

Таблица 4 – Накопление лептоспир в среде ССФР в зависимости от концентрации фактора роста

Наименование штаммов	Накопление лептоспир (млн.м.к./см ³) в среде, содержащей фактор роста, %				
	0	2	5	10	20
Grippothyphosa	90,4±0,8	212±4	624±32	685±40	704±36
Icterohaemorrhagia	92,8±1,4	176±8	588±20	672±28	688±25
Canicola	82,6±1,0	182±5	560±18	653±22	670±20
Tarassovi	96,2±1,4	208±6	638±22	705±20	726±18
Sejroe	85,0±1,2	194±4	632±20	689±20	712±24
Pomona	94,6±1,5	204±5	636±24	716±30	742±32

Включение в среду более 10% регулятора роста экономически невыгодно, добавление менее 5 % – приводит к существенному снижению интенсивности размножения лептоспирозных бактерий.

Титр антител в сыворотках крови кроликов к лептоспирам серогрупп Pomona, Tarassovi, Grippothyphosa, Sejroe, Canicola и Icterohaemorrhagia, выращенных на среде, содержащей 5–10% фактора роста, составил соответственно 1:1600, 1:800, 1:3200, 1:1600, 1:800 и 1:800.

Из результатов, сведенных в таблице 5, видно, что среда ССФБ₃, содержащая фактора биосинтеза 2–5%, обеспечивает накопление лептоспир в количестве 712–904 млн.м.к./см³.

Таблица 5 – Накопление лептоспир в среде ССФБ в зависимости от концентрации фактора биосинтеза

Наименование штаммов	Накопление лептоспир (млн.м.к./см ³) в среде, содержащей фактор биосинтеза, %				
	0	1	2	5	10
Grippothyphosa	90,4±0,8	412±8	736±12	820±10	842±16
Icterohaemorrhagia	92,8±1,4	426±6	755±10	806±12	810±10
Canicola	82,6±1,0	366±8	704±14	752±14	766±18
Tarassovi	96,2±1,4	436±12	822±20	904±20	922±22
Sejroe	85,0±1,2	378±12	735±18	808±20	832±24
Pomona	94,6±1,5	340±15	712±16	820±22	872±26

При концентрации фактора биосинтеза в среде менее 2% отмечается существенное снижение интенсивности роста всех серогрупп лептоспир. Включение в состав питательной среды более 5% фактора биосинтеза экономически нецелесообразно.

Титр антител в сыворотках крови кроликов к лептоспирам серогрупп Pomona, Tarassovi, Grippothyphosa, Sejroe, Canicola и Icterohaemorrhagia составил соответственно 1:1600, 1:800, 1:1600, 1:1600, 1:800 и 1:1600.

Заключение. По результатам проведенной работы установлено, что альбуминовая питательная среда обеспечивает интенсивное накопление лептоспир всех испытанных серогрупп лептоспир, но пригодна только для однократного посева.

Для вторичной расплодки альбуминовая среда непригодна, так как снижает антигенную активность лептоспир.

Предлагаемые модифицированные сывороточные среды, содержащие 2–5% фактора биосинтеза, обеспечивают накопление лептоспир в количестве 712–904 млн.м.к./см³ с высокой антигенной активностью.

Литература. 1. Волина, Е.Г. Культивирование лептоспир в жидкой питательной среде с лизированной кроличьей кровью / Е.Г. Волина, Л.Е. Саруханова // ЖМЭИ. – 2001. – № 1. – С. 3–5. 2. Зайцев, В.В. Разработка метода концентрирования лептоспир / В.В. Зайцев, Г.Э. Дремач // Ученые записки УО ВГАВМ. – Витебск: УО ВГАВМ, 2007. – Т. 43. – Вып. 2. – С. 45–48. 3. Зайцева, А.В. Среда для выращивания лептоспирозных бактерий / А.В. Зайцева, Г.Э. Дремач // Патент РБ № 7321. – 2005. 4. Ситьков, В.И. Изготовление и испытание малобелковой питательной среды для культивирования лептоспир / В.И. Ситьков, В.И. Бобрышев, И.К. Тутов // Сборник науч. трудов Ставропольской ГСХА. – Ставрополь, 1994. – С. 42–45. 5. Ситьков, В.И. Новая питательная среда для культивирования лептоспир / В.И. Ситьков, В.И. Бобрышев, И.К. Тутов // Материалы Междунар. конф. – Барнаул, 1995. – С. 98–99. 6. Ситьков, В.И. Научные и практические основы промышленного производства и применения вакцин: Дисс. ... д-ра вет. наук / В.И. Ситьков. – М., 1997. – С. 29–33. 7. Соболева, Г.Л. Рост лептоспир в альбуминовой питательной среде / Г.Л. Соболева // Биологические препараты против инфекционных болезней животных. – М., 1981. – С. 51–54. 8. Справочник ветеринарного лаборанта / Ф.З. Андросов [и др.]; под ред. В.Я. Антонова. – М.: Колос, 1981. – С. 37.

Статья поступила 24.05.2009 г.

УДК 619:579.842.11

ПОЛУЧЕНИЕ АДГЕЗИВНЫХ АНТИГЕНОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ КОЛИБАКТЕРИОЗА E. coli

Зайцев В.В., *Дремач Г.Э., *Горбунова И.А., Билецкий М.О.

УП «Витебская биофабрика», г. Витебск, Республика Беларусь

*УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Проведено исследование по получению адгезивного антигена из баксуспензий эшерихий, отделенных от питательного раствора путем очистки и концентрирования на мембранах УПМ-300 и УПМ-5, что позволяет получить очищенный препарат, удельная активность которого в 2–4 раза выше, чем неочищенного.

Research on reception adhesiv an antigene from bacsuspension escherichiy, separated from a nutritious solution, by clearing and concentrating on membranes УПМ-300 and УПМ-5 is conducted that the cleared preparation, which specific activity in 2-4 times above, than not cleared allows to receive.

Введение. В настоящее время большое значение придается изучению адгезивных и токсигенных свойств эшерихий. Адгезивность – это способность бактериальных клеток при помощи специальных органелл (пилей, фимбрий) прикрепляться к эпителию слизистой оболочки кишечника.

Фимбрии (пили) – поверхностные структуры, состоящие из полипептидных субъединиц, обеспечивающие колонизацию кишечника эшерихиями и создающие возможность для непосредственного воздействия энтеротоксинов на энтероциты, вследствие чего развивается заболевание, протекающее в виде диареи [5, с. 7; 8]. У фимбрий отмечена тенденция к скручиванию и образованию узлов и агрегатов различного размера. Фимбрии легко отделяются от клетки, поэтому могут быть обнаружены как в связанном, так и в свободном состоянии.

Колонизация возбудителем тонкого кишечника – обязательный этап развития колибактериоза любой формы. Колонизацию тонкого отдела кишечника осуществляют эшерихии, имеющие поверхностные антигены K88, K99, 987P, F-41 и др. Эти антигены различаются в химическом, физическом, физиологическом отношении, а также серологически [1].

Имеются штаммы E.coli (как патогенные, так и непатогенные), продуцирующие антибиотические вещества – колицины, подавляющие рост некоторых других штаммов эшерихий и не действующие на бактерии других видов [10].

Токсигенность – способность выделять термостабильный и термолабильный энтеротоксины, которые повреждают эпителий кишечника, стимулируют секрецию жидкости.

Адгезины – факторы прикрепления E.coli к соответствующим рецепторам энтероцитов тонкого кишечника (K88 (F4) – в форме ab, ac, ad, 987P (F6), K99 (F5), F41, F165, F42, CS 1541) [2]. Все эти адгезины входят в состав фимбрий или фимбриоподобных образований, посредством которых и осуществляется связывание.

Фимбриальные адгезины – один из факторов патогенности возбудителя. Данные органеллы выполняют роль пускового механизма в инфекционном процессе, обеспечивая микроорганизмам способность прикрепляться и колонизировать на эпителиальной поверхности [3].

Адгезивные антигены представляют собой выросты нитевидной формы, белковой природы, радиально отходящие от клеточной стенки. Кроме того, антигены обладают высокой иммуногенностью [12].

Адгезия (прилипание) осуществляется благодаря участию как специфических рецепторов, так и неспецифических факторов (гидрофобное и электрическое взаимодействие) [5, с.7]. Агглютинационная способность одних адгезивных антигенов подавляется D-маннозой. Они получили название маннозочувствительных фимбрий 1-го типа, т.е. неспецифические адгезины. Те штаммы кишечной палочки с адгезивными антигенами, у которых реакция иммуноадгезивной геагглютинации не тормозится D-маннозой, названы маннозоустойчивыми фимбриями, т.е. специфическими адгезинами. Неспецифические адгезины имеются у большинства сапрофитных и энтеропатогенных изолятов кишечной палочки.

Адгезивный антиген K99 характерен для кишечных палочек, энтеропатогенных для телят и ягнят. Антиген K99 проявляет высокую устойчивость к антибактериальным препаратам [6]. У здоровых телят E. coli K99 встречаются редко. Эшерихии с антигеном K99 заселяют средний и задний отделы тонкого кишечника. Штаммы кишечной палочки, имеющие антиген K99, почти в 100% случаев продуцируют термостабильный энтеротоксин [13]. Адгезин K99 образует фимбрии спиралевидной формы с диаметром 4,8 нм [14].

Адгезивный антиген K88 чаще выделяют у свиней. Он вызывает колидиарею. Антиген K88 обнаруживают у больных животных в 56 – 70% случаев, а у здоровых – лишь в 3%. В кишечнике части поросят бактерии с K88 не могут прикрепляться к энтероцитам из-за отсутствия на них нужных рецепторов. Эта особенность эпителиальных клеток тонкой кишки передается по наследству. Однако на резистентных к фимбриям K88 клетках эпителия хорошо прилипают бактерии с K99 [5, с.10]. У адгезина K88 различают следующие сероварианты: K88ab, K88ac, K88ad [9].

Адгезивный антиген 987P находят на бактериях, выделенных от свиней. Такие бактерии не способны агглютинировать эритроциты. По сравнению с E. coli K88 бактерии с антигеном 987P более активно прилипают к эпителию и усиленно колонизируют слизистую оболочку тонкой кишки. Фимбрии 987P и 1-го типа морфологически сходны. Белковые субъединицы фимбрий данного адгезина имеют N-концевую кислоту – аланин.

Адгезивный антиген F41 фиксируется на эритроцитах теленка. Адгезия бактерий с антигеном F41 не зависит от присутствия маннозы, а подавляется формальдегидом и предварительным нагреванием бактериальных клеток. Отдельные штаммы бактерий содержат как антиген K99, так и антиген F41 [5, с.10].

Причиной заболевания и гибели поросят и телят в течение двух недель после опороса или отела в 80% случаев является неонатальная колидиарея [4].

Ведущая роль в развитии колидиареи новорожденных поросят, телят принадлежит энтеротоксигенным штаммам эшерихий с адгезивными антигенами K88, K99, 987P, F41 [7].

Создание сыворотки, в состав которой входят адгезивные антигены, блокирует процесс прилипания патогенных бактерий к эпителиальным клеткам проксимальной части слизистой кишечника и тем самым препятствует развитию инфекции, обеспечивая защиту животного от колибактериоза.

В результате вышеуказанного нами были получены и изучены препараты адгезинов K88, K99, F41, 987P. Эшерихий получали на питательных средах, разработанных по определенной рецептуре на основе гидролизатов компонентов крови, мясокостной муки, белков сыворотки молока. Так же получали и изучали биомассу производственных штаммов.

Целью исследований явилась разработка метода очистки и концентрирования адгезивных антигенов эшерихий с использованием мембранной технологии.

Адгезивные антигены обладают разными физико-химическими свойствами (молекулярная масса, конфигурация молекул), а их растворы, полученные после отделения биомассы эшерихий, так же различаются по содержанию сухих веществ, количеству растворенных и взвешенных частиц, вязкости, наличию в растворе низкомолекулярных примесей. Поэтому процесс ультрафильтрации необходимо разрабатывать индивидуально для каждого вида адгезина.

В задачу исследований входило: получение биологически активных адгезивных антигенов E.coli K88, K99, F41, 987P; выбор ультрафильтрационных мембран, обеспечивающих оптимальную селективность и производительность процесса, а также изучение влияния некоторых факторов на процесс концентрирования адгезинов методом ультрафильтрации.

Материал и методы. В качестве источников адгезивных антигенов K88, K99, F41 и 987P использовали соответствующие штаммы эшерихий, выращенных на специально разработанных средах.

Для очистки и концентрирования адгезинов испытывали мембраны на основе полисульфонамида: УПМ-5, УПМ-20, УПМ-50 (ЗАО "Владисарт").

Эффективность разных мембран оценивали по их производительности

$$G=V/St;$$

где G – производительность мембран $dm^3 / m^2 \text{ ч}$;

S – поверхность фильтрации, m^2 ;

t – время фильтрации, ч;

V – объем фугата, dm^3 ,

а также по их селективности, которую рассчитывали по формуле в %:

$$U=(Au-An/An) \cdot 100\%$$

где Au – активность адгезина в РИД в исходном растворе;

An – активность адгезина в РИД в пермеате.

Для изучения влияния pH на процесс ультрафильтрации этот показатель в исходном экстракте доводили до значения 6,0 – 9,0, что соответствует зоне pH – стабильности препаратов.

Кратность концентрирования определялась соотношением:

$$K=Vu/Vk$$

где Vu – исходный объем фугата, dm^3 ;

Vk – объем концентрата, cm^3 .

С целью изучения влияния на процесс ультрафильтрации дополнительной очистки фугата перед концентрированием использовали предварительную очистку на микрофильтрационных мембранах с размерами пор 3, 1, 0,45 и 0,22 мкм.

Активность адгезивных антигенов контролировали в РИД, РПГА и РКоА.

Результаты исследований. С учетом того, что экстракцию адгезивных антигенов производили непосредственно из баксуспензии эшерихий в культуральной среде, то раствор после отделения биомассы имеет весьма сложный химический состав.

В нем содержатся остатки питательной среды, ферментативно активные и неактивные белки, бактериальные клетипродуценты, которые полностью не отделяются при центрифугировании.

В связи с вышеуказанным были проведены исследования влияния дополнительной очистки раствора адгезинов от взвешенных частиц на показатели процесса ультрафильтрации.

Для дополнительной очистки использовали фильтрующие элементы с различным размером пор: картон фильтровальный, фильтр-пластины "Ф" и фильтр ФПКН-3-0,5.

Полученные фильтраты далее очищали с использованием мембран с разными характеристиками. Проведенные исследования показали, что наиболее эффективна предварительная очистка на фильтре ФПКН-3-0,5, которая позволила снизить содержание взвешенных веществ в растворе, что в конечном итоге позволяет в 2,0 – 2,4 раза увеличить скорость ультрафильтрации.

Следует отметить, что раствор адгезинов содержит низкомолекулярные примеси, в том числе экстрагенты.

Нами были изготовлены образцы адгезивного антигена:

Способ №1 – адгезивный антиген готовили без очистки из взвеси эшерихий, отделенной от питательного раствора;

Способ №2 – адгезин готовили из баксуспензии эшерихий, отделенной от питательного раствора, очищали с помощью мембран УПМ-5 и УПМ-300;

Способ №3 – адгезин готовили из баксуспензии эшерихий, не отделенной от питательного раствора, очищали с помощью мембран УПМ-5 и УПМ-100;

Способ №4 – адгезин готовили из баксуспензии эшерихий, не отделенной от питательного раствора, очищали и концентрировали с помощью мембран УПМ-300 и УПМ-5;

Способ №5 – адгезин готовили из баксуспензии эшерихий, отделенной от питательного раствора, очищали и концентрировали с помощью мембран УПМ-5 и УПМ-50;

Способ №6 – адгезин готовили из 100 млрд.м.т./см³ взвеси эшерихий, не отделенной от питательного раствора, очищали и концентрировали с помощью мембран УПМ-100 и УПМ-5.

Результаты изучения агглютинирующей активности антигенов, приготовленных разными способами, представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Агглютинирующая активность антигенов, приготовленных разными способами

Способ получения продукта	Активность антигенов в РИД	Титр антител в РА			
		K88	K99	987P	F41
Способ №1	1:8	1:200	1:100	1:200	1:200
Способ №2	1:16	1:400	1:400	1:400	1:400
Способ №3	1:8	1:200	1:200	1:200	1:200
Способ №4	1:32	1:800	1:800	1:800	1:800

Продолжение таблицы 1

Способ №5		1:8	1:200	1:100	1:200	1:200
Способ №6		1:16	1:400	1:200	1:200	1:400
Способ (контроль)	согласно НД	1:8	1:200	1:200	1:200	1:200

Из результатов, указанных в таблице 1, видно, что получение адгезинов эшерихий с высокой биологической активностью обеспечивает способ №4.

Таким образом, для повышения выхода и активности адгезинов экстракцию эшерихий проводят без отделения от культуральной среды, полученный экстракт очищают на фильтре ФПКН-3-0,5, а далее их нужно доочищать и концентрировать на мембранах УПМ-300 и УПМ-5.

Заключение. По результатам проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Получение адгезивного антигена необходимо осуществлять из баксуспензии эшерихий, отделенной от питательного раствора, путем очистки и концентрирования с помощью мембран УПМ-300 и УПМ-5.
2. Разработанные условия очистки и концентрирования адгезивных антигенов эшерихий позволяют получить очищенный препарат, удельная активность которого в 2 - 4 раза выше, чем неочищенного.

Литература: 1. Адгезивные антигены и энтеротоксины эшерихий, патогенных для молодняка сельскохозяйственных животных / Н.А. Соколова [и др.] // *Ветеринария*. – 1989. - № 5. – С. 33 – 35. 2. Волков, И.А. Вакцинопрофилактика колибактериоза свиней / И.А. Волков // *Промышленное и племенное свиноводство*. – 2008. - № 2. – С.44 – 45. 3. Головкин, А.Н. Фимбриальные адгезины энтеротоксигенных эшерихий / А.Н. Головкин // *Ветеринария*. – 1993. - № 9. – С. 31 – 32. 4. Головкин, А.Н. Средства диагностики и специфической профилактики колибактериоза нового поколения / А.Н. Головкин, В.А. Ушкалов // *Ветеринарные и зооинженерные проблемы животноводства*. – Витебск, 1996. – 92 с. 5. Гутковский, А.А. Колибактериоз телят и поросят / А.А. Гутковский, Г.Л. Дворкин // *Мн.: Ураджай*, 1989. – 160 с. 6. Зелютков, Ю.Г. Инфекционные энтериты новорожденных телят / Ю.Г. Зелютков // *монография*. – Витебск: УО ВГАВМ, 2006. – 188 с. 7. Инфекционные болезни животных / Б.Ф. Бессарабов, А.А. Вашутин, Е.С. Воронин [и др.] // *М.: КолосС*, 2007. – 671 с. 8. Курашвили, Т.К. Обнаружение адгезивного антигена F41 у выделенных от поросят штаммов *E. COLI* / Т.К. Курашвили, Н.А. Соколова // *Ветеринария*. – 1991. – № 10. – С. 31 – 33. 9. Курашвили, Т.К. Адгезивный антиген / Т.К. Курашвили, Н.А. Соколова // *Ветеринария*. – 1991. - № 3. – С. 26 – 27. 10. Куриленко, А.Н. Колибактериоз молодняка / А.Н. Куриленко // *Ветеринария сельскохозяйственных животных*. – 2005. - № 10. – С. 58 – 64. 11. Ломако, Ю.В. Адгезивные и энтеротоксигенные свойства штаммов кишечной палочки, выделенных у больных колибактериозом телят / Ю.В. Ломако // *Ветеринарная наука – производству: научные труды*. – Минск, 2002. вып.36. – С. 91 – 95. 12. Специфическая профилактика эшерихиоза животных / Ю.А. Малахов [и др.] // *Ветеринария*. – 1993. - № 8. – С. 5 – 7. 13. Gaastra, W. Host specific fimbrial adhesins et noninvasive enterotoxigenic *E. coli* strains / W. Gaastra, F. Graaf // *Microbiol. Rev.* – 1982. – V. 46, N 2. – P. 129 – 161. 14. Isaacson, R.E. *Escherichia coli* 987P pili: purification and partial characterization / R.E. Isaacson, P. Richter // *J. Bacteriol.* – 1981. – Vol.146. – P. 784 – 749.

Статья поступила 23.02.2010 г.

УДК 619:616.921.5:636.4

СПОСОБ СТАБИЛИЗАЦИИ ЭРИТРОЦИТОВ ДЛЯ ПОСТАНОВКИ РЕАКЦИИ ЗАДЕРЖКИ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ

Корочкин Р.Б., Прудников В.С., Вербицкий А.А., Прудников А.В.

Учреждение Образования «Витебская государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Авторами предложен способ стабилизации эритроцитов, предназначенных для постановки реакции задержки гемагглютинации путем фиксации полученных из крови эритроцитов 50%-ным раствором формалина, в результате чего они сохраняют свою способность к агглютинации вирусом гриппа в течение длительного срока. Постановка реакции задержки гемагглютинации в диагностике гриппа свиней с использованием фиксированных эритроцитов не отличается по специфичности и чувствительности от аналогичной реакции с использованием свежих эритроцитов.

The authors have developed a method for fixation of RBC intended for hemagglutination inhibition test through the use of 50% formalin. The fixed erythrocytes preserve the capability for agglutination by influenza virus for a long time. The hemagglutination inhibition test using the fixed red blood cells has the same sensitivity and specificity of the analogous test using fresh red blood cells.

Введение. Одной из проблем современного свиноводства являются острые респираторные болезни свиней, которые регистрируются практически во всех странах мира, причиняя огромный экономический ущерб. В некоторых хозяйствах заболеваемость ими свиней может составлять 30-70% с уровнем летальности 40% [5, с. 277-290].

Во многих случаях инфекционная патология дыхательной системы имеет полиэтиологическую природу, причем наиболее часто изолируемыми агентами являются *Mycoplasma* spp., вирус РРСС, микроорганизмы родов *Actinobacillus* и *Haemophilus*, а также вирус гриппа свиней (ВГС), который многими авторами признается вторым по важности возбудителем инфекционных патологий дыхательной системы [6 с. 123-129, 8 с. 36-42]. Большинство случаев клинической патологии обусловлено серовариантами Н1N1, Н1N2, Н3N2, являющимися эпидемическими серовариантами для людей [7 с. 8243-8251, 4 с. 503-506].

Диагностика гриппозной инфекции главным образом основана на обнаружении антител к вирусу в реакции задержки гемагглютинации (РЗГА) на основе способности вируса к гемагглютинации эритроцитов [3, с. 2947-2955].