

ПРЕПАРАТИВНОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИГЕНОВ ПОЛНОГО КЛЕТОЧНОГО ЛИЗАТА *M. BOVIS*

Москвичева А.В.¹ – соискатель, Хаертынов К.С.^{3,4} – к.вет.н., заведующий,
Хаммадов Н.И.⁴ – к.вет.н., вед.н.с., Шуралев Э.А.^{1,2,3} – к.вет.н., доцент,
Ефимова М.А.^{1,3,4} – д.б.н., Равилов Р.Х.¹ – д.вет.н., профессор

¹ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана»

²Институт экологии и природопользования, ФГАОУ ВО Казанский (Приволжский) федеральный университет

³ЦНИЛ КГМА – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России

⁴ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»

Ключевые слова: туберкулез, крупный рогатый скот, *Mycobacterium bovis*

Keywords: tuberculosis, cattle, *Mycobacterium bovis*

Туберкулез крупного рогатого скота является серьезной проблемой в России и за рубежом и продолжает оставаться одной из наиболее распространенных инфекционных болезней. Огромные экономические потери для индустрии животноводства связаны с затратами на диагностику, убой животных, обезвреживание молока, санацию помещений и территории, а также ограничениями продажи и экспорта животных [1, 2]. У больных животных снижаются молочная продуктивность (на 11,6-30 %), приросты, живая масса (на 7,1-11,1 %), выход телят (на 6,5 %).

Социальная опасность туберкулеза крупного рогатого скота состоит в том, что молоко и мясо от больных и инфицированных особей, а также сами животные представляют серьезную угрозу здоровью людей [4]. Ежегодно 10 млн. человек заболевают бациллярными формами туберкулеза. Каждый больной с активным бациллярным туберкулезом способен заразить до 10-15 человек. От туберкулеза ежегодно умирают 2,6-2,9 млн. человек, что составляет около 5 % от всех случаев смерти во всем мире. Заболеваемость туберкулезом детей в России за 5 лет возросла более чем на 60 % [5]. Основой борьбы с туберкулезом является диагностика внутрикожной

пробой с применением ППД-туберкулина для млекопитающих. Эффективность этой пробы зависит от места введения, дозы и объема туберкулина, физиологического состояния животных. Однако, массовое выявление неспецифических реакций на туберкулин у животных, сенсibilизированных атипичными и сапрофитными микроорганизмами, делают результаты этой пробы ориентировочными. По последним статистическим данным, количество ложноположительных туберкулиновых проб составляет около 17 %, что связано с гиперчувствительностью организма животных в отношении непатогенных атипичных микобактерий и возбудителей некоторых инфекционных и инвазионных болезней [3, 7].

Серодиагностика представляет собой привлекательную альтернативу текущим тестам, рекомендованным для выявления туберкулеза крупного рогатого скота, поскольку анализы, направленные на обнаружение антител, как правило, просты, экспрессны, воспроизводимы, не дорогие и относительно не инвазивны. В отличие от внутрикожного туберкулинового теста, серология (ИФА) не требует многократных вмешательств, значительно менее субъективна для интерпретации и не влияет на иммунный статус проверенных

животных. Важно отметить, что серологические анализы позволяют обнаружить скот с инфекцией *M. Bovis*, которые являются анергичными для тестов на основе клеточного иммунного ответа [6].

В связи с этим, получение и изучение иммунологических характеристик микобактериальных иммунодоминантных антигенов, возможности их использования для диагностики туберкулеза животных методом ИФА являются актуальной задачей не только для ветеринарной, но и для медицинской практики и послужат основой для разработки новых экспресс-методов и диагностикумов для дифференциации неспецифических аллергических реакций и быстрой постановки точного диагноза.

Материал и методы исследований.

Исходным сырьем для получения антигена служили клетки *Mycobacterium bovis* – *Bovinus 8*, выращенные на питательной среде Левенштейна Йенсена в течение 28-30 дней. Клетки *Mycobacterium bovis* – *Bovinus 8*, отмытые от остатков питательной среды стерильным 0,1M раствором фосфатно-солевого буфера, pH 7,2-7,4, разрушали на приборе Fast Prep 24 с использованием Blue Lising Matrix Tube. Полученный таким способом материал лизировали в кипящей водяной бане в течение 5 минут в растворе 0,0625M трис-НСl буфера (pH 6,8) 2,5 % ДСН и 5 % 2-меркаптоэтанола. Далее лизированные пробы разделяли на приборе Mini Prep Cell (BioRad) на 10 см колонке, заполненной 9 % ПААГ. Элюируемые пробы собирали на коллекторе фракций FRAC 100 (Pharmacia LKB), спектрофотометрический контроль осуществляли при помощи Optical unit UV-1 и Control Unit UV-1 (LKB), результаты детектировали на самописце Recoder Rec 102 (LKB), скорость элюции регулировали перестальтическим насосом Peristaltic pump Varioprepex (LKB) при напряжении 250 мА и скорости элюции 500 мкл/10 мин.

Белковый состав определяли аналитическим электрофорезом в 12,5 % ПААГ, в присутствии 0,1 % додецилсульфата натрия по Laemmli U.K.

[9], перенос на нитроцеллюлозную мембрану осуществляли по Towbin H. [8], серологическую активность определяли в реакции иммуноблотинга с использованием гипериммунных сывороток крови кроликов, полученных против нативных клеток *Mycobacterium bovis Bovinus-8*, а также контрольных сывороток крупного рогатого скота.

Результаты электрофореза и Western blot assay документировали в формате IMG, обрабатывали с использованием программы ImaJe в соответствии с пользовательской инструкцией.

Результат исследований. Лизат клеток *Mycobacterium bovis*, разрушенных на приборе Fast Prep 24 исследовали электрофоретическим методом по Леммли (1974) в 12,5 % полиакриламидном геле. На рисунке 1 представлен электрофоретический профиль супернатантов, полученных после разрушения клеток (треки 7-11), а также белков, присутствующих в растворе, которым промывали клетки (треки 1-6) и экстракты, полученные кратковременным встряхиванием клеточного дебриса в 0,05M Трис-НСl буфере, pH 7,1 (треки 12-14).

Из рисунка видно, что наибольшее количество фракций содержится в супернатанте, полученном после разрушения клеток на Fast Prep 24. Несколько меньшее количество белковых фракций содержали растворы, которыми отмывали клетки *M. Bovis*. Значительно меньшее количество фракций содержалось в экстрактах из клеточного дебриса и содержание их было незначительно.

Из полученных результатов следует, что спектр белковых фракций всех исследованных материалов представлен большим количеством фракций с диапазоном молекулярных масс: от 150-120 кДа до 6,5 кДа. Более того, в области молекулярных масс 26 кДа и 28-30 кДа белковые фракции располагались близко друг к другу и количество их было не большим. По этой причине, мы сочли, что наработка белков с молекулярными массами 26, 28-30 кДа классическими методами будет не эффективной, трудоемкой и связанна с необходимостью

иметь большое количество бактериальной массы.

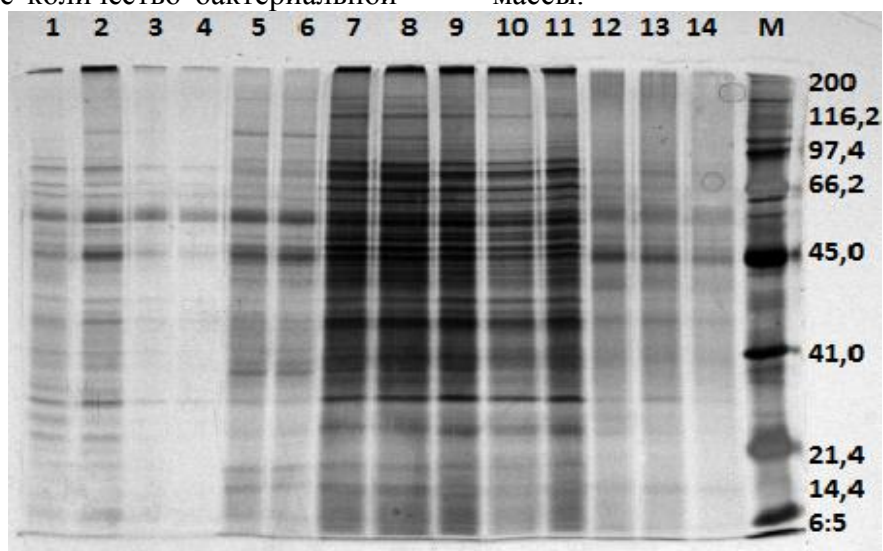


Рисунок 1 – Аналитический электрофорез антигенов *M. Bovis* в 12,5 % ПААГ в присутствии детергентов *M. Bovis*. Примечание. Белки содержащиеся: в промывочной жидкости (треки 1-6); супернатанте клеток, полученного разрушением на Fast Prep 24 (треки 7-11); в экстракте, полученного и ресуспензированием бактериального дебриса с последующим отделением последнего центрифугированием (треки 12-14). Гель окрашен азотнокислым серебром.

Далее, нами также был использован метод препаративного электрофореза для выделения антигенов из *Mycobacterium bovis*. В процессе препаративного электрофореза на коллекторе фракций отобрано 28 антигенных фракций. Каждая полученная фракция анализировалась методом электрофореза в 12,5 % полиакриламидном геле с последующим переносом на нитроцеллюлозную мембрану для определения серологической активности полученных фракций и определения их локализации соответственно молекулярным массам.

Анализ денситограмм показал, что фракции 11, 12, 13, 14 содержали 2 зоны серологической активности, соответствующие молекулярным массам 24 и 28-30 кДа, 15 - 17 фракции представляли мономерный антиген с высокой серологической активностью, молекулярной массой 28 кДа, фракции 18-23 характеризовались снижением серологической активности и появлением пика молекулярной массой 65 кДа, серологическая активность которого не превышала 100 ед.оп.

Таким образом, описанный метод выделения специфических антигенов из полного клеточного лизата *Mycobacterium*

bovis позволяет получать серологически активную антигенную фракцию с высокой степенью чистоты с молекулярной массой 28 кДа.

Заключение. 1. Предварительное разрушение структур клеточной поверхности *M. Bovis* на приборе FastPrep-24 с последующим лизированием позволяет получить большое количество фракций с диапазоном молекулярных масс: от 150-120 кДа до 6,5 кДа.

2. В результате препаративного фракционирования антигенного материала *M. Bovis* при использовании 4 % гелей из поперечно-сшитой агарозы было получено 28 элюатов.

3. Установлено, что наибольшую серологическую активность проявляли фракции с молекулярными массами 24 и 28-30 кДа. Фракции № 15, 16, 17 представляющие дискретный серологически активный компонент соответствуют молекулярной массе 28 кДа.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Муковнин, А.А. Туберкулез крупного рогатого скота в России / А.А. Муковнин, А.Х. Найманов, А.М. Гулюкин // Ветеринария. – 2020. – № 7. – С. 19-23.
2. Мясоедов, Ю.М. Изучение

сенсibiliзирующих свойств атипичных микобактерий разных групп по классификации *ganyon* / Ю.М. Мясоедов, А.Х. Найманов // Ветеринария и кормление. – 2019. – № 4. – С. 6-8.

3. Найманов, А.Х. Симультанная туберкулиновая проба для отбора реагирующих животных и установления диагноза на туберкулез / А.Х. Найманов, Г.И. Устинова, Е.П. Вангели, О.Д. Кучерук, В.М. Калмыков, Н.Г. Толстенко // Ветеринария. – 2020. – № 4. – С. 3-6.

4. Dean, A.S. A roadmap for zoonotic tuberculosis: A One Health approach to ending tuberculosis / A.S. Dean, S. Forcella, F. Olea-Popelka [et al.] // *Lancet Infect. Dis.*, 2018. – P. 137-138.

5. Global Tuberculosis Report. 2018. https://www.who.int/tb/publications/global_report/en.

6. Khaertynov, K.S. Extraction and serological properties of *Mycobacterium* cell surface and excreted proteins /

K.S. Khaertynov, A.R. Valeeva, N.G. Urazov [et al.] // *BioNanoScience*. – 2018. – Vol. 8. – Is. 1. – P. 459-466.

7. Mingaleev, D.N. Cartographic assay of nozoareal tuberculosis of cattle in the Republic of Tatarstan / D.N. Mingaleev, A.G. Hisamutdinov, M.A. Efimova, A.I.Trubkin, J.R. Kamalieva // *BIO Web of Conferences* 17. – 2020. – https://www.bioconferences.org/articles/bioconf/full_html/2020/01/bioconf_fies2020_00115/bioconf_fies2020_00115.html

8. Towbin, H. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. / H. Towbin, T. Staehelin, J. Cordon // *Biochemistry*. – 1979. – Vol. 76. – P. 4350-4354.

9. Laemmli, U.K. Cleavage structural proteins during the assembly of the bacteriophage T4 / U.K. Laemmli // *Nature*. – 1970. – Vol. 227. – P. 680-685.

ПРЕПАРАТИВНОЕ ВЫДЕЛЕНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИГЕНОВ ПОЛНОГО КЛЕТОЧНОГО ЛИЗАТА M. BOVIS.

Москвичева А.В., Хаертынов К.С., Хаммадов И.Н., Шуралев Э.А., Ефимова М.А.,
Равилов Р.Х.
Резюме

Туберкулез крупного рогатого скота является серьезной проблемой для сельского хозяйства во всем мире и наносит огромный экономический ущерб. В то же время инфекции, вызванные *Mycobacterium bovis*, не только влияют на животноводство и пищевую промышленность, но также опасны для здоровья населения, так как *M. bovis* стали часто выделять как патоген туберкулеза особенно у пациентов с различным иммунным дефицитом. Ситуация осложняется отсутствием простых и доступных методов диагностики туберкулеза крупного рогатого скота, что значительно препятствует мониторингу инфекции и применению соответствующих профилактических мер. Серологические тесты из-за их относительно дешевой стоимости, экспрессности, достаточно высокой чувствительности и специфичности способны конкурировать с аллергическим тестом во время массовых обследований коров. В настоящем исследовании приводим результаты по изучению антигенной структуры микобактерий и выделению наиболее специфичных антигенных компонентов из лизата клеточной стенки *M. Bovis*, разрушенных на приборе Fast Prep 24. Разработанный метод позволяет получать серологически активную антигенную фракцию с высокой степенью чистоты с молекулярной массой 28 кДа.

PREPARATIVE ISOLATION OF SPECIFIC ANTIGENS OF FULL CELL LYSATE M. BOVIS

Moskvicheva A.V., Khaertynov K.S., Khammadow N.I., Shuralev E.A., Efimova M.A.,
Ravilov R.Kh.
Summary

Bovine tuberculosis is a serious problem for agriculture all over the world and causes huge economic losses. At the same time, infections caused by *Mycobacterium bovis* not only affect animal husbandry and the food industry, but also pose a threat to public health, as *M. bovis* is often isolated as a pathogen of tuberculosis, especially in patients with various immune deficiencies. The situation is aggravated by the lack of simple and accessible methods for diagnosing tuberculosis in cattle, which significantly impedes the monitoring of infection and the application of appropriate preventive measures. Serological tests, due to their relatively cheap cost, rapidity, rather high sensitivity and specificity, are able to compete with the allergic test during mass examinations of cows. In the present study, we present the results on the study of the antigenic structure of mycobacteria and the isolation of the most specific antigenic components from the lysate of the *M. Bovis* cell wall destroyed on the Fast Prep 24 device. The developed method allows obtaining a serologically active antigenic fraction with a high degree of purity with a molecular weight of 28 kDa.