

УДК 619:616-002.5:616.9-092.9:577.112.083  
**Функционирование и серологическая  
активность экстракта клеток и  
продуктов экспрессии *Mycobacterium  
bovis***

**Шуралев Э.А., Хаертынов К.С., Валеева А.Р.,  
Александрова Н.М., Мукминов М.Н.**

Казанская государственная медицинская академия –  
филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, г. Ка-  
зань;

ФГАОУ ВО "Казанский (Приволжский) федеральный  
университет,

г. Казань;

ФГБНУ "Федеральный центр токсикологической, ради-  
ационной и биологической безопасности", г. Казань

**Аннотация.** Целью данной работы было определение серологической активности различных антигенных фракций, полученных из штамма *M.bovis* Bovinus-8 методом иммуноблота. Исследованию подвергали экстракт клеток микобактерий и выделенные продукты экспрессии из супернатанта жидкой питательной среды после 3-х месячно-

го культивирования. Серологическую активность антигенов изучали в реакции иммуноблот с гипериммунной сывороткой крови кроликов.

Получены антигены из экстракта клеток с широким спектром структурных компонентов, распределяющимся в диапазоне молекулярных масс от 200 до 6,5 кДа, и продукты экспрессии культивируемых микобактерий *M.bovis* с диапазоном от 200 до 16,1 кДа. В результате проведенных исследований выявлено, что антигенные препараты как из экстракта клеток *M.bovis* Bovinus-8, так и их секреторные продукты, охватывают широкий спектр диагностически значимых антигенов, что в свою очередь не допускает проявления ложных отрицательных результатов при оценке специфического гуморального противотуберкулезного иммунитета. По результатам иммуноблота серологическую активность с гипериммунной сывороткой крови проявили фракции антигена, полученные из жидкой культуральной среды после культивирования *M.bovis* Bovinus-8 (продукты экспрессии), с молекулярными массами 50,5, 29,4, 22,4 и 20,6 кДа, а также фракции антигена из экстракта клеток в диапазоне от 82,3 до 6,5 кДа.

**Ключевые слова:** туберкулез, антигены, электрофорез, иммуноблот.

### Fractionation and serological activity of *Mycobacterium bovis* cell extract and secondary metabolites

Shuralev E.A., Khaertynov K.S., Valeeva A.R., Aleksandrova N.M., Mukminov M.N.

The aim of this work was to determine the serological activity of various fractions of the strain *M. bovis* Bovinus-8 using the method of immunoblot. The extract of mycobacteria cells and their expression products isolated from the supernatant were used as antigens for serological studies. Serological activity of the antigen was studied in the reaction of immunoblotting with rabbit hyperimmune serum.

Antigens from the cell extracts with a wide range of structural components that span a range of molecular masses from 200 to 6.5 kDa, and expression products of mycobacteria *M. bovis* ranges from 200 to 16.1 kDa were isolated. It was found that the range of preparators obtained from cell extracts of *M. bovis* Bovinus-8 and their expression products covers the range of diagnostically relevant antigens, which prevents obtaining false-negative results in the evaluation of specific humoral immunity at the tuberculosis pathogenesis. The fractions of the antigens obtained from expression products of *M. bovis* Bovinus-8, with a molecular mass of 50.5, 29.4, 22.4 and 20.6 kDa, and antigenic material from the cell extracts which were active in the range from 82.3 to 6.5 kDa interacted with the positive hyperimmune serum.

**Key words:** tuberculosis, antigens, electrophoresis, immunoblot.

Иммунологические методы в диагностике инфекционных заболеваний требуют использования биоматериалов с высокой чувствительностью и специфичностью. Проведение научных исследований в области профилактики и иммунизации туберкулеза создает предпосылки создания эффективных средств диагностики этого заболевания [1–3], а посредством мультианалитического подхода усиливается их чувствительность и специфичность [4,5]. Динамика антителообразования имеет свои особенности, что проявляется в синтезе специфических антител к определенным микобактериальным антигенам в зависимости от стадии развития туберкулезного инфекционного процесса [6–8]. В связи с этим особое внимание уделяется к получению и синтезу антигенов, наличие которых максимально отражает все стадии развития заболевания [9–11].

Целью данной работы было определение серологической активности различных фракций штамма *M. bovis* Bovinus-8 методом иммуноблота.

#### Материалы и методы

Суспензии клеток *M. bovis* Bovinus-8 смешивали с небольшим количеством Фрейнда из расчета 0,5 мл концентрированной суспензии клеток микобактерий, содержащей

10 ЕД микробных тел/мл, 1 мл стерильного физиологического раствора и 1,5 мл адьюванта. Для получения активной, специфичной и высокоаффинной сыворотки кроликов массой 2,5–3 кг, которых иммунизировали внутривенно многократно вдоль спины (по 5 точек с каждой стороны). В каждую точку вводили по 0,1 мл подготовленного антигенного материала (суспензии клеток *M. bovis* Bovinus-8). Через 6–10 недель после первого цикла проводили бустер-инъекцию путем подкожного введения суспензией клеток в нижнюю треть шеи с обеих сторон – по 0,5 мл. На 10 сут после повторного введения суспензии клеток осуществляли тотальную забор крови с последующим отделением гипериммунной сыворотки.

Исследования проводили экстракт клеток микобактерий и выделенные из жидкости культуральной среды продукты экспрессии (секреторные антигены). Опилтые клетки от остатков питательной среды разрушали на приборе Fast Prep-24 (MP Biomedicals) с использованием пробирок Blue Lysing Matrix (Tube 2,0 ml) (MP Biomedicals). Белковый спектр возбуждения изучали методом электрофореза в 12,5% полиакриламидном геле (ПААГ) с последующим окрашиванием кумалом крео-синем и азотнокислым серебрком.

Серологическую активность указанных фракций антигенного материала определяли методом иммуноблота [12]. С этой целью проводили перенос материала, полученного в результате фракционирования в полиакриламидном геле, на нитроцеллюлозную мембрану (Sartorius nitrocellulose membrane 0,45 μm). Результаты электрофореза и иммуноблота обрабатывали визуализировали на приборе GelDoc XR+ System (BioRad), с последующей их обработкой с использованием программы Image Lab версия 5.1.

#### Результаты и обсуждение

Активность иммунной сыворотки оказывает существенное влияние на результат серологических реакций. Уровень специфических антител зависит от количества факторов: качества и количества вводимого антигена, способа и кратности введения, примененных адъювантных веществ. Подбор адекватной схемы иммунизации позволяет в короткие сроки получить сыворотку с высоким титром антител. Иммунный ответ на каждый индивидуальный антиген специфичен. При этом прослеживается зависимость антигеноза от дозы вводимого антигена, кратности и способа введения.

У кроликов, подвергнутых гипериммунизации, в местах введения суспензии культуры *M. bovis* Bovinus-8 наблюдали воспалительную реакцию. При внутривенной иммунизации в месте введения образовывался инфильтрат, острый гиперемия с центральной зоной ишемии, далее переходящий в некроз. Через 7 недель отмечалась нормализация процесса. При подкожном введении наблюдалось увеличение регионарных лимфатических узлов.

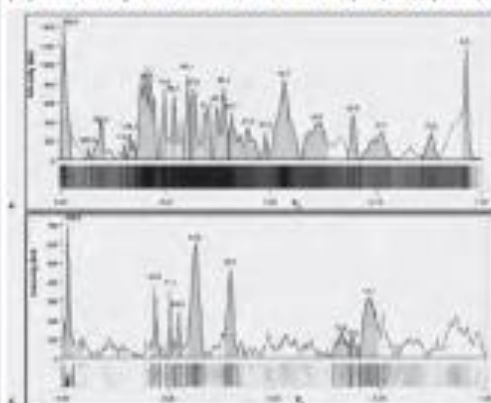


Рис. 1. Денситометрическая электрофорезная картина экстракта клеток и супернатанта штамма *M. bovis* Bovinus-8. А – экстракт клеток микобактерий; Б – супернатант клеток *M. bovis* Bovinus-8.

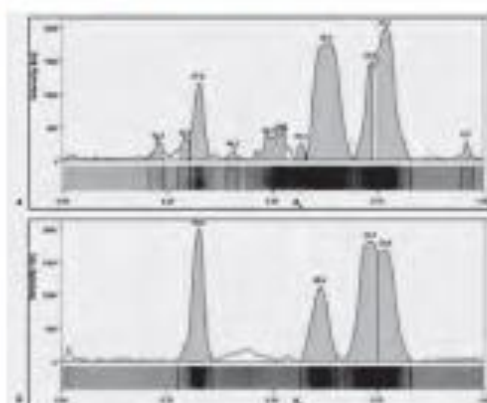


Рис. 2. Денситометрическая иммуноблотинговая картина экстракта клеток штамма *M. bovis* Bovinus-8. А – экстракт клеток *M. bovis* Bovinus-8; Б – супернатант клеток *M. bovis* Bovinus-8.

В ходе проведения фракционирования методом электрофореза был выявлен широкий спектр структурных компонентов *M.bovis Bovinus-8*, который распределялся в диапазоне с молекулярной массой от 200 до 6,5 кДа для экстракта клеток и от 200 до 16,1 кДа для продуктов эспрессо (рис. 1). Полученные результаты указывают на широкий спектр выявленных потенциальных антигенов как клеточной стенки, так и секретированных *M.bovis Bovinus-8* продуктов.

При анализе серологической активности полученных фракций в иммуноблоте выявили несоответствие с результатами аналитического электрофореза. С птермальной сывороткой реагировали положительно не все фракции. Так, фракции антигенов из экстракта клеток проявляли активность в зоне от 82,3 до 6,5 кДа, а фракции, полученные из жидкой культуральной среды (продукты эспрессо), имели молекулярную массу 50,5, 29,4, 22,4 и 20,6 кДа (рис. 2).

Полученные результаты позволяют предположить, что, вероятнее всего, антигенной активностью обладают полидные структуры, а не белковые. В этом заключается особенность строения микобактериальной клеточной стенки. Однако спектр полученных препаратов оказывает комплекс диагностическое значение антигенов, что исключает получение ложноположительных результатов при использовании этих антигенов для оценки специфического гуморального иммунитета при туберкулезе.

#### Заключение

Получены антигены из экстракта клеток с широким спектром структурных компонентов, распределенных в диапазоне с молекулярной массой от 200 до 6,5 кДа, и продукты эспрессо микобактерий *M.bovis* – от 200 до 16,1 кДа. Проведенными исследованиями выявлено, что антигенные препараты как из экстракта клеток *M.bovis Bovinus-8*, так и из секреторных компонентов, оказывают широкий спектр диагностическое значение антигенов, что в свою очередь не допускает проявления ложных отрицательных результатов при оценке специфического гуморального туберкулезного иммунитета. Серологическую активность с птермальной сывороткой крови, полученной против *M.bovis Bovinus-8*, проявила фракция антигена, полученного из жидкой питательной среды (продукты эспрессо) в течение 3 месячного культивирования *M.bovis Bovinus-8* с молекулярной массой в диапазоне убывания 50,5, 29,4, 22,4 и 20,6 кДа, а также антигенный материал из экстракта клеток, который проявил активность в диапазоне от 82,3 до 6,5 кДа.

#### Список литературы

1. Гусюкин А.М., Хисматуллина Н.А., Хаертынова К.С. и др. Использование антигенов микобактерий *M.bovis* BCG-1, *M.bovis*-8 и *M.bovis* Vallee-68 для иммуноферментного анализа сывороток крови крупного рогатого скота // Труды

Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко. - 2013. - Т. 77. - С. 200-203.

2. Цибутько А.П., Хаертынова И.М., Уразаев Н.Г., Хаертынова К.С. Скрининг диагностического потенциала нативных белковых фракций *Mycobacterium tuberculosis* методом иммуноблоттинга // Клиническая лабораторная диагностика. - 2016. - Т. 61, № 2. - С. 90-102.

3. Сопиков Д.В., Жардев А.В., Андриено В.Г., Давытов Б.Б. Иммуноэлектрографическая серодиагностика туберкулеза с использованием конъюгата коллоидное золото-антиген // Биотехнология. - 2015. - № 2. - С. 76-81.

4. Шуралева Э.А. Сравнительный анализ тест-систем для диагностики туберкулеза у овец // Ветеринарный врач. - 2012. - № 5. - С. 30-33.

5. Шуралева Э.А., Ндрейшаминиев Э.В., Мулюмов М.Н. К вопросу серологической диагностики туберкулеза крупного рогатого скота // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. - 2012. - Т. 211. - С. 202-206.

6. Шуралева Э.А., Мулюмов М.Н., Валиев К., Кларк Д. Выявление специфических антигенов в капилляри при туберкулезе // Ветеринария. - 2013. - № 8. - С. 54-57.

7. Шуралева Э.А. Образование антигена северного оленя, инфицированного *Mycobacterium bovis* // Ветеринария. - 2016. - № 9. - С. 18-20.

8. Валиев Р.Ш., Валиев Н.Р., Хаертынова И.М., Хаертынова К.С. Анти-ТБ антигена класса IgG в сыворотке крови больных туберкулезом, ВИЧ-инфекцией и при их сочетании // Туберкулез и болезни легких. - 2014. - Т. 91, № 9. - С. 14-15.

9. Хисматуллина Н.А., Хаертынова К.С., Шуралева Э.А., Гусюкин А.М., Аюлдаев Р.М., Найманов А.Х. Получение антигенов микобактерий *M.bovis* BCG-1, *M.bovis*-8 и *M.bovis* Vallee для дифференциации поствакцинальных и постинфекционных антигенов // Ветеринарная медицина. - 2013. - № 97. - С. 558-560.

10. Шуралева Э.А. Микобактериальные антигены: синтетические пептиды и рекомбинантные белки // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. - 2013. - Т. 216. - С. 403-407.

11. Дятлова В.И., Богун А.Г., Бихаев С.Ф. Оценка серодиагностического потенциала рекомбинантных антигенов *Mycobacterium tuberculosis*, полученных в разных экспрессионных системах // Биотехнология. - 2014. - № 1. - С. 72-78.

12. Алфредо Э., Вершенна В.М., Хаертынова К.С., Герасимова С.В., Уразаев Н.Г., Хаертынова И.М. Способ получения антигена с молекулярной массой 45 кДа из *Mycobacterium tuberculosis* // Фундаментальные исследования. - 2013. - № 1-1. - С. 18-22.

ЖУРНАЛ «ВЕТЕРИНАРИЯ И КОРМЛЕНИЕ»  
ОКАЗЫВАЕТ НАУЧНЫМ, ГОСУДАРСТВЕННЫМ  
И КОММЕРЧЕСКИМ ПРЕДПРИЯТИЯМ УСЛУГИ  
ПО ДОПЕЧАТНОЙ ПОДГОТОВКЕ И ИЗГОТОВЛЕНИЮ

- ✦ КНИГ,
- ✦ МЕТОДИЧЕК,
- ✦ БРОШЮР,
- ✦ ЛИСТОВОК,
- ✦ БУКЛЕТОВ,
- ✦ КАЛЕНДАРЕЙ
- ✦ И ДРУГОЙ ПОЛИГРАФИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ.

(8-816) 819-48-13  
vetkorm@mail.ru



БЮДЖЕТНЫЕ ЦЕНЫ, ВЫСОКОЕ КАЧЕСТВО, ОТВЕТСТВЕННОЕ ИСПОЛНЕНИЕ  
ДОСТАВКА ВО ВСЕ РЕГИОНЫ РОССИИ.