

УДК 619:579.23

ФЕНО- И ГЕНОТИПИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОИЗВОДСТВЕННЫХ ШТАММОВ MYCOBACTERIUM BOVIS 8 И MYCOBACTERIUM BOVIS VALLEE

Притыченко А.Н.

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

Штаммы Mycobacterium bovis 8 и Mycobacterium bovis Vallee, депонированные в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» по своим морфологическим, тинкториальным, культуральным, патогенным, антигенным свойствам, а также по наличию специфических участков ДНК соответствуют типовым и могут быть использованы для изготовления туберкулина на УП «Витебская биофабрика».

Mycobacterium bovis 8 and Mycobacterium bovis Vallee strains developed by The Institute of Veterinary Medicine of S. Vishelessky show the morphological, tinctorial, cultural, pathogenic, antigenic features and DNA sequence of the typical strains and can be used for producing the tuberculin by The Vitebs biological manufacture.

Введение. В настоящее время туберкулёз остаётся проблемой №1 в инфекционной патологии человека и животных. В нашей стране эпизоотическая и эпидемическая ситуация по туберкулёзу остаётся сложной.

Наиболее часто туберкулёз встречается среди крупного рогатого скота. Благополучие по туберкулёзу обеспечивается проведением плановых массовых мероприятий [1].

Для аллергической диагностики туберкулёза в Республике Беларусь, преимущественно, используют туберкулин очищенный для млекопитающих производства Витебской биофабрики. Выпуск препарата сопряжен с рядом проблем, одной из которых является постоянный контроль производственных штаммов.

В соответствии с требованиями Manual of Diagnostic Terrestrial Animals (5th edition, 2004) туберкулин для млекопитающих должен производиться из штаммов *Mycobacterium bovis*, идентифицированных в соответствующих тестах, причем история их происхождения, должна быть документирована [1,2].

Требования к производству туберкулинов определены Всемирной Организацией Здравоохранения (ВОЗ), основными из них являются требования к штаммам [3].

Наиболее часто туберкулин готовят из штаммов *M. bovis* AN5 или Vallee [2]. В бывшем СССР, а также в Российской Федерации туберкулин для млекопитающих готовили и готовят из штамма *M. bovis* 8, выделенного от коровы больной туберкулезом в 30-х годах прошлого века [7]. В Республике Беларусь для производства туберкулина на УП «Витебская биофабрика» отобраны штаммы *M. bovis* 8 и Vallee, которые были получены из ВГНКИ ветпрепаратов (Москва) в 1972 г. Штаммы поддерживались на среде Гельберга и пассированы через организм крупного рогатого скота (*M. bovis* 8 в 1980 и 1990 г., *M. bovis* Vallee - в 1988 и 1991 г.) [1, 5, 7].

ВОЗ определено, что производство туберкулина должно вестись с использованием первичной посевной серии штамма, который хранится в лиофилизированном или замороженном виде [3]. Для получения серии (или нескольких) препарата каждый раз проводится рассев штамма первичной посевной серии [1, 7].

С целью исключения влияния на свойства производственных штаммов диссоциации при многократных пересевах на питательных средах, создают значительную по объёму и хорошо изученную первичную посевную серию [7]. По мере необходимости из неё создают производственные серии, число пассажей которых ограничено [1, 5]. Такая система максимально исключает влияние изменчивости штамма в процессе пассажей на свойства туберкулина.

Современные серологические и молекулярно-генетические тесты позволили глубже исследовать антигенный и молекулярный состав возбудителя туберкулёза и туберкулинов [1, 5, 6, 7], однако такие исследования затрудняются термической денатурацией, возникающей при автоклавировании культурального фильтрата [5].

Содержание видоспецифических туберкулопротеинов в туберкулине напрямую зависит от антигенных свойства штаммов, используемых при производстве аллергена [8, 9, 10].

С внедрением в практику возможностей перекрёстного иммуноэлектрофореза (ПИЭФ) стало возможным изучение антигенного спектра туберкулинов с использованием референс-системы антигенов БЦЖ [10].

Исследованиями ряда ученых показали значительную сложность антигенного состава туберкулинов, возможности электрофореза в ПААГ позволили установить наличие в туберкулине 15 - 20 фракций, различающихся по электрическому заряду и размеру молекул [5, 7, 11].

Не менее значимый интерес для исследования антигенных свойств *M. bovis* 8 представляют ракетный иммуноэлектрофорез (РИЭФ) и реакция иммунодиффузии (РИД) [1, 5]. Кроме того, с открытием полимеразной цепной реакции (ПЦР) стала возможной идентификация *M. bovis* по консервативным участкам ДНК [12].

При организации нового производства туберкулина важно подобрать типовые производственные штаммы возбудителя туберкулёза [13], кроме того, неизвестно, как сказывается длительный период культивирования производственных культур на их антигенном составе. В этой связи, исследование антигенного состава предлагаемых производственных штаммов весьма актуально, особенно, если оно проводится с антисыворотками того вида животных, для которого предназначен туберкулин [1, 5, 6, 7].

Перспективным направлением является изучение биологических свойств штаммов *Mycobacterium bovis* №8 и *Mycobacterium bovis* Vallee используемых для производства туберкулина очищенного для млекопитающих.

Цель исследований - изучение биологических свойств штаммов *M. bovis* 8 и *M. bovis* Vallee и создание первичных посевных серий для производства туберкулина очищенного для млекопитающих на УП «Витебская биофабрика».

Материалы и методы. В работе использовали штаммы *M. bovis* № 8, *M. bovis* Vallee, полученные в 1971г. из ВГНКИ депонированные в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»,

штамм *M. bovis* БЦЖ-1 246 пассажа Государственного научно-контрольного института им. Тарасевича (Москва), а также штаммы *M. bovis* БЦЖ и *M. bovis* СП2. Штаммы выращивали на среде Гельберга, для получения первичных посевных серий использовали рассев единичной типичной колонии с последующим пересевом на среды Павловского и Сотона.

Культуральные свойства изучали путем посева на среду Гельберга и МПА с последующей инкубацией при 20, 37 и 45°C, а также на средах Сотона и Павловского. Морфологические и тинкториальные свойства культур изучали микроскопией препаратов-мазков, окрашенных по Цилю-Нильсену, патогенные свойства – заражением морских свинок и кроликов в дозе 1 мг влажного веса бактериальной массы.

Для изучения антигенного состава получали бычки и кроличьи антисыворотки к соникатам негретых культур *M. bovis* № 8, *M. bovis* Vallee, Антигенный состав определяли в реакции иммунодиффузии (РИД), в ракетном иммуноэлектрофорезе (РИЭФ) и в перекрестном иммуноэлектрофорезе (ПИЭФ).

РИД ставили на стеклах 9x12 см в 1% агаре Difco в лунках диаметром 5 мм. После 96 ч инкубации, пластинки отмывали в 6% растворе хлористого натрия, высушивали и окрашивали 0,5% раствором амидочерного 10В.

ПИЭФ ставили на стеклах 9x12 см в 1,5% агарозе Sigma. Антигены разделяли в первом направлении при напряжении 6 - 7 В/см, во втором (в геле, содержащем бычью референс-антисыворотку *M. bovis*) - при 2 В/см. После отмывки гели высушивали и окрашивали 0,5% кумасси голубым R 250 (Fluka).

Для идентификации штаммов в полимеразной цепной реакции (ПЦР) применяли праймеры IS1081, IS81, IS6110, ET, реакцию ставили по стандартному протоколу.

С помощью источника тока «Power рас 300» (Bio-Rad) ампликоны подвергали электрофорезу в 1,5% агарозном геле с 1% бромистым этидием, в течение 30 минут при 10 В/см.

Для оценки результатов использовали трансиллюминатор 2000 (Bio-Rad) с длиной волны 310 нм и видеосистему для регистрации «Samsung» с программой «Cell Explorer» версия 1,0.

Результаты исследований. Установлено, что штаммы *M. bovis* 8 и *M. bovis* Vallee не росли на МПА, а на среде Гельберга рост наблюдался только при 37°C, который характеризовался образованием мелких и средних цвета слоновой кости шероховатых R-формы колоний (рис. 1).

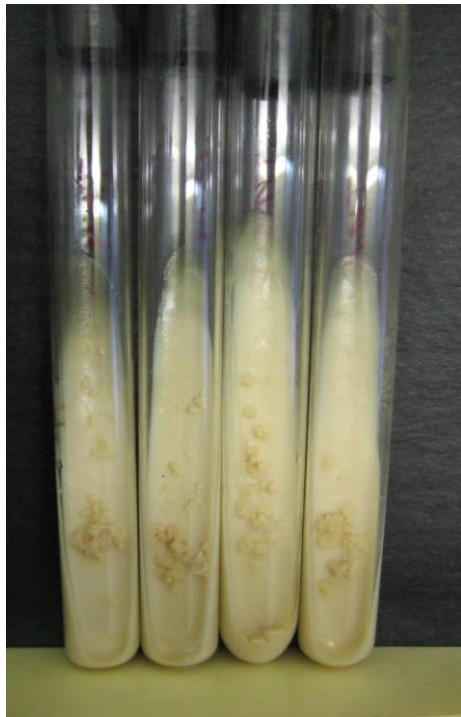


Рис.1 Рост штаммов *M. bovis* 8 и *M. bovis* Vallee на среде Гельберга при 37°C через 8 недель



Рис. 2. Культуральные свойства штамма *Mycobacterium bovis* 8 на среде Павловского



Рис.3. Рост штамма *Mycobacterium bovis* 8 на среде Сотона через 7 недель

На среде Павловского штаммы *M. bovis* 8 и *M. bovis* Vallee давали характерный рост сухих колоний (рис.2). На жидкой синтетической среде Сотона культуры росли с образованием сухой складчатой плёнки (рис.3.).

При световой микроскопии в препаратах-мазках из колоний обнаруживали палочки рубиново-красного цвета 0,3 – 0,6 мкм в ширину и 3 – 7 мкм в длину, иногда собранные в жгуты (корд – фактор), с незначительной примесью измененных форм (рис. 4.).

Штаммы *M. bovis* 8 и *M. bovis* Vallee обладали умеренной патогенностью. При заражении кроликов в дозе 1 мг влажного веса они оставались живыми в течение 3 месяцев, однако наблюдалась существенная потеря живой массы. На вскрытии обнаруживали гранулематозные поражения легких печени и селезенки. При заражении морских свинок в месте инъекции формировалась язвенная гранулема, отмечалось образование мелких гранул в печени и в легких. В ряде случаев отмечалась гибель части морских свинок через 2 - 2,5 месяца после заражения.

При исследовании антигенного состава в РИД соникаты *M. bovis* 8 и *M. bovis* Vallee с гомологичными антисыворотками образовывали до 10 идентичных преципитатов (рис.5). С антисыворотками к *M. bovis* 8 и *M. bovis* Vallee соникаты нетуберкулезных микобактерий давали 2-3 линии преципитации (рис. 5). Необходимо отметить, что при исследовании в РИД автоклавированных культуральных жидкостей *M. bovis* 8 и *M. bovis* Vallee в сравнении с ППД туберкулином, приготовленным из эталонного штамма AN5 они формировали идентичные преципитаты.

В ПИЭФ *M. bovis* 8 и *M. bovis* Vallee формировали спектр из 20-25 отдельных преципитатов. Включение в промежуточный гель антисыворотки к *M. bovis* БЦЖ вызывало опускание всех преципитатов в промежуточный гель (рис.6), что свидетельствовало о присутствии в них всех антигенов, характерных для возбудителя туберкулеза бычьего вида.

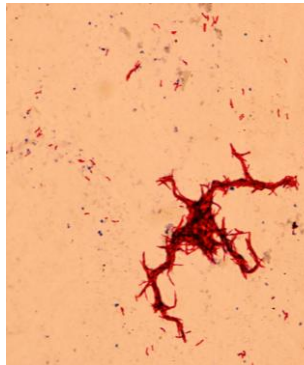


Рис.4. Морфология и тинкториальные свойства *M. bovis* 8, с образованием жгутов (корд-фактор), окраска по Цилю-Нильсену

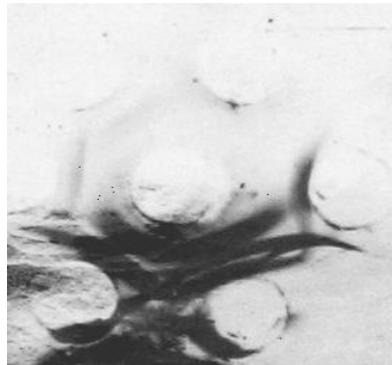


Рис. 5. РИД антисыворотки к *M. bovis* Vallee с соникатами *M. bovis* Vallee, *M. bovis* 8 (вверху), *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum*, *M. phlei*, *M. kansasii*

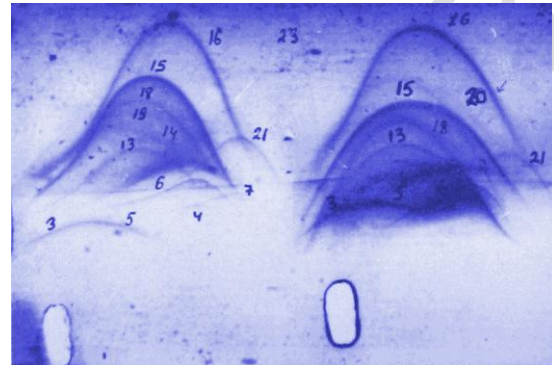


Рис. 6. ПИЭФ сониката *M. bovis* Vallee с включением в промежуточный гель антисыворотки к *M. bovis* БЦЖ

Решающим этапом идентификации было исследование ДНК штаммов в ПЦР с праймерами, характерными для комплекса *bovis-tuberculosis*. Контролем служили штаммы *M. bovis* БЦЖ и *M. bovis* СП2. Установлено, что во всех случаях с праймерами IS6110 IS1081, ET IS81 в электрофорезе были выявлены амплификаты соответствующих размеров (рис. 7-10).

В целом проведенные исследования показали, что исследованные штаммы *M. bovis* 8 и *M. bovis* Vallee, депонированные в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» могут быть использованы для создания первичных посевных серий для обеспечения производства туберкулина на УП «Витебская биофабрика».

С целью создания первичных посевных серий на среде Сотона была получена бактериальная масса штаммов, которая лиофильно высушена (по 180 флаконов) и заложена на хранение в коллекцию культур микроорганизмов и культур клеток РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» для обеспечения производства туберкулина.

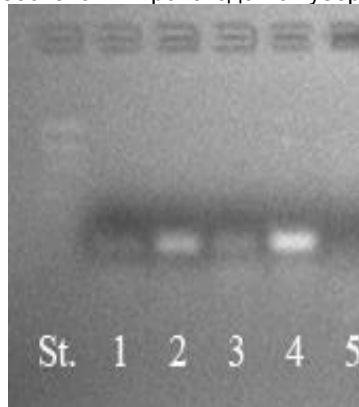


Рис. 7. Праймеры IS6110 (123 п.н.)

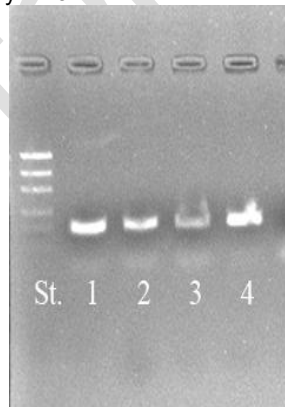


Рис. 8. Праймеры IS1081 (238 п.н.)

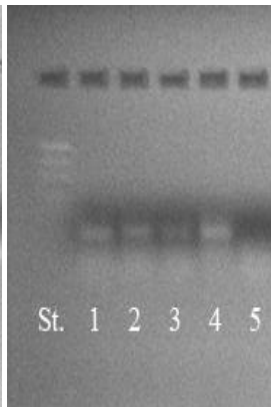


Рис. 9. Праймеры ET (146 п.н.)

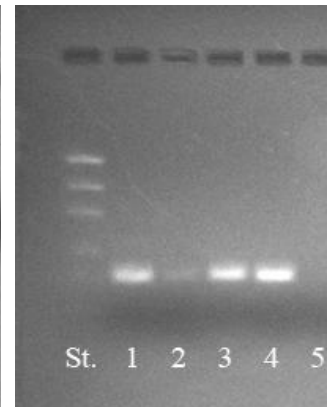


Рис. 10. Праймеры IS81 (365 п.н.)

Рис. 7-10. Результаты амплификации ДНК *M. bovis* БЦЖ(1), *M. bovis* 8 (2), *M. bovis* Vallee (3), *M. bovis* СП2 (4) с праймерами специфичными для микобактерий комплекса *bovis-tuberculosis*

Заключение. Штаммы *M. bovis* 8 и *M. bovis* Vallee, депонированные в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», по своим морфологическим, тинкториальным, культуральным, патогенным и антигенным свойствам, а также по наличию специфических участков ДНК соответствуют типовым и могут быть использованы для изготовления туберкулина на УП «Витебская биофабрика».

Литература. 1. Притыченко, А.Н. Туберкулин очищенный для млекопитающих (оптимизация очистки, диагностические и иммунохимические свойства) : автореф. дис. ... канд. вет. наук : 16.00.03 / А.Н. Притыченко ; БНИИ экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского. – Минск, 2002. – 17 с. 2. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals, 5th edition, 2004. 3. World Health Organization (WHO) (1987). Requirements for Biological Substances No. 16, Annex : Requirement for Tuberculins. Technical Report Series No. 745, WHO, Geneva, Switzerland, 31-59. 4. Сравнительное испытание отечественных и зарубежных туберкулинов для млекопитающих / Н.П. Овдиенко, А.Х. Найманов, Э.А. Плотников и др. // Ветеринария. - 1989. - № 10. - С. 21 – 24. 5. Лысенко, А.П. Антигены М. bovis и атипичных микобактерий, изучение и применение для дифференциальной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота : автореф. дис. ... докт. вет. наук : 16.00.03 / Бел. НИИ экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского. - Мн., 1994. - 35 с. 6. Безгин, В.М. Совершенствование промышленной технологии (ППД) туберкулина и его биохимическая характеристика : автореф. дис. ... канд. вет. наук : 16.00.03 / ВАСХНИЛ. – Москва, 1990. – 27 с. 7. 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. 8. Nagai, S., Wiker, H., Harboe, M., Kimomoto M. Isolation and partial characterisation of major protein antigens in the culture fluid of M. tuberculosis // J.Clin.Microbiol. - 1991. - 59.1 - P. 372-382. 9. Wiker, H., Harboe M., Nagai S. MRB 59, a widely cross-reactive protein of Mycobacterium bovis BCG // Intern.Archives of Allergy and Applied Immunology. - 1986. - 81. - P. 307-314. 10. Closs O., Harboe, M., Axelsen, N., et.al. The antigens of Mycobacterium bovis, strain BCG, studies crossed immunoelectrophoresis a Referens System // Scand. J. Immunol. - 1980. - 12. - P. 249-263. 11. Fiffis, T., Rothel, J., Wood, P. Soluble M. bovis protein antigens: studies on their purification and immunological evaluation // Vet. Microbiol. -1994. - 40 (1-2). - P. - 65-81. 12. Шаров, А.Н. ПЦР при диагностике туберкулеза у крупного рогатого скота / А.Н. Шаров, И.П. Суханов, Л.А. Ероменко // II Всероссийская научно-практическая конференция «Полимеразная цепная реакция в диагностике и контроле лечения инфекционных заболеваний» 20 — 22 января, 1998 г. : Материалы II Всерос. Конф. : Сб.тр. М. 1998 –С. 103 — 104. 13. Ауштрова, К.Н. Оптимизация системы подготовки производственных штаммов возбудителя туберкулеза при изготовлении очищенного туберкулина для млекопитающих : автореф. дис.... канд. вет. наук: 16.00.03 / Всесоюзный гос-н научно-контрольный ин-т. – М., 1991. - 21 с.

Статья поступила 30.10.2010г.

УДК: 619: 615:844.6

ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНАЯ ДИАГНОСТИКА ИНФЕКЦИОННЫХ БОЛЕЗНЕЙ ТЕЛЯТ С ДИАРЕЙНЫМ СИНДРОМОМ ПРИ МОНО- И АССОЦИАТИВНОМ ТЕЧЕНИИ

Прудников В.С., Прудников А.В.

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

Абсолютное большинство инфекционных болезней телят с диарейным синдромом протекают в ассоциации. При этом у одного животного можно наблюдать морфологические изменения, характерные для 2-х – 4-х и более инфекций.

Overwhelming majority of infectious diseases of calf with diarrheal syndrome is proceed in association. Thus at one animal it is possible to observe morphological changes, typical for 2 - 4 and more infections.

Введение. Инфекционные болезни телят с диарейным синдромом имеют широкое распространение в Республике Беларусь и наносят значительный экономический ущерб хозяйствам и крупным промышленным комплексам. Это вызвано несвоевременной и недостаточно полной диагностикой, отсутствием эффективной специфической профилактики данных болезней и достаточно эффективных лечебных препаратов.

Правильно и быстро поставленный диагноз позволяет целенаправленно разработать лечебно-профилактические мероприятия и ликвидировать заболевания.

Проведенные нами исследования за период с 2005 по 2010 годы показали, что моноинфекции у телят встречаются редко, при этом прослеживается следующая закономерность - инфекционные заболевания у телят возникают в хозяйствах и комплексах, где нарушены зоогигиенические условия содержания и кормления коров в сухостойном периоде и в родильном отделении, а также при несвоевременной и неправильной выпойке молозива и молока телятам. Отрицательное влияние оказывает содержание телят по 2 и более в клетках, недостаточно частое проведение аэрозольной дезинфекции в помещениях, отсутствие изоляторов для больных и ослабленных животных, а также нарушение иммунизации стельных коров и телят против вирусных инфекций. Указанные выше негативные факторы, как правило, приводят к ослаблению иммунной защиты у животных и наложению одной или нескольких вирусных инфекций. По нашим данным и результатам лабораторных исследований у телят, начиная с суточного возраста (обычно после выпойки молозива), чаще всего возникают такие заболевания, как корона- и ротавирусные инфекции, инфекционный ринотрахеит (кишечная форма), аденовирусная инфекция и колибактериоз. При этом, если против первых трех болезней имеются вакцины и сыворотки, то против аденовирусной инфекции биопрепараты в РБ отсутствуют. Клинические признаки у телят при этих болезнях примерно одинаковые и характеризуются развитием диареи, повышением температуры тела на 0,5 – 1° (до появления диареи), угнетением, залеживанием, отказом от корма и др. В настоящее время установлено, что заражение телят вирусами происходит внутриутробно через плацентарный барьер, поэтому они рождаются уже больными и после приема молозива появляются первые характерные клинические признаки болезни. Вирусы репродуцируются в эпителии слизистых оболочек ротовой и носовой полостей, желудка и тонкого кишечника, где вызывают воспаление, некроз, образование эрозий и язв.

Указанные патоморфологические изменения обнаруживаются при осмотре больного животного и при вскрытии трупов павших и вынужденно убитых телят, что дает возможность быстро поставить предварительный диагноз, предотвратить массовый падеж молодняка, сохранить поголовье и повысить прирост живой массы.

Материалы и методы. Патоморфологические исследования проводились в прозектории кафедры патанатомии и гистологии на 126 трупах павших и вынужденно убитых телят в возрасте от 1-го дня до 1,5 месяцев, в хозяйствах РБ в период выездов по оказанию диагностической помощи. Для подтверждения диагно-