

РАЗРАБОТКА И ИЗУЧЕНИЕ СПЕЦИФИЧНОСТИ НАБОРА ДЛЯ ИДЕНТИФИКАЦИИ СЕРОВАРИАНТОВ PASTEURELLA MULTOCIDA

*Андрусевич А.С., **Курдеко А.П., *Стрельчя И.И.

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им.С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь
 **УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Полученные антительные эритроцитарные пастереллезные диагностикумы к серовариантам А, В, D Pasteurella multocida являются специфическими и стабильными препаратами. Оптимальными условиями получения антительных эритроцитарных пастереллезных диагностикумов для серовариантной идентификации пастерелл являются танинизация акролеинизированных эритроцитов барана танниновой кислотой в разведении 1:20000 и их сенсibilизация гипериммунными антисеровариантными сыворотками пастерелл, содержащими 100 – 150 мкг/мл белка при температуре 45⁰С в течение 2 часов.

The resulting antibody erythrocyte pasteurellosis diagnosticums to serotypes A, B, D Pasteurella multocida are specific and stable medications. The optimum conditions for producing antibody erythrocytic pasteurellosis diagnosticum for serotype identification of Pasteurella are taninnization of the ukrainianromanian erythrocytes of a ram by tannin acid in a dilution of 1: 20000 and their sensibilization by antiserotypes hyperimmune serums of Pasteurella containing 100 - 150 micrograms / ml of protein at temperature of 45⁰С for 2 hours.

Ключевые слова: диагностикум, пастереллез, сероварианты, типизация, специфичность.

Keywords: diagnosticum, pasteurellosis, serotypes, typing, specificity.

Введение. Одним из узловых вопросов решения проблемы специфической профилактики пастереллеза сельскохозяйственных животных является своевременная диагностика болезни с определением сероварианта возбудителя, обуславливающего ее возникновение [1]. Однако из-за слабого знания антигенной структуры и ареала распространения серовариантов возбудителя пастереллеза разрабатываемые профилактические мероприятия являются недостаточно эффективными. Связано это с тем, что вакцины, выпускаемые биологической промышленностью как в Республике Беларусь, так и в других странах, готовят из одного сероварианта В, который не может обеспечить профилактику пастереллеза полисеровариантной (А, В, D или А, D) природы.

В связи с этим разработка более простых, доступных и высокоэффективных методов серологической типизации возбудителя пастереллеза имеет большой практический интерес, так как на основе изучения степени распространения того или иного сероварианта будут разработаны более эффективные средства специфической профилактики этой болезни.

Материалы и методы исследований. Основные принципы приготовления антительных эритроцитарных пастереллезных диагностикумов достаточно универсальны. Тем не менее, с целью получения наиболее высоких титров в РНГА, позволяющих улавливать наличие минимального количества возбудителя в исследуемом материале, необходимо было усовершенствовать параметры приготовления антительных эритроцитарных пастереллезных диагностикумов. С этой целью проведен подбор эритроцитов и апробирован метод их фиксации. Это позволяет обеспечить максимальную сорбцию сенсирина, разработку оптимальных условий их танини-

зации и определение условий, влияющих на процесс сенсibilизации эритроцитов [2].

Вначале проведены исследования по подбору эритроцитов. С этой целью использовали эритроциты барана, кролика и морской свинки. Важным этапом приготовления высокочувствительных эритроцитарных диагностикумов является: выбор, стабиллизация, танинизация и сенсibilлизация эритроцитов. Активность диагностикумов зависит от исходной концентрации сенсibilизирующего антигена, длительности экспозиции и температурного режима сенсibilлизации. В этой связи выделены следующие этапы приготовления антительных эритроцитарных пастереллезных диагностикумов:

- 1) получение нативных эритроцитов;
- 2) фиксация эритроцитов;
- 3) танинизация эритроцитов;
- 4) определение активности нативных и стабилизированных эритроцитов;
- 5) сенсibilлизация эритроцитов;
- 6) контроль активности диагностикумов.

Активность антительных эритроцитарных пастереллезных диагностикумов испытывали в РНГА с гомологичными пастереллезными антигенами. Оптимальной сенсibilизирующей концентрацией гипериммунной сыворотки считали то ее разведение, которое обеспечивало наибольшую активность диагностикума в РНГА с гомологичным антигеном [3].

Контроль специфичности и активности антительных эритроцитарных пастереллезных диагностикумов осуществляли при помощи РНГА с гомологичными и гетерологичными культурами серовариантов А, В, D Pasteurella multocida, а также с гетерологичными культурами других микроорганизмов (Pasteurella haemolytica, Salmonella Dublin, Salmonella thyphimurium, Escherichia coli, Staphylococcus aureus,

Proteus vulgaris, *Proteus mirabilis* *Citrobacter pneumoniae*, *Klebsiella aerogenes*).

Результаты исследований. Установлено, что при сенсибилизации нативных эритроцитов гипериммунной противопастереллезной сывороткой в водяной бане при температуре 37°C в течение 2 часов в РНГА наблюдается положительная реакция с бульонной культурой гомологичных серовариантов в титрах 5,5 – 7,5 log₂. Однако активность антительных эритроцитарных диагностикумов во многом зависела от того, у какого вида животных они были получены. Так, наибольшей адсорбционной способностью обладали эритроциты барана (7,5 log₂), в меньшей степени – эритроциты кролика (5,5 log₂). Эритроциты морской свинки имели минимальную сорбционную способность по отношению к противопастереллезной сыворотке.

Это дало основание во всех последующих наших исследованиях использовать эритроциты барана. К тому же они более устойчивы в солевых

растворах к гемолизу и чаще применяются в лабораторной практике.

Вместе с тем, нативные эритроциты пригодны для постановки РНГА в течение короткого срока действия, 2 – 3 дня. Поэтому перед нами стояла задача подобрать фиксирующее средство, удлиняющее срок их хранения. С этой целью мы использовали акролеин и глутаровый альдегид.

При этом установили, что для постановки РНГА могут использоваться оба метода их фиксации, однако акролеинизированные эритроциты более приемлемы для этих целей. Они агглютинировались на 1 – 3 порядка выше, чем эритроциты, фиксированные глутаровым альдегидом и сенсибилизированные гипериммунной противопастереллезной сывороткой. Опыты по подбору фиксирующих средств с акролеином и глутаровым альдегидом провели в 6 повторностях. Результаты представлены на рисунке 1.

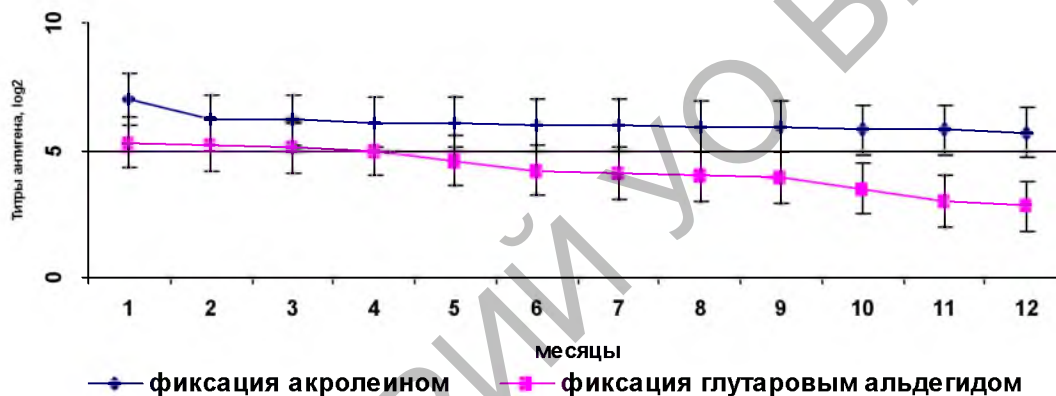


Рисунок 1 – Сравнительная эффективность антительных эритроцитарных пастереллезных диагностикумов в зависимости от способов фиксации эритроцитов и длительности их хранения

Как видно из рисунка 1, при определении сроков хранения акролеинизированных эритроцитов установлено, что они сохраняли свою активность в течение 12 месяцев с незначительным ее снижением, начиная с 9-го месяца хранения. Это позволяет заготавливать их впрок и в больших количествах.

При сравнительной оценке результатов РНГА с нативными и акролеинизированными эритроцитами барана всегда получали стабильные результаты. Обработка эритроцитов акролеином легко и быстро выполняема, позволяет сохранить их первоначальный цвет и сенсибилизирующую активность в течение длительного времени. Фиксация эритроцитов акролеином значительно повышала их устойчивость к осмотическим, механическим и температурным воздействиям, эритроциты выдерживали колебания pH в пределах 5,0 – 10,0, сохраняли форму и строение. Кроме того, при танинизации они не подвергались лизису и сенсибилизации даже при длительном хранении. В то же время эритроциты, фиксированные глутаровым альдегидом, иногда давали нечеткие результаты, образуя «зонтики» небольших размеров. По мнению некоторых исследователей, увеличение гемагглютинационного титра можно достичь путем обработки эритроцитов таниновой кислотой. Она способствует изменению их структу-

рных и физико-химических свойств, и, прежде всего, рецепторного аппарата. Это повышает их адсорбционную способность, проявляющуюся значительным возрастанием чувствительности метода.

Для определения оптимальной концентрации танина опыт провели в 6 повторностях, при этом использованы концентрации от 1:2000 до 1:80000. Установили, что таниновая кислота в разведении 1:2000 после 15-минутной экспозиции вызвала спонтанную агглютинацию как нативных, так и акролеинизированных эритроцитов барана. По мере снижения концентрации танина активность сенсибилизированных эритроцитов возрастала, и максимальная чувствительность РНГА отмечена в концентрации танина 1:20000. Эритроциты, обработанные этим разведением таниновой кислоты и сенсибилизированные антисывороткой к сероварианту А, давали положительную реакцию с гомологичным серовариантом в титре $8,9 \pm 0,17$, к сероварианту В – $10,52 \pm 0,33$ ($P < 0,05$) и сероварианту D агглютинировались с гомологичным серовариантом в титре $8,42 \pm 0,21$. Дальнейшее уменьшение концентрации танина снижало активность сенсибилизированных эритроцитов (рисунок 2).

Большое значение при получении высокоактивных и специфичных диагностикумов имеет под-

бор оптимальной сенсibiliзирующей дозы, поскольку избыточное количество сенситина приводит к неспецифической агглютинации эритроцитов. При этом недостаточная доза не обеспечивает максимальной активности диагностикумов. С этой целью в качестве сенситина мы апробировали гипериммунные противопастереллѐзные сыворотки к серовариантам А, В и D *Pasteurella multocida* из расчета 50, 100, 150 мкг/мл белка (таблица 1).

В результате проведенных исследований установили, что по мере повышения сенсibiliзи-

рующей дозы сыворотки, активность эритроцитарных пастереллѐзных диагностикумов повышалась и достигала максимального значения в дозе 150 мкг/мл. При применении противопастереллѐзной антисыворотки в качестве сенситина в дозе 50 мкг/мл белка титр антител с гомологичными серовариантами составлял $7,1 \pm 0,21$, $7,4 \pm 0,13$ и $7,2 \pm 0,15$, а при увеличении ее до 100 – 150 мкг/мл титры антител возросли до $7,3 \pm 0,12$ – $8,8 \pm 0,21 \log_2$ ($P < 0,05$). Увеличение белка свыше 150 мкг/мл вызывало самоагглютинацию диагностикумов.

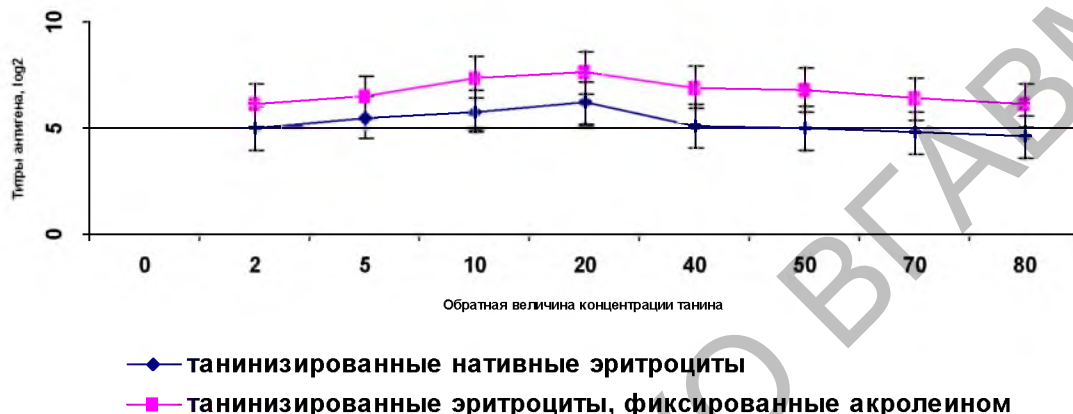


Рисунок 2 – Влияние концентрации танина на активность нативных и акролеинизированных эритроцитов

Таблица 1 – Активность антительных эритроцитарных пастереллѐзных диагностикумов в зависимости от дозы сенситина

Пастереллѐзные антигены	Средние геометрические титры, \log_2		
	Сенсibiliзирующая доза сенситина по белку, мкг/мл		
	50	100	150
A	$7,1 \pm 0,21$	$7,3 \pm 0,12$	$7,2 \pm 0,14$
B	$7,4 \pm 0,13$	$7,9 \pm 0,18$	$8,8 \pm 0,21^*$
D	$7,2 \pm 0,15$	$8,1 \pm 0,11$	$8,0 \pm 0,19^*$

Примечание: * - $P < 0,05$.

Таблица 2 – Влияние температурного режима на сенсibiliзирующую активность эритроцитов

Значение титра	Температура, $^{\circ}\text{C}$			
	37	45	50	56
Арифметический	$7,20 \pm 0,14$	$9,10 \pm 0,28$	$8,6 \pm 0,33$	$8,1 \pm 0,35$
Геометрический	1:239	1:549	1:388	1:275

Активность диагностикумов зависит не только от дозы сенситина, но и от температурного режима, при котором проводится сенсibiliзация эритроцитов. Проведенные дополнительные исследования с использованием антисыворотки к сероварианту В показали, что диагностикумы, полученные путем сенсibiliзации эритроцитов при температуре 37°C , давали положительную реакцию с гомологичной культурой в титре $7,20 \pm 0,14 \log_2$ (таблица 2).

По мере увеличения температурного режима сенсibiliзации эритроцитов активность диагностикумов значительно возрастала, и при температуре 45°C их титр с гомологичной культурой составил $9,10 \pm 0,28 \log_2$. При последующем увеличении температурных условий сенсibiliзации их активность снижалась и диагностикумы, полученные при температуре 56°C , давали положительную реакцию в титре $8,1 \pm 0,35 \log_2$. Следовательно, максимальная активность диагностикумов достигается при сенс-

билизации танинизированных эритроцитов барана противопастереллѐзной специфической сывороткой при температуре 45°C в течение 2 часов. Очевидно, что повышение адсорбционной способности сенситина при данной температуре происходит за счет агрегации белковых молекул и увеличения электрофоретической активности.

Таким образом, оптимальными условиями получения антительных эритроцитарных пастереллѐзных диагностикумов для идентификации серовариантов пастерелл, обеспечивающих наибольшую их активность, являются обработка акролеинизированных эритроцитов таниновой кислотой в разведении 1:20000 и их сенсibiliзация противопастереллѐзными гипериммунными сыворотками, содержащими 100 – 150 мкг/мл белка, при температуре 45°C в течение 2 часов. Срок годности 1 год.

Серологическую специфичность и активность полученных антительных эритроцитарных пасте-

реллезных диагностикумов изучали с гомологичными и гетерологичными суточными бульонными культурами *Pasteurella multocida* (серовариантов А, В, D) и *Salmonella dublin*, *Salmonella thyphimurium*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis*, *Citrobacter pneumoniae*, *Klebsiella aerogenis*. РНГА ставили в нескольких повторностях. Результаты исследований представлены в таблице 3.

Как видно из приведенных данных, приготовленные антительные эритроцитарные пастереллезные диагностикумы к серовариантам А, В, D *Pasteurella multocida* не вызывали агглютинацию бульонных культур сальмонелл, кишечной палочки, стафилококка, стрептококка, протея, цитробактерий и клебсиелл. При многократном исследовании анти-

тельных эритроцитарных пастереллезных диагностикумов с гомологичными серовариантами культур пастерелл в РНГА регистрировались, как правило, положительные результаты в одном и том же титре с колебаниями в пределах одного разведения. Для сероварианта А средний титр антител с соответствующей бульонной культурой составлял $8,35 \pm 0,16 \log_2$, сероварианта В – $10,10 \pm 1,05 \log_2$ ($P < 0,05$) и сероварианта D – $9,10 \pm 0,12 \log_2$. С гетерологичными серовариантами пастерелл перекрестные реакции практически отсутствовали или отмечались в разведениях в 6 – 8 раз ниже титров, полученных в гомологичной системе ($2,20 \pm 0,80$ – $2,94 \pm 0,90 \log_2$). Это свидетельствует о специфичности и стабильности полученных антительных эритроцитарных пастереллезных диагностикумов.

Таблица 3 – Специфичность и активность антительных эритроцитарных пастереллезных диагностикумов

Бульонная культура	Титр антител с серовариантами, \log_2		
	А	В	Д
<i>Pasteurella multocida</i>			
- серовариант А	$8,35 \pm 0,16$	$2,20 \pm 0,80$	$2,75 \pm 0,15$
- серовариант В	$2,79 \pm 0,14$	$10,10 \pm 1,05^*$	$2,94 \pm 0,90$
- серовариант D	$2,72 \pm 0,40$	$2,34 \pm 0,22$	$9,10 \pm 0,12$
<i>Salmonella dublin</i>	-	-	-
<i>Salmonella thyphimurium</i>	-	-	-
<i>Escherichia coli</i>	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Streptococcus aureus</i>	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	-
<i>Citrobacter pneumoniae</i>	-	-	-
<i>Klebsiella aerogenis</i>	-	-	-

Примечание: * - $P < 0,05$.

При испытании активности антительных эритроцитарных пастереллезных диагностикумов в течение 12 месяцев (срок наблюдения) было установлено, что их чувствительность в РНГА практически не снижалась при четких отрицательных контролях.

Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о высокой серовариантной специфичности полученных диагностикумов и перспективе их использования для идентификации серовариантов А, В, D *Pasteurella multocida*.

Заключение. На основании результатов проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

1. Оптимальными условиями получения антительных эритроцитарных пастереллезных диагностикумов для серовариантной идентификации пастерелл являются танинизация акролеинизированных эритроцитов барана таниновой кислотой в разведении 1:20000 и их сенсibilизация гипериммунными антисеровариантными сыворотками пастерелл, содержащими 100 – 150 мкг/мл белка при температуре 45°C в течение 2 часов.

2. Полученные антительные эритроцитарные пастереллезные диагностикумы к серовариантам А, В, D *Pasteurella multocida* являются специфическими и стабильными препаратами, так как с гомологичными культурами дают положительные реакции в одном и том же титре с колебаниями в пределах одного разведения.

Литература. 1. Геведзе, В. И. Антигенное родство пастерелл, выделенных от разных видов животных / В. И. Геведзе, Н. С. Камелева // *Современные проблемы профилактики и лечения зоонозных заболеваний и лейкозов: материалы научной конференции*. – Минск, 1982. – С. 126. 2. Геведзе, В. И. Методические рекомендации по диагностике пастереллезозов сельскохозяйственных животных / В. И. Геведзе, С. Т. Соколов. – Минск, 1987. – 18 с. 3. Дзюбак, А.Т. Методика постановки реакции гемагглютинации с использованием эритроцитарных иммуноглобулиновых диагностикумов / А.Т. Дзюбак // *Актуальные вопросы инфекционных и инвазионных болезней животных: сборник научных трудов / МВА*. – Москва, 1994. – С. 104-109.

Статья передана в печать 24.02.2016 г.