

БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ВЫДЕЛЕНИЯ И ОЧИСТКИ ТУБЕРКУЛОПРОТЕИНОВ ИЗ БАКТЕРИАЛЬНОЙ МАССЫ ПРОИЗВОДСТВЕННОГО ШТАММА ВОЗБУДИТЕЛЯ ТУБЕРКУЛЁЗА БЫЧЬЕГО ВИДА

А. Н. ПРИТЫЧЕНКО

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышесесского»,
г. Минск, Республика Беларусь, 220063

(Поступила в редакцию 22.03.2021)

Туберкулёз остаётся глобальной проблемой, чаще всего туберкулёз встречается у крупного рогатого скота. Для аллергической диагностики в Республике Беларусь применяют туберкулин очищенный для млекопитающих производства ОАО «БелВитунифарм», который получают по классической методике с выходом белка с единицы питательной среды с концентрацией 0,5 г на литр продукта. Бакмасса, содержит значительное количество слабосекретирующихся белковых компонентов, обладающих высокой туберкулиновой активностью. Разработанная методика экстракции активных туберкулопротеинов из бактериальной массы производственного штамма возбудителя туберкулёза с использованием неионных детергентов позволяет получить продукты с высоким содержанием белка с концентрацией 0,14–0,17 г/мл и специфичностью выше туберкулопротеинов стандарта, что позволяет существенно повысить рентабельность производства туберкулина и увеличить его производство, в том числе и на экспорт.

Ключевые слова: туберкулин, туберкулёз крупного рогатого скота, *Mycobacterium bovis*, слабосекретирующиеся антигены *Mycobacterium bovis*.

Tuberculosis remains a global problem, most often occurring in cattle. For allergic diagnostics in the Republic of Belarus, purified tuberculin for mammals produced by JSC «BelVitinifarm» is used, which is obtained according to the classical method with a protein yield per unit of nutrient medium with a concentration of 0.5 g per liter of product. Bakmass contains a significant amount of weakly secreted protein components with high tuberculin activity. The developed method of extraction of active tuberculoproteins from the bacterial mass of the production strain of the causative agent of tuberculosis using nonionic detergents makes it possible to obtain products with a high protein content with a concentration of 0.14–0.17 g / ml and a specificity higher than the standard tuberculoproteins, which will significantly increase the profitability of the production of tuberculin and increase its production, including for export.

Key words: tuberculin, bovine tuberculosis, *Mycobacterium bovis*, weakly secreted *Mycobacterium bovis* antigens.

Введение. В настоящее время туберкулёз является инфекцией №1 в мире. По данным Всемирной организации здравоохранения планетарный уровень заболеваемости и смертности достаточно высок и сопоставим с пандемией [5, 7, 11, 13]. Считается, что на планете Земля инфицированы как минимум 30 % населения, в зависимости от региона уровень инфицирования может быть гораздо выше. Так, на Африкан-

ском континенте от туберкулёза уходят из жизни более 500 млн человек в год. При этом, смертность на земном шаре достигает 3 млн человек в год [5, 7, 11, 13]. В Республике Беларусь ситуация по туберкулёзу остается сложной [10, 33].

Туберкулёз представляет собой классическую зооантропонозную болезнь, поражающую как человека, так и многие виды животных [1, 2, 3, 5, 7, 13]. Наиболее часто туберкулёз встречается у крупного рогатого скота, однако современная система ветеринарно-санитарных мероприятий исключает клиническое проявление болезни [5, 7, 11, 13]. В тоже время выявляется ряд туберкулинпозитивных животных при систематическом аллергическом исследовании крупного рогатого скота [5, 7, 11, 13].

В Республике Беларусь для аллергической диагностики крупного рогатого скота используют туберкулин очищенный для млекопитающих производства ОАО «БелВитунифарм» в объёме, не превышающем 10 млн доз в год [5, 7, 11, 13]. Современные рыночные отношения диктуют условия высокой конкурентоспособности и освоения новых рынков, что возможно при наращивании объёмов производства и повышения качества выпускаемого препарата [5, 7, 11, 13].

При производстве туберкулина используют раствор туберкулопротеинов, которые содержатся в культуральной жидкости после роста *Mycobacterium bovis* на среде Сотона, инактивированные автоклавированием, очищенные фильтрацией и стандартизированные в соответствии с ТУ. Данная технология не позволяет получить значительный выход белка с единицы питательной среды, ограничиваясь концентрацией в 0,5 г на литр продукта [3, 8].

При производстве туберкулина в качестве отхода производства получают бакмассу, содержащую значительное количество слабосекретирующих белковых компонентов, обладающих высокой туберкулиновой активностью [8, 12].

В этой связи перспективным направлением является получение туберкулинов на основе слабосекретируемых антигенов (ССА), что позволит прежде всего увеличить выход белка с единицы культуральной жидкости, повысить диагностические свойства конечного продукта и получить препарат в объёмах необходимых для современного рынка.

Таким образом, создание препаратов, содержащих слабосекретируемые антигены, является актуальной задачей и в известной степени может решить проблему повышения специфической активности туберкулинов, а также увеличить эффективность экспорториентированного производства.

Цель работы – разработка методики получения активных туберкулопро-

теинов из бактериальной массы производственного штамма возбудителя туберкулёза бычьего типа.

Основная часть. Работу проводили в условиях отдела молекулярной биологии РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского», а также в условиях ОАО «БелВитунифарм».

Материалом для исследований служила автоклавированная замороженная (-20 °С) бактериальная масса производственного штамма «M. bovis 8» (КМИЭВ 9).

Для экстракции туберкулопротеинов испытаны растворы: 3М KCl, 0,1М NaOH, 0,3–1 % тритона X100, 0,3 % дезоксихолата натрия, лизирующей ПЦР буфер (1:3).

Для гомогенизации бактериальной массы использовали ультразвуковой дезинтегратор УЗДН-1 и Bandelin Sonopuls 2400.

Контроль содержания туберкулопротеинов в экстрактах выполнили после удаления клеток центрифугированием при 14 тыс. об/мин и фильтрацией через фильтры Millex® GP 0,45 и 0,22 мкм.

Для определения содержания туберкулопротеинов использовали общепринятую методику.

В части исследований определение содержания туберкулопротеинов проводили по модифицированному (в 96-луночных плоскодонных иммунологических панелях) методу (Bredford) с определением оптической плотности на спектрофотометре для ИФА (при 620 нм).

Из части экстрактов с использованием ТХУ (конечная концентрация 10 %) осаждали туберкулопротеины с последующим растворением в меньшем объёме забуференного изотонического раствора и нормализацией 0,1N раствором NaOH.

Для оценки экстрактов и осаждённых туберкулопротеинов проводили определение в них полисахаридов по общепринятой методике. При обработке режимов экстракции туберкулопротеинов испытали различные физико-химические режимы.

При удалении клеток из экстракта туберкулопротеинов использовали центрифугирование при 3000g, 8000g, а также центрифугирование на проточной центрифуге.

Полноту осаждения клеток контролировали по объёму фильтратов, полученных после фильтрации надосадочной жидкости через фильтры Millex® GP 0,45 и 0,22 мкм.

Для определения аллергической активности и специфичности экстрагируемых туберкулопротеинов использовали морских свинок сенсибилизированных M. bovis 8 и M. avium 1603 с адьювантом ISA 70. Контролем служили интактные животные. Все исследования сопровождали соответствующими контролями.

При изучении возможности гомогенизации инактивированной бактериальной массы производственного штамма возбудителя туберкулёза бычьего вида установлено, что бактериальная масса представляет собой комковатую гидрофобную субстанцию плохо суспендирующуюся в водных растворах. Для обеспечения эффективной экстракции туберкулопротеинов целесообразно обеспечить получение тонких суспензий клеток. При испытании возможностей дефростации не удалось получить гомогенной суспензии бакмассы. При последующей экстракции из 1 г бакмассы удавалось выделить лишь 5,1 мг туберкулопротеинов.

Лучшие результаты были получены при ультразвуковой обработке на дезинтеграторе УЗДН-1 и Bandelin Sonopuls 2400. Гомогенную суспензию удавалось получить даже при высокой концентрации клеток (0,73 г/мл), что обеспечивало экстрагирование до 163 мг туберкулопротеинов из 1 г бакмассы. Благодаря ультразвуковой обработке удалось получить 900 мл суспензии с концентрацией 0,14–0,17 г/мл – 130–140 г на 900 мл экстрагента с высокой степенью экстракции туберкулопротеинов.

При изучении оптимального экстрагирующего реагента установлено (табл. 1), что наибольшую экстракцию туберкулопротеинов обеспечивал лизирующий буфер для ПЦР (5,4 мг/мл). Незначительно меньше выход туберкулопротеинов давал 0,3 % тритон X100. Наиболее дешёвый 0,1N раствор NaOH также экстрагировал туберкулопротеины, но вызывал их частичную деструкцию. В этой связи дальнейшие исследования проводили с использованием тритона X100, который значительно уступал в эффективности лизирующему ПЦР буферу, но был гораздо дешевле.

Таблица 1. Результаты определения туберкулопротеинов в экстрактах бакмассы производственного штамма (по Bredford)

Раствор	Разведение	Средний показатель ОП при 620 нм	Белок с учётом разведения мг/мл
3M KCl	1:15	897	1,28
0,1N NaOH	1:15	1603	4,6
0,3% тритона X100	1:15	1874	5,33
0,3% дезоксихолата натрия	1:15	1097	3,12
Лизирующий ПЦР буфер	1:15	1900	5,4
Вода (контроль)	1:10	821	0,55
ТО с. 89 0,62 мг/мл (контроль)	1:10	854	0,63

Использование тритона X100 хорошо сочеталось с предварительной обработкой суспензии бакмассы ультразвуком. Это подтвердили

результаты опыта, в котором 3 г полувлажной автоклавированной бакмассы были суспендированы в 30 мл 0,3 % тритона X100 с 0,25 % фенола (концентрация бакмассы 100 мг/мл). Суспензию 4 мин обрабатывали ультразвуком и прогрели в кипящей водяной бане. Содержание туберкулопротеинов в полученном экстракте составило 3,36 мг/мл. С учётом того, что в первом опыте исходная концентрация бакмассы была в 1,8 раза выше, был сделан вывод о том, что предварительная обработка ультразвуком на 80–90 % повышает выход белка. После дополнительного прогревания суспензии в течение 3 ч концентрация повысилась до 6 мг/мл. Всего из 3,0 г полувлажной бакмассы было получено 180 мг туберкулопротеинов.

В табл. 2 представлены результаты определения аллергической активности экстрагированных туберкулопротеинов на морских свинках, сенсibilизированных *M. bovis* BCG, в сравнении с 1st International standard PPD *M. bovis*.

Таблица 2. Аллергическая активность туберкулопротеинов, экстрагированных тритоном X100 из автоклавированной бактериальной массы *M. bovis* 8 в сравнении с 1st International standard PPD *M. bovis*

№ морских свинок <i>M. bovis</i> BCG	Среднеарифметический диаметр папул в мм через 24 часа					
	1st International standard PPD <i>Mycobacterium bovis</i>			Тритоновый экстракт бактериальной массы 0,8 мг/мл		
	Разведения, активность в IU, доза туберкулопротеинов					
	1:200 32 IU	1:1000 6,4 IU	1:5000 1,28 IU	1:200	1:1000	1:5000
1	8	5	4	10	5	4
2	11,5	10	9	11,5	9,5	5
3	13,5	13	12	10,5	8,5	6
4	13,3	8,5	4	9,5	7	5
5	18	13	7	12,5	12,5	7
6	14,5	14	11,2	12	9	6
7	14,4	14	11,2	12	9	6
М	13,51	10,58	7,7	11,0	8,6	5,5
Сумма диаметров	31,78			25,1		

Исходя из данных табл. 2, активность экстракта туберкулопротеинов при расчёте методом прямой пропорции составила $25,1:31,78 \times 32500 \text{ IU/ml} = 25668 \text{ IU/ml}$ или 79 % от активности международного эталона. С учётом того, что содержание белка в экстракте было на 20 % ниже, чем в эталоне туберкулина, можно считать, что экстрагированные туберкулопротеины имели аллергическую активность близкую к активности туберкулопротеинов международного стандарта,

полученных по традиционной технологии из культурального фильтра. Видовую специфичность туберкулопротеинов тритонового экстракта определяли на морских свинках, сенсibilизированных *M. avium* 1603 (табл. 3).

Таблица 3. Видовая специфичность туберкулопротеинов, экстрагированных из бактериальной массы производственного штамма *M. bovis* 8 в сравнении с 1st International standard PPD *M. bovis* у морских свинок, сенсibilизированных *M. avium* 1603

Средний размер папул в мм через 24 ч после введения		
1st Int. stand PPD 1 мг/мл 1:100	Тритоновый экстракт б/м 0,8 мг/мл 1:100	ППД для птиц 1 мг/мл 1:100
8,2	4,7	15,2

Как видно из табл. 3, реакции на введение тритонового экстракта бакмассы были ниже уровня положительной реакции в 5 мм – 4,7 мм. Средний размер папул на введение эталона PPD туберкулина был – 8,2 мм. То есть туберкулопротеины, экстрагированные из автоклавированной бакмассы были почти на 47 % специфичнее туберкулопротеинов стандарта или с учётом их концентрации – на 27 %.

При оптимизации технологии экстракции туберкулопротеинов из автоклавированной бактериальной массы производственного штамма *M. bovis* 8 испытаны увеличенные концентрации экстрагирующего раствора тритона X100. Дезинтеграторы автоклавированной бакмассы гомогенизировали до получения однородной суспензии и прогрели на кипящей водяной бане. Средние показатели определения белка с ТХУ через 3 часа прогревания составили 20 мг/мл, что на 50 % больше, чем при использовании 0,3 % раствора 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. Установлено, что 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.

Стерилизующая фильтрация – обязательная стадия технологического процесса при производстве туберкулина. В этой связи тритоновые экстракты туберкулопротеинов, имеющие примесь микобактериальных клеток с высокой плавучестью, после обработки ультразвуком в растворе детергента нуждаются в тщательной очистке для эффективной стерилизующей фильтрации.

При отработке режима удаления клеток из экстракта туберкулопротеинов установлено, что центрифугирование при 1720 g, даже в течение 20 мин, полностью не удаляет клетки микобактерий и детрит. Для очистки больших объёмов экстракта бактериальной массы необходимо отработать методику промышленной экстракции туберкулопротеинов.

Заключение. Таким образом, полученные результаты указывают на то, что разработанная методика экстракции активных туберкулопротеинов из бактериальной массы производственного штамма возбудителя туберкулёза с использованием неионных детергентов позволяет получить продукты с высоким содержанием белка с концентрацией 0,14–0,17 г/мл и специфичностью выше туберкулопротеинов стандарта, что в конечном итоге, позволит существенно повысить рентабельность производства туберкулина и увеличить его производство, в том числе и на экспорт.

ЛИТЕРАТУРА

1. Козлов, В. Е. Аллергены для диагностики туберкулеза: 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.
2. Лысенко, А. П. Основы профилактики туберкулёза крупного рогатого скота и оздоровления стад / А. П. Лысенко // Ветеринарное дело. – 2016. – №2 (44). – С. 15–20.
3. 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.
4. 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 // Весті Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Серыя аграрных навук. – 2020. – Т. 58. – № 4. – С. 472–482.
5. 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. Вышелесского. – Минск, 2002. – 17 с.
6. Cousins, D. V. Mycobacterium bovis infection and control in domestic livestock. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 2001, 20 (1), 71–85. 4. OIE Terrestrial Manual, 2018.
7. OIE Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals // 8th Edition. – 2019. – Vol. 1. – P. 1058–1074.
8. 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.
9. Palmer, D. N. Bovine tuberculosis in OIE manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals, 5th ed. / D. N. Palmer // World Organisation for Animal Health, France [Electronic resource] – 2004. – Mode of access: http://www.oie.int/eng/normes/en_mmanual.htm. 22. – Date of access: 23.07.2004.