

УДК 619:616.982.211-078

А.П. ЛЫСЕНКО, заведующий отделом туберкулеза и лейкоза
БелНИИЭВ им.С.Н.Вышелесского, доктор ветеринарных наук;

В.М. БЕЗГИН, главный инженер Курской биофабрики, доктор ветеринарных наук;

В.Е.КОЗЛОВ, зам. директора Курской биофабрики, кандидат биологических наук;

А.Н.ПРИТЫЧЕНКО, ассистент кафедры микробиологии и вирусологии
Витебской госакадемии ветеринарной медицины

ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОАКТИВНОГО И СПЕЦИФИЧНОГО АЛЛЕРГЕНА ДЛЯ МАССОВОЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА С ПОМОЩЬЮ УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИИ

Повышение точности массовой диагностики туберкулеза крупного рогатого скота путем совершенствования туберкулинов, несмотря на прогресс в области очистки видоспецифических компонентов *M. bovis*, остается актуальной задачей (Fiffis et al., 1989, 1994).

Выделение отдельных антигенов связано с многоэтапным фракционированием по размеру молекул, заряду или их биологической специфичности, при этом выход целевых продуктов невелик. Поэтому интерес представляют методы, обеспечивающие разделение больших объемов исходного материала в количествах, достаточных для массовой диагностики туберкулеза. В первую очередь это касается ультрафильтрации.

Цель исследований — изучение специфической активности и диагностических свойств фракций автоклавированного культурального фильтрата *M. bovis*, полученных на колонках с полыми волокнами (300 кДа, 15 кДа,) и мембранах Millipore, задерживающих молекулы с массой 100 кДа.

Материалы и методы. Производственный штамм *Mycobacterium bovis* №8 выращивали 8 недель на среде Курской биофабрики при 37°C и автоклавировали 30 мин. при 120°C. Бакмассу удаляли, культуральную жидкость подвергали ультрафильтрации на колонке с полыми волокнами, задерживающими молекулы массой 300 кДа и более. Фильтрат концентрировали, затем подвергали диафильтрации (Д) на колонках с пределом задержания 15 кДа. Часть культуральной жидкости фильтровали на установке Minitan 2S с мембранами, задерживающими молекулы 100 кДа и более, а затем концентрировали на мембране (10 кДа).

В результате были получены: ретентаты Р300, Р100, Р300-15, Р300-15Д (фракции, задерживаемые использованными фильтрами) и фильтраты Ф300, Ф100, Ф10.

Содержание белка в препаратах определяли осаждением трихлоруксусной кислотой и фотокolorиметрией суспензии при 540 нм в сравнении со стандартами, изготовленными из сухого ППД туберкулина.

Содержание полисахаридов определяли смешиванием 1 мл исследуемой пробы, 1мл 5%-го фенола и 5 мл концентрированной серной кислоты с последующей инкубацией при 30°C и colorиметрией при 540 нм. Концентрацию полисахаридов определяли по калибровочной кривой, построенной по результатам замеров известного количества смеси глюкозы и сахарозы в соотношении 1:1.

Суммарную серологическую специфичность и перекрестную реактивность фракций определяли в ИФА с бычьими антисыворотками к комплексу негетерых антигенов *M. bovis* Vallee и к смеси антигенов атипичных микобактерий I—IV группы по Раньону (А.П.Лысенко, 1994).

Непрямой вариант ИФА ставили на панелях Sarstedt, сенсibiliзируя лунки исходным препаратом и фракциями (1—5 мкг белка на лунку). Антисыворотки разводили 1:100 — 1:2560, комплекс антиген-антитело выявляли пероксидазным конъюгатом анти-IgG быка (Sigma). Оптическую плотность (ОП) замеряли при 492 нм. При интерпретации результатов ИФА и сравнении препаратов, как правило, использовали данные, полученные на одной панели.

Аллергическую активность и специфичность фракций определяли на 20 морских свинках, сенсibiliзированных вакциной БЦЖ (0,5 мг в/к), 12 морских свинках, зараженных подкожно смесью атипичных микобактерий II—IV группы по Раньону (1 мг).

В качестве контроля морским свинкам вводили стандартный раствор ППД туберкулина для млекопитающих Курской биофабрики серии 29 в дозе 25 МЕ в 0,1 мл, а культуральный фильтрат и исследуемые фракции — в эквивалентной по белку дозе.

Активность ППД туберкулина для млекопитающих и Ф300-15 определили на 532 головах коров неблагополучного по туберкулезу и на 43 коровах благополучного по туберкулезу стада, инфицированного атипичными микобактериями. Стандартный раствор ППД туберкулина вводили в дозе 10000МЕ., Ф300-15 — 0,58 мг/мл.

Результаты исследований. В таблицах 1—3 представлены результаты исследования препаратов в ИФА. Как видно из таблицы 1, наибольшей специфической активностью обладал ППД туберкулин для млекопитающих Курской биофабрики. Несколько меньшие показатели были у культурального фильтрата и его фракций Р100 и Ф100. Низкомолекулярная фракция Ф10 имела достоверно меньшую специфическую активность.

Индекс перекрестной активности свидетельствовал, что на отдельных стадиях ультрафильтрации концентрация общеродовых антигенов снижалась, а в целом у Р100 и Ф100 она была ниже, чем у ППД туберкулина.

Таблица 1

Индекс специфической и перекрестной активности культурального фильтрата и его фракций, полученных на мембранах Millipore

Препараты	Индекс специфической активности	Показатель перекрестной активности
ППД туберкулин	1,6	4,0
Культуральный фильтрат	1,3	4,2
Р100	1,3	3,1
Ф100	1,3	3,4
Ф10	1,1	2,2

■ индекс специфической активности — отношение средней ОП фракции с антисывороткой *M. bovis* к средней ОП с антисывороткой к смеси антигенов атипичных микобактерий;

■ индекс перекрестной активности — среднее превышение ОП фракции с антисывороткой к смеси антигенов атипичных микобактерий в сравнении с ОП фракции с нормальной сывороткой

Из таблицы 2 видно, что ППД туберкулин был специфичнее исходного культурального фильтрата.

Таблица 2

Индекс специфической и перекрестной активности культурального фильтрата и его фракций, полученных на колонках с полыми волокнами

Препараты	Индекс специфической активности	Показатель перекрестной активности
ППД туберкулин	3,4	4,4
Культуральный фильтрат	2,7	6,5
Р300	1,6*	9,1*
Ф300	2,6	4,9

* — различия статистически достоверны;

Самая низкая специфичность отмечена у фракции Р 300. Фильтрат (Ф300) достоверно не превосходил по специфической активности исходный культуральный фильтрат и ППД туберкулин, но отделение в процессе ультрафильтрации высокомолекулярной фракции Р300 приводило к тому, что концентрация, перекрестие реагирующих компонентов в Ф300 и ее перекрестная активность была ниже, чем исходного культурального фильтрата. То, что при этом не повышалась специфическая активность Ф300, по-видимому, связано с удалением части высокоактивных высокомолекулярных компонентов.

Таким образом, проведенные исследования показали целесообразность удаления из культурального фильтрата фракции с молекулярной массой более 300 кДа.

Данные таблицы 3 характеризуют влияние диафильтрации на специфическую активность и концентрацию, перекрестие реагирующих компонентов в изучаемых препаратах.

Таблица 3

Влияние диафильтрации на показатели перекрестной и специфической активности ультрафильтрационных фракций

Препараты	Индекс специфической активности	Показатель перекрестной активности
ППД туберкулин	1,39	2,88
Культуральный фильтрат	1,38	2,93
Ф300-15	1,23	2,83
Ф300-15 (Диафильтрация)	1,27	2,17

Как видно из таблицы 3, диафильтрация повышала специфическую активность Ф300-15 и вела к достоверному снижению концентрации перекрестно реагирующих компонентов. В известной степени это можно объяснить относительным снижением содержания полисахаридов после диафильтрации (рис. 1). Как видно из рис. 1, наибольшее содержание полисахаридов найдено во фракции Р300. В Ф300-15 было меньше полисахаридов, чем в исходном культуральном фильтрате, и значительно меньше их обнаружено в Ф300-15Д, которая по этому показателю достоверно не отличалась от препаратов ППД туберкулина.

Результаты испытания аллергической активности и специфичности фракций, полученных на мембранах Millipore с пределами задержания 100 и 10 кДа, представлены в таб-

лице 4.

Таблица 4

Аллергическая активность и специфичность фракций в кожной пробе на морских свинках

Диаметры эритемы в мм

Вид микобактерий	ППД туберкулин	Культуральный фильтрат	Р100	Ф100	Р10
БЦЖ	10,4±0,4	9,3±1,1	8,9±0,7	7,7±0,7	6,6±0,5
I-IV	6,4±0,4	7,1±0,5	6,8±0,5	5,7±0,5	5,2±0,5

Как видно из таблицы 4 у морских свинок, сенсibilизированных микобактериями бычьего вида активность ППД туберкулина, культурального фильтрата, Р100, достоверно не различалась. Активность Ф100 и Р10 была заметно ниже.

Уровень перекрестных реакций был выше у нефракционированных препаратов. Он снижался по мере уменьшения молекулярной массы фракций, но это коррелировало и со снижением активности на животных, сенсibilизированных *M. bovis*.

Результаты испытания аллергической активности и специфичности фракций, полученных на колонках с полыми волокнами с пределами задержания 300 и 15 кДа, представлены в таблице 5.

Таблица 5

Аллергическая активность и специфичность фракций в кожной пробе на морских свинках

Диаметры эритемы в мм

Вид микобактерий	ППД туберкулин	Культуральный фильтрат	Р300	Ф300-15
БЦЖ	10,1±0,6	13,4±0,64	8,2±0,79	12,1±1,16
I-IV	4,7±0,77	6,9±1,05	5,2±0,65	5,5±0,5
Различия в интенсивности	5,4	6,5	3,0	6,6

Как видно из таблицы 5, наименьший уровень перекрестных реакций отмечен у ППД туберкулина и Р300, однако наибольшая разница в интенсивности реакций была у Ф300-15.

На рисунке 2 представлено распределение реакций на ППД туберкулин и Ф300-15 в неблагополучном стаде. Как видно, основная масса животных (13 из 18) давала более интенсивные реакции на Ф300-15.

На рисунке 3 представлено распределение интенсивности реакций у крупного рогатого скота, инфицированного атипичными микобактериями. В 5 случаях более интенсивные реакции были на ППД туберкулин, в 3 — на Ф300-15, у семи коров реакции были одинаковыми.

Полученные данные указывают на большую активность Ф300-15 в неблагополучном стаде и примерно одинаковую специфичность у сравниваемых препаратов при инфицировании атипичными микобактериями.

В целом проведенные исследования показали, что с помощью ультрафильтрации удается получить более активный аллерген, чем ППД туберкулин, очищенный преципитацией трихлоруксусной кислотой (ТХУ) и сульфатом аммония (СА) и не уступающий туберкулину по видовой специфичности. По всей вероятности, указанный эффект достигался за счет исключения денатурации и агрегации молекул при осаждении ТХУ и СА.

ВЫВОДЫ

1. Ультрафильтрация с использованием колонок с полыми волокнами или мембран, задерживающих молекулы размером более 300 кДа и менее 10–15 кДа пригодна для получения препаратов для аллергической диагностики туберкулеза.

При использовании мембран, задерживающих молекулы размером 100 кДа и более, происходит потеря части активных и достаточно специфичных компонентов.

2. Удаление с помощью ультрафильтрации из автоклавированного фильтрата возбудителя туберкулеза фракций с размерами молекул более 300 кДа и менее 15 кДа позволяет получить препарат, превосходящий ППД туберкулин по активности и не уступающий ему по видовой специфичности.

3. Уровень перекрестных реакций у препаратов кор-

релирует с содержанием полисахаридов, в том числе и низкомолекулярных.

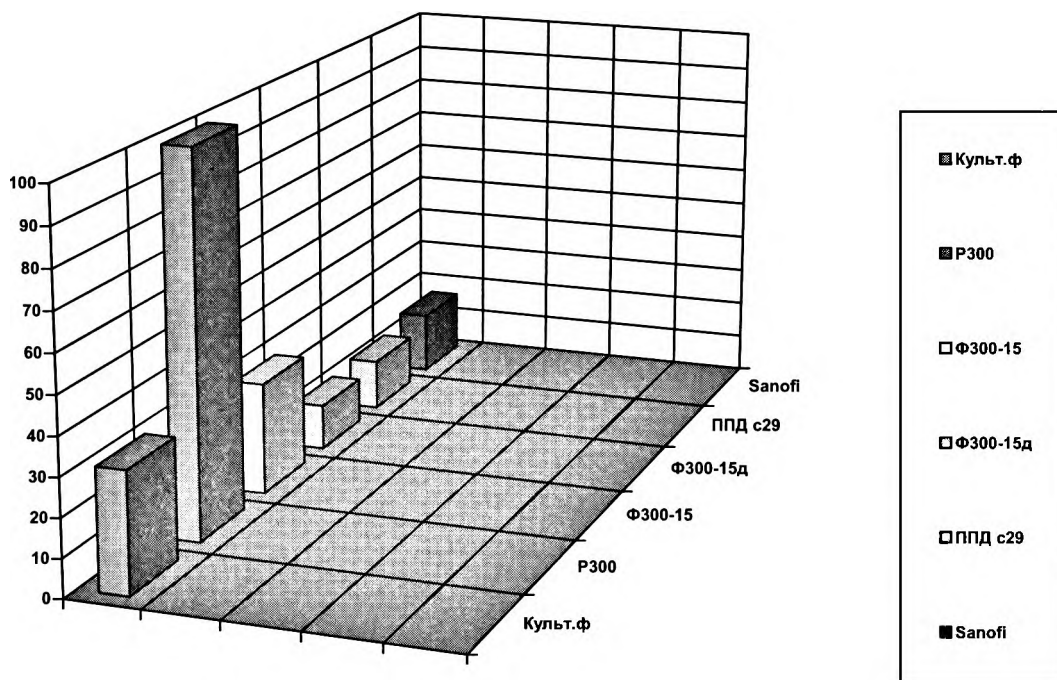
4. С помощью ИФА и антисывороток крупного рогатого скота к негретым антигенам *M. bovis* можно получить объективную характеристику специфичности микобактериального аллергена.

ЛИТЕРАТУРА

1. Fiffis T, Plackett P., Comer L., Wood P. Purification of major *M. bovis* antigens for the diagnosis of bovine tuberculosis // *Scand. J. Immunol.* -1989. -1.-P.91-101.

2. Fiffis T, Rothel J., Wood P. Soluble *M. bovis* protein antigens: studies on their purification and immunological evaluation // *Vet. Microbiol.* -1994. -40(1-2).-p.65-81.

Рисунок 1. Относительное содержание полисахаридов в препаратах ППД туберкулина, культуральном фильтрате и его ультрафильтрационных фракциях



Рисунки 2 и 3. Распределение реакций на ППД туберкулин и Ф300-15 в неблагополучном стаде (рис. 2) и в благополучном стаде при инфицировании атипичными микобактериями (рис. 3)

