагностикума, включающий культивирование микобактерий туберкулеза, выделение и очистку фосфатидного антигена из микробной массы ацетоном и метанолом с последующей сенсibilизацией им каолина [1].

Однако известный способ не позволяет получить диагностикум с высокой активностью и, кроме того, сложен в исполнении.

Цель изобретения - повышение активности диагностикума.

Указанная цель достигается тем, что согласно способу получения туберкулезного диагностикума, включающему культивирование микобактерий туберкулеза, выделение и очистку фосфатидного антигена из микробной массы ацетоном и метанолом с последующей сенсibilизацией им сорбента, культивируют микобактерии Dt/St и Valu, после метаноловой очистки фосфатидный антиген выпаривают до появления осадка, обрабатывают хлороформом и сенсibilизируют эритроциты из расчета 0,4-1,0 мг антигена на 1 мл 10%-ной взвеси эритроцитов.

Способ осуществляют следующим образом.

Микобактерии туберкулеза Dt/St и Valu выращивают в отдельных матрицах, заполненных средой Линникова и Могилевского (состав среды: вода дистиллированная 200 л, глицерин 1,7 кг, аммоний лимоннокислый однозамещенный 1,0 кг; натрий углекислый безводный 0,6 кг, натрий хлористый 0,4 кг, магний сернокислый 0,2 кг, железо лимоннокислое окисное 0,01 кг; глицерин 14 кг, ортофосфорная кислота 60-90 мл; калий фосфорнокислый двузамещенный 0,6 кг), в течение 6-8 недель при 38°C. После этого проводят стерилизацию микробных культур автоклавированием текучим паром в течение 1 ч. Затем микробные культуры смешивают в равных объемах, после чего для получения микробных тел культуральную жидкость удаляют путем фильтрации через асбестовые пластины.

Полученные микробные клетки высушивают обработкой ацетоном.

Высушенные ацетоном микробные клетки заливают ацетоном из расчета два объема ацетона на один объем микробной массы и помещают в термостат при 38°C на 3 ч, после чего ацетон сливают. Эту операцию выполняют дважды.

Обработанные ацетоном клетки заливают метанолом из расчета 0,5 л метанола на 50 г клеток и встряхивают в течение 5 ч при 37°C, после чего микробные клетки отделяют центрифугированием. Эту операцию также проводят два раза.

Метаноловые экстракты первого и второго извлечения (по указанной операции) объединяют и помещают в вакуум-сушильный шкаф, в котором проводят выпаривание метанолового экстракта до появления осадка фосфатидного антигена. Выпаривание целесообразно проводить при разрежении 0,8-0,6 кгс/см² и температуре 48-52°C. Окончание операции выпаривания устанавливают либо визуально по выпадению осадка (для чего вакуум-сушильный шкаф должен иметь прозрачное окно для наблюдения), либо по времени, предварительно установленному в зависимости от используемой аппаратуры и конкретного режима выпаривания из расчета выпаривания до 1/3 объема. Выпаривание до 1/3 исходного объема метанолового экстракта достаточно для выпадения осадка фосфатидного антигена без соосаждения примесей.

Образовавшийся осадок фосфатидного антигена отделяют центрифугированием и растворяют в хлороформе. К этому раствору добавляют два объема ацетона для осаждения фосфатидного антигена. Осажденный антиген промывают ацетоном и высушивают в вакуум-экспикаторе.

Полученный полуфабрикат (фосфатидный антиген) до проведения операции сенсibilизации эритроцитов хранят в ампулах, запаиваемых под азотом.

Навеску фосфатидного антигена растворяют в метаноле. Этот раствор добавляют по каплям в физраствор, после чего производят выпаривание метанола при 50°C на магнитной мешалке до первоначального объема физраствора. Таким путем получают рабочий раствор фосфатидного антигена для сенсibilизации им эритроцитов, поскольку непосредственно в физрастворе фосфатидный антиген не растворяется. Объем физраствора при приготовлении фосфатидной эмульсии зависит от требуемой концентрации фосфатидного антигена, обеспечивающей высокий титр противифосфатидных антител в соответствующих иммунных сыворотках и экономное расходование фосфатидного антигена. Целесообразно брать такое количество физраствора, чтобы весовая концентрация фосфатидного антигена в нем составила 0,4 - 1,0 мг/мл. При этом для сенсibilизации используют 10%-ную взвесь формализированных эритроцитов в объеме, равном объему использованного для

приготовления фосфатидной эмульсии физраствора. Этим самым обеспечивается сенсibilизация эритроцитов при соотношении ингредиентов: 0,4 - 1,0 мг фосфатидного антигена на 1 мл 10%-ной взвеси эритроцитов.

Операцию сенсibilизации проводят соединением равных объемов фосфатидной эмульсии и 10%-ных формалинизированных эритроцитов с последующим выдерживанием данной смеси в течение 14 ч при 37°C при постоянном перемешивании. Затем производят центрифугирование и отмывание осадка физраствором. Из осадка отмывают

сенсibilизированных эритроцитов приготавливают 10%-ную взвесь добавлением защитной среды. В качестве защитной среды может применяться 5%-ный раствор сахарозы, сахарозо-желатиновый стабилизатор, 5%-ный пептон или мясopептонный бульон (МПБ) с добавлением сахарозы и баритно-янтарного буфера. В выбранной защитной среде целевой продукт подвергают лиофилизации.

Сведения о предпочтительности режима сенсibilизации эритроцитов и выбора защитной среды приведены в табл. 1 и 2.

15

Т а б л и ц а 1

Титр антител в иммунной кроличьей сыворотке в РНГА с туберкулезными диагностиками, полученными сенсibilизацией эритроцитов различными дозами фосфатидного антигена

Доза антигена, мг на 1 мл 10%-ной взвеси эритроцитов	Титр антител						
	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512
0,1	+++	0	0	0	0	0	0
0,2	+++	++	0	0	0	0	0
0,3	+++	++	+	0	0	0	0
0,4	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
0,6	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
0,8	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+
1,0	+++	+++	+++	+++	+++	++	+

Т а б л и ц а 2

Титр антител в иммунной кроличьей сыворотке в РНГА с эритроцитарным диагностиком, лиофилизированным в различных защитных средах

Защитная среда	Содержание, %	Титры антител в зависимости от сроков хранения препарата при 20°C					
		0,5 г	1 г	1,5 г	2 г	2,5 г	3 г
Сахароза	5	1:128	0	0	0	0	0
Сахарозо-желатиновый стабилизатор	-	1:128	1:32	1:4	0	0	0

Продолжение табл. 2

Защитная среда	Содержание, %	Титры антител в зависимости от сроков хранения препарата при 20°C					
		0,5 г	1 г	1,5 г	2 г	2,5 г	3 г
Пептон	5	1:64	1:32	1:8	0	0	0
МПБ	25						
Сахароза	5						
Баратно-янтарный буфер	Осталь- ное	1:128	1:128	1:128	1:128	1:64	1:64

Данные табл. 1 иллюстрируют проведение операции сенсибилизации эритроцитов барана различными дозами фосфатидного антигена. Как видно из табл. 1 оптимальной сенсибилизирующей дозой является 0,4-0,6 мг/мл, так как меньшая доза не обеспечивает достаточного выявления антител, а большие дозы приводят в неэкономному расходованию антигена.

Как видно из табл. 2, наиболее предпочтительной для лиофилизации и хранения препарата является защитная среда следующего состава:

Мясопептонный бульон,

об. % 25

Сахароза, вес. % 5

Баратно-янтарный

буфер

Остальное

Лиофилизированный в этой среде препарат может храниться 3 года, тогда как при использовании других защитных сред срок хранения не более 6 мес.

Используемые в предлагаемом способе штаммы являются новыми только по отношению к выбранному прототипу. Они используются в указанной технологии получения туберкулина. При этом штамм Dt/St является штаммом человеческого типа. Он получен из США (г. Вашингтон, комиссия земледелия) и хранится в коллекции ГИСК им. Л.А.Тарасевича. Штамм Valu является штаммом бычьего типа. Он получен из ЦНИИ туберкулеза и хранится в коллекции ГИСК им. Л.А.Тарасевича. Ксерокопии паспортов штаммов прилагаются.

Замена штаммов произведена в связи с тем, что использовавшиеся в способе-прототипе штаммы, особенно ВСС, приводили к выявлению антител, характеризующих, главным образом, поствакцинальный иммунитет, что снижает специфичность этого серологи-

ческого теста. Кроме того, достигнутое использование одних и тех же штаммов как для приготовления туберкулина, так и предлагаемого туберкулезного диагностикума, дает возможность осуществить безотходное производство одновременно обоих препаратов: при этом в технологической схеме их получения общей стадией будет культивирование продуцентов после чего из культуральной жидкости извлекают туберкулин, а из микробной массы (которая ранее являлась отходом производства) выделяют фосфатидный антиген для предлагаемого получения туберкулезного диагностикума.

Использование только одного из этих штаммов в предлагаемом способе так же, как и при получении туберкулина, недостаточно для полного выявления соответствующих антител у больных туберкулезом.

Обработка фосфатидного антигена хлороформом введена для растворения целевого продукта, что позволяет освободить его от нерастворимых в хлороформе балластных веществ, продуцируемых используемыми штаммами микобактерий туберкулеза. При этом важным является выпаривание метанолового экстракта не полностью, а только до появления осадка (в котором содержится фосфатидный антиген). Экспериментально установлено, что в противном случае (т.е. при полном выпаривании метанолового экстракта до получения сухого осадка) осадок приобретает темную окраску, что свидетельствует о осаждении балластных пигментированных веществ, и не поддается растворению в хлороформе. Возможно, что это требование обусловлено использованием названных штаммов.

Использование в качестве сорбента эритроцитов позволяет получить препарат в виде эритроцитарного туберкулезного диагностикума, так как его применяют не в РКА, а в реакции непрямой геммагглютинации (РНГА). Кроме того, эритроцитарный диагностикум подлежит лиофилизации, что увеличивает срок его годности.

П р и м е р. Матрацы, предварительно простерилизованные температурной обработкой, емкостью 1,5 л стерильно заполняют синтетической питательной средой Линникова и Могилевского из расчета по 600 мл на 1 матрац. pH среды равен 6,9-7,1. Одну половину матрацев засевают штаммом Dt/St, а другую - штаммом Valu. Выращивание микобактерий туберкулеза в этих матрацах производят при 38°C в течение 6-8 недель. В течение этого срока ежедневно посевы просматривают для выявления матрацев с ростом постоянной флоры, которые отбраковывают и обеззараживают.

Матрацы с 6-8-недельными хорошо выросшими туберкулезными культурами помещают в оцинкованные ящики, в которых обеззараживают эти культуры автоклавированием текучим паром в течение 1 ч при 120°C.

Обеззараженные культуры смешивают поштаммно путем сливания их в 20-литровые бутылки (в равных объемах для каждого штамма). Для приготовления фосфатидного антигена берут 10-12 л смешанной культуры обоих штаммов.

Смешанную культуру фильтруют через асбестовые пластины для получения микробных клеток, которые затем промывают 7 л дистиллированной воды и 3 л ацетона.

После этого производят экстрагирование ацетонорастворимых компонентов путем обработки одного объема микробной массы двумя объемами ацетона при 38°C в течение 3 ч, по истечении которых ацетон сливают. Данную операцию проводят дважды.

Обработанные ацетоном клетки заливают метанолом из расчета 0,5 л метанола на 50 г клеток и помещают на шуттель-аппарат в термостат при 37°C, осуществляя встряхивание реакционной смеси в течение 5 ч. Осадок отделяют центрифугированием при факторе разделения $F = 1500$ в течение 20 мин, после чего производят повторное экстрагирование метанолом при тех же условиях.

Метаноловые экстракты первого и второго извлечений объединяют и выпаривают в вакуум-сушильном шкафу при 0,7 кгс/см² и 50°C в течение 5 ч. За это время происходит упаривание раствора до 1/3 от первоначального объема, что достаточно

для выпадения осадка фосфатидного антигена без соосаждения примесей.

Осадок фосфатидного антигена отделяют центрифугированием при указанном режиме, затем промывают ацетоном при 40°C, вновь центрифугируют и растворяют в хлороформе из расчета на один объем использованного метанола 0,1 объема хлороформа. К хлороформенному раствору фосфатидного антигена добавляют двойной объем предварительно охлажденного до +4°C ацетона. Выпавший осадок фосфатидного антигена отделяют центрифугированием при том же режиме, промывают 3 раза ацетоном и высушивают в вакуум-эксикаторе при комнатной температуре в течение 48 ч. Выход сухого фосфатидного антигена составляет 2-2,5 г из 50 г микробных клеток.

Фосфатидный антиген расфасовывают в ампулы по 10 мг и запаивают последние под азотом. Установлено, что в таком виде фосфатидный антиген может храниться 5 лет.

Для сенсibilизации формализированных эритроцитов барана взятую из ампулы навеску фосфатидного антигена 6,0 мг растворяют в 3,0 мл метанола. Этот раствор добавляют по каплям к 12 мл 0,85%-ного изотонического раствора хлористого натрия, после чего производят выпаривание метанола на магнитной мешалке при 50°C до первоначального объема физраствора (т.е. до 12 мл).

Полученные 12 мл фосфатидной эмульсии соединяют с 12 мл 10%-ных формализированных эритроцитов при постоянном перемешивании. При этом концентрация фосфатидного антигена составляет 0,5 мг на 1 мл 10%-ных формализированных эритроцитов (барана). Приготовленную смесь выдерживают 1 ч в водяной бане при 37°C и при постоянном перемешивании. Затем производят центрифугирование взвеси при факторе разделения $F = 2000$, после чего осадок дважды отмывают от избытка антигена физраствором pH 7,0-7,2.

Из осадка отмытых сенсibilизированных эритроцитов приготавливают 10%-ную взвесь добавлением 12 мл защитной среды следующего состава:

Мясопептонный бульон,	
об. %	25
Сахароза, вес. %	5
Боратно-янтарный буфер	Остальное

Полученный жидкий препарат эритроцитарного туберкулезного диагностикума разливают по 1,0 мл в ампулы и замораживают до -70°C, после чего препарат лиофилизируют.

При указанном соотношении ингредиентов получают 12 ампул сухого

эритроцитарного туберкулезного диагностикума с титром в РНГА с иммунной кроличьей сывороткой 1:128.

Впервые в мировой практике получен эритроцитарный туберкулезный диагностикум. Поскольку в настоящее время в клинической практике для ди-

агностики туберкулеза применяют, как правило, туберкулин, наиболее принципиальным является сравнение эффективности использования полученного препарата с туберкулином. Данные для сравнительного анализа приведены в табл. 3.

Т а б л и ц а 3

Результаты серологических реакций по основным группам обследования

Группы обследованных	РНГА с применением эритроцитарного туб.диagnostикума			РНГА с применением туберкулина		
	Обследовано человек	Положительная реакция, %	Доверительный интервал	Обследовано человек	Положительная реакция, %	Доверительный интервал
Больные активным туберкулезом легких	211	68,72	61,99-74,91	658	58,66	54,79-62,45
Больные с затихающим туберкулезом легких	31	32,26	16,68-51,37	176	53,41	45,75-60,95
Нетуберкулезные больные	55	10,91	4,11-22,24	160	8,12	4,39-13,49
Здоровые люди	89	12,36	6,33-21,03	112	11,60	6,32-19,03

Как видно из табл. 3, всего обследовано с применением получаемого предлагаемого способом препарата 386 чел., а с применением туберкулина 1106 чел. При этом РНГА с туберкулином ставили по методу Бойдена. Среди обследованных больных туберкулезом легких преобладали наиболее трудно диагностируемые клинические формы: диссеминированный, инфильтративный и очаговый туберкулез. Среди нетуберкулезных больных преобладали больные с пневмониями, которые имеют дифференциальное значение при диагностике туберкулеза легких.

Математическую обработку данных таблицы производили на ЭЦВМ "Минск-

22". Достоверность различия в сопоставляемых группах обследованных не ниже 5%-ного уровня значимости. В то же время обнаружение антифосфатидных антител (что возможно с применением нового препарата) соответственно в основном активному туберкулезному процессу, в чем и состоит преимущество получаемого диагностикума перед туберкулином.

Эритроцитарный туберкулезный диагностикум применяют в РНГА, тогда как препарат, получаемый известным способом, используют в реакции каолиновой агглютинации. Соответствующие данные приведены в табл. 4.

Т а б л и ц а 4

Диагностика туберкулеза постановкой РНГА с эритроцитарным диагностикумом и РКА по методу Такахаши

Группы обследованных	Положительная реакция, %	
	РНГА	РКА
Больные активным туберкулезом легких	68,7	70,2
Больные с затихающим туберкулезом легких	36,8	36,9
Нетуберкулезные больные	10,9	24,2

Как видно из табл. 4, при близкой вероятности диагностирования туберкулезной инфекции полученный препарат более чем в 2 раза реже дает положительную реакцию при обследовании больных с нетуберкулезными заболеваниями.

В табл. 5 представлены сведения об активности получаемого предлагаемым способом промежуточного продук-

та - фосфатидного антигена. Об активности фосфатидного антигена можно судить по содержанию фосфора в препарате выделенного антигена. Содержание фосфора в полученном антигене определяли по методу Чена.

В табл. 5 приведено содержание фосфора в препаратах фосфатидного антигена, полученного известным и предлагаемым способами.

Т а б л и ц а 5

Содержание антигена, %		
Предлагаемый способ		Прототип
Результаты отдельных испытаний	Среднее значение	
2,7, 2,9, 2,7, 2,8, 2,8, 2,9, 3,0, 3,25 3,0	2,88	2,2

Как видно из табл. 5, содержание фосфора в фосфатидном антигене увеличилось по сравнению с прототипом на 24%.

Использование предлагаемого способа позволит организовать безотходную технологию получения препаратов микобактерий туберкулеза. Промежуточный продукт (фосфатидный антиген) получают из микробной массы микобактерий туберкулеза, считавшейся ранее отходом производства туберкулина, поскольку туберкулин

выделяют из соответствующей культуральной жидкости. Реальность осуществления безотходной технологии подтверждается тем, что эритроцитарный туберкулезный диагностикум намечено выпускать на предприятии по производству бакпрепаратов Ленинградского НИИ вакцин и сывороток, которое является также и основным производителем туберкулина.

Срок хранения предлагаемого препарата достигает трех лет, тогда как известный хранится лишь 1 год.