

АКТИВНОСТЬ И СПЕЦИФИЧНОСТЬ ТУБЕРКУЛИНОВ, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ БАКТЕРИАЛЬНОЙ МАССЫ ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ШТАММА ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЁЗА БЫЧЬЕГО ВИДА

А. Н. ПРИТЫЧЕНКО

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелеского»,
г. Минск, Республика Беларусь, 220063, e-mail: bievmvitebsk@gmail.com

(Поступила в редакцию 16.08.2021)

*В современных условиях туберкулёз встречается во всех странах мира. В Беларуси по туберкулёзу человека наблюдается положительная динамика, а у животных сохраняется устойчивое благополучие, которое достигается плановыми исследованиями крупного рогатого скота в аллергической пробе с туберкулином, очищенным для млекопитающих. В нашей стране выпуск препарата налажен на ОАО «БелВитунифарм», мощности которого позволяют удовлетворить потребности внутреннего и внешнего рынка. Основными показателями качества туберкулинов является активность и специфичность, которые строго контролируются при производстве препарата. Повышение активности и специфичности туберкулинов посредством включения слабосекретирующихся (ССА) туберкулопротеинов, является актуальной задачей. Сравнение активности и специфичности туберкулопротеинов из экстракта бакмассы, очищенных ТХУ с контрольной серией туберкулина очищенного для млекопитающих показало большую (на 25,5 %) активность и специфичность (на 8,8 %) препаратов, приготовленных из бактериальной массы. При оценке активности комбинированного туберкулина на морских свинках, заражённых *Mycobacterium bovis* BCG уровень перекрёстных реакций у испытуемого туберкулина был на 9,1 % ниже, чем у туберкулина очищенного для млекопитающих контрольной серии. Оценка содержания полисахаридов в трионовых экстрактах относительно их концентрации в стандартном растворе ППД туберкулина (0,83 мг/мл) показала, что при экстракции туберкулопротеинов в 0,63 % растворе тритона X100 получили более чистый продукт (содержание полисахаридов в 2,78 раза меньше, чем в стандартном растворе ППД туберкулина). Наши исследования подтверждают целесообразность компенсации туберкулопротеинов из бактериальной массы производственного штамма *Mycobacterium bovis* на 30–40 %, что позволит в эквиваленте снизить производственные затраты. Целесообразно для конструирования препарата использовать туберкулопротеины, очищенные из экстрактов бакмассы осаждением ТХУ.*

Ключевые слова: туберкулин, аллергическая диагностика, туберкулёз крупного рогатого скота, активность и специфичность туберкулинов.

*In modern conditions, tuberculosis occurs in all countries of the world. In Belarus, a positive trend is observed for human tuberculosis, and animals maintain a stable well-being, which is achieved by routine studies of cattle in an allergic test with purified tuberculin for mammals. In our country, the production of the drug has been established at BelVitinipharm OJSC, whose capacities allow satisfying the needs of the domestic and foreign markets. The main indicators of the quality of tuberculins are activity and specificity, which are strictly controlled during the manufacture of the drug. Increasing the activity and specificity of tuberculins through the inclusion of low-secreting tuberculo-proteins is an urgent task. Comparison of the activity and specificity of tuberculo-proteins, obtained from the bacterial extract and purified by TCA, with the control series of tuberculin purified for mammals showed a greater (by 25.5 %) activity and specificity (by 8.8 %) of drugs prepared from the bacterial mass. When assessing the activity of combined tuberculin in guinea pigs infected with *Mycobacterium bovis* BCG, the level of cross-reactions in the tested tuberculin was 9.1 % lower than that of purified tuberculin for mammals of the control series. Evaluation of the content of polysaccharides in triton extracts relative to their concentration in a standard solution of PPD tuberculin (0.83 mg / ml) showed that when extracting tuberculo-proteins in a 0.63 % solution of Triton X100, a purer product was obtained (the content of polysaccharides is 2.78 times less, than in a standard solution of PPD tuberculin). Our studies confirm the feasibility of compensating tuberculo-proteins from the bacterial mass of the production strain of *Mycobacterium bovis* by 30–40 %, which will reduce production costs in equivalent. It is advisable to design the drug with the use of tuberculo-proteins, purified from bacterial extracts by precipitation of TCA.*

Key words: tuberculin, allergic diagnostics, bovine tuberculosis, activity and specificity of tuberculins.

Введение

Современная инфекционная патология указывает на ведущую роль туберкулёза у человека, несмотря на продолжающуюся актуальность коронавирусной инфекции [1, 2, 3]. Ряд учёных говорит о пандемии туберкулёза исходя из существующей статистики [2, 4]. Так, по данным ВОЗ туберкулёз встречается во всех странах мира [2, 5, 6]. Ежегодно туберкулёзом заболевает 10, умирает 4 млн человек. [2, 4]. Если в высокоразвитых странах Европы, а также в США туберкулёз встречается не чаще, чем 3 случая на 100000 населения, то в Китае эта цифра составляет 520, в Монголии 428, а в Индии 200 случаев на 100000 населения. В России туберкулёз регистрируют у 44 человек из 100000 обследованных, а в Беларуси 16, что на 11,6 случаев меньше, чем 5 лет назад. По данному показателю Республика Беларусь лидирует среди стран СНГ демонстрируя ежегодную положительную динамику [2, 5]. Наряду с этим Российская Федерация входит в список, состоящий из 22 стран мира по наиболее высоким показателям туберкулёза, включая латентную туберкулёзную инфекцию [1, 2, 4, 5, 6].

В Беларуси по туберкулёзу животных сохраняется устойчивое благополучие, которое достигается плановыми исследованиями крупного рогатого скота в аллергической пробе с туберкулином очищенным (ТО) для млекопитающих [1, 4, 5, 7].

Основными показателями качества туберкулинов является активность и специфичность, которые строго контролируются при производстве препарата. В нашей стране выпуск препарата налажен на ОАО «БелВитунифарм», мощности которого позволяют удовлетворить потребности внутреннего и внешнего рынка [3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12].

Активность определяется биологическим методом в сравнении с эталоном и обозначается в международных единицах (IU) [3, 4, 6, 10, 12]. В прошлом столетии для стандартизации использовались стандарты PPD ЕЕС и PPD-S (USA) с активностью 50000 ТЕ/мг [13], относительно которого стандартизировался ППД туберкулин ФКП «Курская биофабрика-фирма БИОК» [4, 6, 9, 10]. При переходе на моноштамдную технологию, был разработан новый 1st International Standard PPD *Mycobacterium bovis*, который имел 65% активности (32 500 IU/мг) относительно стандарта ЕЕС [3, 4, 14, 15]. Поэтому, возникли сложности стандартизации препаратов с применением нового эталона, что предполагало получение отечественного стандарта, отвечающего международным требованиям [3, 4, 6, 8, 10].

С другой стороны, остаётся актуальной проблема повышения видовой специфичности туберкулинов. Известно, что в составе препаратов находятся общеродовые антигены, которые при аллергической диагностике вызывают парааллергические реакции обусловленные нетуберкулёзными микобактериями (НТМБ) [1, 3, 4, 5, 7, 8, 11, 16]. В работах ряда авторов предпринимались попытки применения физико-химических и биоспецифических методов для очистки туберкулинов и повышения видовой специфичности [3, 4, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 15], а также велись работы с иммуноглобулинами против НТМБ, что позволило получить несколько препаратов обладающих достаточной активностью и высокой специфичностью [4, 6, 7, 8, 14]. Однако данное направление выглядит сложновыполнимым при промышленном получении препаратов, когда речь идёт о фракционировании больших объёмов жидкости по молекулярному весу [3, 4, 6, 7, 8, 10].

Перспективным направлением является получение аналогичных препаратов с включением слабосекретирующихся (ССА) туберкулопротеинов, с высокой туберкулиновой активностью и специфичностью [8]. Таким образом, повышение активности и специфичности туберкулинов возможно при получении препаратов, содержащих ССА из бактериальной массы производственного штамма возбудителя туберкулёза бычьего вида.

Целью работы явилось изучение активности и специфичности туберкулинов, полученных из бактериальной массы производственного штамма возбудителя туберкулёза бычьего вида.

Основная часть

Работу проводили в условиях отдела экологии и молекулярной биологии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» и на ОАО «БелВитунифарм». Для исследования использовалась автоклавированная и замороженная бактериальная масса производственного штамма «*M. bovis* 8» (КМИЭВ 9). Экстракция туберкулопротеинов проводилась с помощью: 3М KCl, 0,1М NaOH, 0,3–1 % тритона X100, 0,3 % дезоксихолата натрия, лизирующего ПЦР буфера (1:3). Гомогенизацию бактериальной массы проводили на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-1 и Bandelin Sonopuls 2400. Содержание туберкулопротеинов в экстрактах определяли по общепринятой методике после удаления клеток центрифугированием при 14 тыс. об/мин и фильтрацией через фильтры Millex® GP 0,45 и 0,22 мкм. Определение полисахаридов в экстрактах и осаждённых туберкулопротеинах проводили по общепринятой методике. Удаление клеток из экстрактов туберкулопротеинов проводили на центрифугах Bio-Rad с режимами 3000g и 8000g, а также на проточной центрифуге. Супернатанты фильтровали на фильтрах Millex® GP 0,45 и 0,22 мкм. Активность и специфичность экстрагируемых туберкулопротеинов проверяли на морских свинках, сенсibilизированных *M. bovis* 8 и *M. avium* 1603 с адьювантом ISA 70. Все исследования сопровождали соответствующими контролями.

При получении туберкулина использовали различные экстрагенты, такие как, 0,1М NaOH, 3М KCl, 0,3% дезоксихолата натрия, 0,3–1% раствор тритона X100, лизирующий ПЦР буфер (1:3), при этом наиболее оптимальным оказалось применение тритона X100.

Для оценки возможности использования туберкулопротеинов, экстрагированных тритоном X100 для изготовления туберкулина, с точки зрения нагрузки балластными веществами, провели сравнительное определение концентрации полисахаридов в полученных препаратах, разведённых до концентрации 0,7–0,8 мг/мл (табл. 1).

Таблица 1. Содержание полисахаридов в тритоновых экстрактах относительно их концентрации в стандартном растворе ППД туберкулина (0,83 мг/мл)

Препарат	Концентрация туберкуло-протеинов мг/мл	% пропускания при 540 нм	Содержание полисахаридов относительно их концентрации в стандартном растворе ППД туберкулина серии 11
Тритоновый экстракт 0,3%	0,73	66,7	в 2,15 раза меньше
Тритоновый экстракт 0,63%	0,84	86,2	в 2,78 раза меньше
Туберкулин очищенный серии 89	0,59	8,8	в 3,52 раза больше

Как видно из табл. 1, при экстракции туберкулопротеинов в 0,63 % растворе тритона X100 получался более чистый продукт (содержание полисахаридов в 2,78 раза меньше, чем в стандартном растворе ППД туберкулина). Повышение концентрации тритона X100 не приводило к усилению экстракции полисахаридов.

При изучении активности и специфичности туберкулина, приготовленного из неконцентрированного культурального фильтрата и туберкулопротеинов, экстрагированных из бактериальной массы производственного штамма получены результаты указывающие на возможность изготовления туберкулинов на основе бакмассы *M. bovis* 8.

Известно, что в процессе роста производственного штамма в культуральную жидкость попадают туберкулопротеины. После автоклавирования посевов и стерилизующей фильтрации содержание туберкулопротеинов в культуральных фильтратах составляет 0,34–0,46 мг/мл. После очистки ультрафильтрацией в ультрафильтрате (при существующей технологии ультрафильтрации) содержится всего 0,1–0,14 мг/мл туберкулопротеинов, т. е. для приготовления препарата их необходимо концентрировать в 5–6 раз, что существенно повышает себестоимость. Так, нами установлено, что из бактериальной массы удаётся экстрагировать туберкулопротеины с высокой видовой специфичностью, хотя и меньшей активностью. В этой связи была изучена возможность приготовления туберкулина из неконцентрированного культурального фильтрата с добавлением туберкулопротеинов экстракта бакмассы, исключая стадию ультрафильтрации. Для этого приготовили туберкулин из культурального фильтрата с концентрацией 0,73 мг/мл.

При проверке на морских свинках (табл. 2) установлено, что активность комбинированного туберкулина (с экстрактом бакмассы) составила 18710 МЕ/мл, или 93,6 % от активности контрольной серии ТО.

Таблица 2. Активность комбинированного туберкулина (с экстрактом туберкулопротеинов бакмассы) на морских свинках, заражённых *M. bovis* BCG

Показатели	ТО контрольной серии		Туберкулин (с экстрактом туберкулопротеинов бакмассы)	
	40 МЕ	4 МЕ	1 разведение	2 разведение
Среднеарифметический диаметр папул в мм	11,83	8,33	12,2	6,7
Сумма	35,5	25	36,5	20,1
	60,5		56,6	

Результаты изучения видовой специфичности комбинированного туберкулина представлены в табл. 3. Как видно, уровень перекрёстных реакций у испытуемого туберкулина был на 9,1 % ниже, чем у ТО контрольной серии.

Таблица 3. Видовая специфичность в дозе, эквивалентной 40 МЕ комбинированного туберкулина (с экстрактом) у морских свинок, заражённых *M. avium*

Показатели	ТО контрольной серии	ППД туберкулин для птиц	Туберкулин (с экстрактом туберкулопротеинов бакмассы)
Среднеарифметический диаметр папул	11,0	15,0	10,0
Сумма	33	45	30

В целом результаты исследований показали целесообразность включения методики экстракции туберкулопротеинов из отходов автоклавированной бактериальной массы производственного штамма в технологию для компенсации нехватки 30–40 % туберкулопротеинов, что позволит на 30–40 % снизить объёмы производственных затрат (посевов, электроэнергии, труда, компонентов питательных сред).

Особую актуальность имеет оценка аллергической активности и специфичности туберкулопротеинов из экстрактов бактериальной массы, очищенных осаждением трихлоруксусной кислотой.

Как было установлено, экстракты туберкулопротеинов из автоклавированной бактериальной массы *M. bovis* имели меньшую аллергическую активность, чем туберкулопротеины культурального фильтрата. В этой связи, проведены исследования по выделению туберкулопротеинов из экстрактов бакмассы.

Для сравнения активности и специфичности приготовили раствор очищенных туберкулопротеинов – 0,6 мг/мл, как у контрольной серии ТО №16. Результаты испытания представлены в табл. 4.

Таблица 4. Сравнение активности и специфичности туберкулопротеинов из экстракта бакмассы, очищенных ТХУ, с контрольной серией туберкулина очищенного №16 в опыте на морских свинках, сенсibilизированных *M. bovis* и *M. Avium*

№ М. свинки	ТО контрольной серии №16 1:100	Туберкулопротеины, осажденные ТХУ 0,6 мг/мл 1:100
<i>M. bovis</i>		
1	14,5	15
2	19	17,5
3	13	16
4	15	20
5	15,5	17
6	17,5	19
7	14	14,5
Сумма	108,5	119
М=	15,5	17,0
<i>M. avium</i>		
1	4	4
2	7	7
3	14,5	8
Сумма	25,5	19
М=	8,5	6,3

Как видно, туберкулопротеины, осаждённые ТХУ, оказались не только на 8,8 % активнее, но и на 25,5 % специфичнее контрольной серии ТО. Следовательно, целесообразно для конструирования препарата использовать туберкулопротеины, очищенные из экстрактов бакмассы осаждением ТХУ.

Заключение

Таким образом, при сравнении активности и специфичности туберкулопротеинов из экстракта бакмассы, очищенных ТХУ, с контрольной серией туберкулина очищенного №16 в опыте на морских свинках, сенсibilизированных *M. bovis* и *M. avium*, получены результаты, указывающие на большую активность (на 25,5 %) и специфичность (на 8,8 %) препаратов, приготовленных из бактериальной массы. Следовательно, целесообразно для конструирования препарата использовать туберкулопротеины, очищенные из экстрактов бакмассы осаждением ТХУ.

При оценке активности комбинированного туберкулина на морских свинках, заражённых *M. bovis* BCG, уровень перекрёстных реакций у испытуемого туберкулина был на 9,1 % ниже, чем у ТО контрольной серии.

Оценка содержания полисахаридов в тритоновых экстрактах относительно их концентрации в стандартном растворе ППД туберкулина (0,83 мг/мл) показала, что при экстракции туберкулопротеинов в 0,63 % растворе тритона X100 получили чистый продукт (содержание полисахаридов в 2,78 раза меньше, чем в стандартном растворе ППД туберкулина). Повышение концентрации тритона X100 не приводило к усилению экстракции полисахаридов.

Исследования подтверждают целесообразность включения методики экстракции туберкулопротеинов из отходов автоклавированной бактериальной массы производственного штамма в технологию для компенсации нехватки 30–40 % туберкулопротеинов, что позволит на 30–40 % снизить объёмы производственных затрат (посевов, электроэнергии, труда, компонентов питательных сред).

ЛИТЕРАТУРА

1. Лысенко, А. П. Распространение микобактерий в благополучных по туберкулёзу хозяйствах / А. П. Лысенко, А. Э. Высоцкий, И. И. Румачик // Ветеринария. – 2003. – № 5. – С. 19–21.
2. World Health Organization (WHO). Global tuberculosis report 2018. – WHO, Geneva, 2018. – 232 p.
3. OIE Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals // 8th Edition. – 2019. – Vol. 1. – P. 1058–1074.
4. Притыченко, А. Н. Туберкулин очищенный для млекопитающих (оптимизация очистки, диагностические и иммунохимические свойства): автореф. дис.... канд. вет. наук: 16.00.03 / А. Н. Притыченко; Бел. НИИ экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелеского. – Минск, 2002. – 17 с.
5. Особенности эпизоотической ситуации и динамика туберкулёза крупного рогатого скота в Республике Беларусь / А. П. Лысенко [и др.] // Зооантропонозные болезни, меры профилактики и борьбы: материалы Международной научно-практической конференции. – Минск, 1997. – С. 65–66.
6. Козлов, В. Е. Аллергены для диагностики туберкулёза: совершенствование производства и стандартизация: автореф. дис.... д-ра биол. наук: 16.00.03; 03.00.23 / В. Е. Козлов; ФГУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» – Москва, 2007. – 43 с.
7. Лысенко, А. П. Антигены *M. bovis* и атипичных микобактерий, изучение и применение для дифференциальной диагностики туберкулёза крупного рогатого скота: автореф. дис.... д-ра вет. наук: 16.00.03 / А. П. Лысенко; БелНИИ экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелеского. – Минск, 1994. – 35 с.

8. Притыченко, А. Н. Аллергическая активность и специфичность препаратов туберкулина с 30–50 % слабосекретирующихся антигенов микобактерий туберкулёза / А. Н. Притыченко, А. П. Лысенко, М. В. Кучвальский, Е. Л. Красникова // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук. – 2020. – Т. 58. – № 4. – С. 472–482.
9. Козлов, В. Е. Гармонизация методов контроля туберкулиновых препаратов / В. Е. Козлов // Ветеринария. – 2007. – № 3. – С. 20–22.
10. Козлов, В. Е. Стандартизация туберкулинов / В. Е. Козлов // Ветеринария. – 2004. – № 10. – С. 6–8.
11. Purification and characterisation of major antigens from *Mycobacterium bovis* culture filtrate / T. Fifis [et al] // *Infect. Immun.* – 1991. – Vol. 59. – P. 800–807.
12. O'Reilly, L. M. Tuberculin skin tests: sensitivity and specificity. In *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans / L. M. O'Reilly, C. O. Thoen, J. H. Steele. – Iowa State University Press, Ames, Iowa, 1995. – P. 85–91.
13. The Internationale Standard for Tuberculin, Purified Derivative (PPD), Bovine // National Institute for Biological Standards and Control. – 2003. – P. 6.
14. Tamani, S. Quality control and in vitro diagnostic efficiency of bovine PPD tuberculins / S. Tamani, M. Amadori, P. Scaccaglia // *Biologicals.* – 1998. – Vol. 26, № 3. – P. 225–235.
15. The tuberculin test / M. L. Monaghan [et al] // *Vet. Microbiol.* – 1994. – Vol. 40, № 1/2. – P. 111–124.
16. Turcotte, R. Purification and characterization of tuberculin-active components from BCG / R. Turcotte, M. Laguerre, // *Can J Microbiol.* : – 27. *J. Gen. Microbiol.* – 1975. – Dec; 21 (12). – P. 2019.