

## ЭФФЕКТИВНОСТЬ УЛЬТРАФИЛЬТРАЦИИ ДЛЯ РАЗДЕЛЕНИЯ АНТИГЕНОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЕЗА

В последние десятилетия существенно расширились знания об индивидуальных антигенах возбудителей туберкулеза. В очищенном виде получено более 30 антигенов, среди которых обнаружены, в частности, такие высокоспецифичные компоненты, как MPB 70 (Nagai et al., 1981, Fiffis et al., 1991, 1994). Тем не менее повышение точности диагностики туберкулеза продолжает оставаться актуальной задачей фтизиологии. Основные препараты для массовой диагностики болезни были разработаны 40-60 лет назад. Причем рост специфичности диагностики достигался преимущественно оптимизацией условий применения диагностикумов (А.Н. Шаров, 1989; Monaghan et al. 1991).

Выделение индивидуальных антигенов обычно связано с многоступенным фракционированием по размеру молекул и их заряду, или одноэтапной очисткой методом аффинной хроматографии. В обоих случаях выход очищенных антигенов не велик. Поэтому значительный интерес представляют методы разделения макромолекул, обеспечивающие фракционирование больших объемов исходного материала. В первую очередь это касается ультрафильтрации.

Целью исследований явилось изучение эффективности фракционирования негетерогенного и автоклавированного культурального фильтрата *M. bovis* на мембранах Millipore, задерживающих молекулы с массой 10, 30, 100 кДа.

**Материалы и методы.** Культуру производственного штамма *Mycobacterium bovis* 8 выращивали 8 недель на среде Сотона при 37° С. Часть посевов инактивировали фенолом (3%), часть автоклавировали 30 мин при 120°С. Для удаления бакмассы культуральную жидкость фильтровали через

бумажный фильтр и пластины “Владипор”. Негретый и автоклавированный фильтрат подвергали последовательной ультрафильтрации на установке Minitan 11S с мембранами, обеспечивающими задерживание молекул 100, 30 и 10 кДа.

На мембране 100 кДа собирали задерживаемую фракцию (ретентат, Р100) и фильтрат (Ф100). Часть фильтрата Ф100 подвергали ультрафильтрации на мембране 30 кДа, собирая ретентат 30 (Р30) и фильтрат 30 (Ф30). Из части Ф30 на мембране 10 кДа получены фракции Р10 и Ф10.

Содержание белка во фракциях определяли путем осаждения 20%-ным раствором трихлоруксусной кислоты и фотокolorиметрией смеси при 560 нм в сравнении со стандартами, изготовленными из сухого ППД туберкулина.

Антигенную нагрузку фракций изучали в ракетном иммуноэлектрофорезе (РИЭФ) с бычьей референс-антисывороткой к комплексу негретых антигенов *M.bovis* Vallee (А.П. Лысенко, 1994).

Специфическую и перекрестную активность фракций определяли в непрямом варианте ИФА на панелях Sarstedt, сенсibilизированных исходным препаратом и фракциями (1-5 мкг белка на лунку). Антисыворотки к комплексу негретых антигенов *M.bovis* Vallee и к смеси антигенов атипичных микобактерий I-IV группы по Раньону использовали в разведениях 1:100–1:12800. Комплекс антиген-антитело выявляли пероксидазным конъюгатом анти-IgG быка (Sigma). В качестве контроля в ИФА применяли ППД туберкулин для млекопитающих Курской биофабрики.

Аллергическую активность и специфичность фракций определяли на 12 морских свинках, сенсibilизированных вакциной БЦЖ (0,5 мг в/к) и 10 морских свинках, зараженных подкожно смесью атипичных микобактерий II-IV группы по Раньону. Пять интактных животных служили контролем.

В качестве контроля животным вводили стандартный раствор ППД туберкулина для млекопитающих Курской биофабрики серии 29 (25МЕ в 0,1 мл), а исследуемые фракции - в дозе, эквивалентной по белку 25 МЕ.

**Результаты исследований.** Результаты изучения антигенного состава в РИЭФ негретого и автоклавированного культурального фильтрата и их фракций, полученных с помощью ультрафильтрации, показали, что негретый препарат образовывал до 15 четких преципитатов, которые в разной степени были представлены в Р100, Ф100 и Р30. В составе Ф30 в незначительной концентрации обнаружены только 2 антигена, Ф10 преципитатов не формировал.

Автоклавированный культуральный фильтрат при анализе в РИЭФ образовывал до 3 диффузных преципитатов. В Р100 достаточно четко был выражен преципитат, охватывающий лунку и характерный для липополисахаридных компонентов клеточной стенки. В Ф100 просматривались 2 преципитата, которые были хорошо выражены в Р30. Ф30 и Ф10 преципитатов практически не давали.

Таблица 1. Индекс специфической активности в ИФА негретого фильтрата и его фракций

Разведение а/с	ППД туберкулин Курской биофабрики	Негретый культуральный фильтрат	Р100	Ф100	Р30	Ф30	Р10
1:200	1,3	1,2	1,0	1,2	1,3	1,7	1,3
1:400	1,5	1,6	1,3	1,5	1,4	2,6	1,7
1:800	1,5	2,0	1,6	1,6	1,8	3,6	-
1:1600	1,2	2,6	2,2	2,7	2,2	2,2	-
1:3200	1,4	3,8	3,2	4,0	3,2	2,3	-
1:6400	1,4	5,1	3,8	4,4	3,5	2,1	-
1:12800	1,2	4,2	8,2	5,4	4,1	1,7	-
M+m	1.4± 0,1	2.9± 0,6	3.0± 0,8	3.0± 0,7	2.5± 0,5	2.3± 0,2	1.5± 0,3

При исследовании исходных препаратов и их фракций в ИФА определили средний индекс специфической активности (отношение оптической плотности в лунках с антисывороткой к *M.bovis* такому показателю в лунках с антисывороткой к смеси антигенов атипичных микобактерий).

Как видно из табл. 1, негретый культуральный фильтрат и его фракции оказались более активными, специфичными, чем ППД туберкулин. Фракции P100 и Ф100 незначительно превышали исходный препарат по специфической активности. В реакции с невысокими разведениями антисывороток наибольшую специфичность показала фракция Ф30, у которой перекрестные реакции наблюдались только до разведения 1:1600.

Результаты испытания автоклавированного культурального фильтрата и его фракций в ИФА представлены в табл. 2.

Таблица 2. Индекс специфической активности в ИФА автоклавированного фильтрата и его фракций

Разведение а/с	ППД	Культ. фильтр	P100	Ф100	P30	Ф30	P10
1:200	1.1	1.1	1.1	1.2	1.0	1.1	1.2
1:400	1.3	1.2	1.2	1.2	1.1	1.1	1.2
1:800	1.5	1.3	1.3	1.5	1.3	1.1	1.3
1:1600	1.4	2.0	1.4	1.5	1.4	1.3	2.0
1:3200	1.8	1.5	1.4	1.6	1.5	1.2	1.0
1:6400	1.9	1.5	1.4	1.4	1.6	1.1	1.0
1:12800	2.0	1.7	1.3	1.2	1.3	1.2	1.0
M±m	1.6± 0,14	1.5± 0,1	1.3± 0,04	1.4± 0,1	1.3± 0,1	1.2± 0,03	1.2± 0,1

Как видно из табл. 2, по суммарной специфической активности ни одна из полученных фракций не превосходила исходный культуральный фильтрат и ППД туберкулин.

Результаты испытания аллергической активности и специфичности фракций на морских свинках представлены в табл. 3.

Таблица 3. Аллергическая активность фракций культурального фильтрата *M.bovis*.  
Диаметры эритемы в мм через 24 ч. после введения:

Вид микро-бактерий	ППД-туберкулин	Культуральный фильтрат	P100	Ф100	P30	Ф30	P10
БЦЖ	10,4 ±0,4	<u>9,4±0,4</u> 9,3±1,1	<u>8,8±0,4</u> 8,9±0,7	<u>9,5±0,4</u> 7,7±0,7	<u>8,2±0,7</u> 6,0±0,3	<u>6,9±0,6</u> 8,6±1,1	— 6,6 ±0,5
I-IV	6,4 ±0,4	<u>8,2±0,6</u> 7,1±0,5	<u>7,4±0,5</u> 6,8±0,5	<u>6,6±0,7</u> 5,7±0,5	<u>5,6±0,5</u> 6,4±0,5	<u>5,1±0,3</u> 5,2±0,4	— 5,2 ±0,5

Примечание. Числитель – негретый культуральный фильтрат и его фракции; знаменатель - автоклавированный культуральный фильтрат и его фракции.

Как видно из табл. 3, у морских свинок, сенсibilизированных микобактериями бычьего вида, аллергическая активность негретых фракций P100, Ф100, P30 достоверно не отличалась от исходного препарата, а у Ф30 она была достоверно ниже. Фракции с массой менее 10 кДа не обладали заметной аллергической активностью.

Несколько другая закономерность распределения активности была у фракций автоклавированного препарата, у которых относительно низкий показатель отмечен у Ф100 и P30 и более высокий у – Ф30.

Перекрестная аллергическая активность снижалась с уменьшением размеров молекул, и лучшие показатели различия интенсивности реакций получены у Ф30 гретого препарата.

**Обсуждение результатов.** Результаты РИЭФ негретых препаратов достаточно четко показали, что при ультрафильтрации с использованием мембран, задерживающих молекулы с массой 100 кДа, достаточно четкого разделения не происходит. В P100 и Ф100 набор и концентрация антигенов практически не отличались от исходного препарата.

Заметный эффект был установлен при использовании мембран с пределом задержания 30 кДа. В Р30 отмечена более высокая концентрация отдельных антигенов и наличие компонентов, не встречающихся в высокомолекулярных фракциях. Необходимо отметить, что указанный ультрафильтр задерживал основную массу антигенов, за исключением двух, по-видимому, обладающих высокой видовой специфичностью.

Результаты ИФА коррелировали с данными РИЭФ. Так, фракции Р100 и Ф100 с близким антигенным составом имели примерно одинаковый средний показатель специфической активности.

Наименьшей перекрестной активностью обладала Ф30, имевшая спектр из 2 антигенов. По-видимому, один из них можно было отнести к МРВ 70 (Harboe et al., 1991) или антигену 15 (А.П.Лысенко, 1994), так как масса этого антигена 24 кДа и он отличался высокой видовой специфичностью. Тем не менее основная часть этого антигена все же задерживалась фильтром, вероятно, из-за возможного образования агрегатов. Наблюдалась определенная закономерность между молекулярной массой и антигенным спектром фракций. Так, чем больше была молекулярная масса фракций, тем выше была их активность с большими разведениями сывороток. Низкомолекулярные Р10 и Ф10 практически не обладали серологической активностью. Чем уже был антигенный спектр, тем меньшей активностью в ИФА обладал препарат.

Сопоставление данных табл. 1 и 2 показывает, что специфическая активность негретого культурального фильтрата и его фракций была в 2-2,5 раза выше, чем у ППД туберкулина и автоклавированных препаратов. По всей вероятности, это связано с тем, что антитела преимущественно распознают конформационные эпитопы, разрушающиеся в процессе автоклавирования. Результаты ИФА негретых и автоклавированных препаратов не коррелировали, по-видимому, из-за значительной деструкции молекул большой массы и образования мелких пептидов, проходивших через мембраны. Тем не менее с помощью выбранных диапазонов ультрафильтрации удалось

получить фракцию автоклавированного культурального фильтрата с массой молекул 10-30 кДа, обладающую достаточно высокой аллергической активностью у животных, сенсибилизированных возбудителем туберкулеза, но дающую минимальные перекрестные реакции у морских свинок, зараженных атипичными микобактериями. Эти результаты подтверждают данные Moulton, Dietz, Marcus (1972), выделившие с помощью гель-фильтрации фракцию ППД туберкулина с массой 40-10 кДа, не дававшую перекрестных реакций у морских свинок, сенсибилизированных атипичными микобактериями.

### Выводы

1. Ультрафильтрацию на мембранах с пределом задержания 100 кДа можно использовать для концентрирования высокоактивных в серологических реакциях антигенов возбудителя туберкулеза.

2. Мембрана с пределом задержания 30 кДа позволяет выделить фракцию, дающую в серологических и аллергических тестах минимальную перекрестную активность.

3. Фракция с массой менее 10 кДа не обладает заметной серологической и аллергической активностью.

4. Автоклавирование ухудшает возможности фракционирования, резко снижает серологическую активность и специфичность антигенов возбудителя туберкулеза, но существенно не влияет на эти показатели в аллергической пробе.

### Литература

1. Nagai S., Matsumoto G., Nagasuga T. Specific skin-reactive protein from culture filtrate of *M. bovis* BCG // *Infect. Immun.* - 1981. - 31. - P. 1152-1160.

2. Fiffis T., Costopoulos C., Radford A. Bacic A., Wood P. Purification and characterisation of major antigens from *M. bovis* culture filtrate // *Infect. Immun.* - 1991. - 59. - P. 800-807.

3. Шаров А.Н. Аллергическая диагностика туберкулеза у животных: повышение ее эффективности // Автореферат дис... докт. Вет. наук. - М., 1989. - 37 с.

4. Monaghan M. et al. / *Vet. Microbiol.* - 1994. - 40. - P. 111-124.

5. Лысенко А.П. Антигены *Mycobacterium bovis* и атипичных микобактерий, изучение и применение для дифференциальной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота // Автореф. дисс. доктора вет. наук.-Мн., 1994.- 35 с.

### **Резюме**

Исследованы возможности фракционирования негретых и автоклавированных антигенов культурального фильтрата *M.bovis* 8 с помощью ультрафильтрации на мембранах с пределом задержания 100 кДа, 30 кДа и 10 кДа. Установлено, что ультрафильтрацию на мембранах с пределом задержания 100 кДа можно использовать для концентрирования высокоактивных в серологических реакциях антигенов возбудителя туберкулеза. Мембрана с пределом задержания 30 кДа позволяет выделить фракцию (фильтрат), дающую в серологических и аллергических тестах минимальную перекрестную активность. Фракция с массой менее 10 кДа не обладает заметной серологической и аллергической активностью. Автоклавирование ухудшает возможности фракционирования и резко снижает серологическую активность и специфичность антигенов возбудителя туберкулеза, но существенно не влияет на эти показатели в аллергической пробе.

### **Summary**

A.P.Lysenko, A.N.Pritychenko

### **Efficiency of ultrafiltration for separation of antigens of tuberculosis pathogene**

It was found that ultrafiltration on membranes with a limit of retention 100 kDa can be used for concentration of tuberculosis pathogene antigens that are high active in serological tests. A membrane with a limit of retention 30 kDa permits to isolate a fraction (a filtrate) that shows a minimal cross-activity in serological and allergic tests. A fraction with a mass <10 kDa hasn't an appreciable serological and allergic activity. The autoclaving deteriorates possibilities of fractionation and decreases sharply serological activity and specificity of tuberculosis pathogene antigens, but doesn't significantly influence these indices in an allergic test.