

spiralis двуцепочечной эндонуклеазной активности, которая способствует реорганизации мышечных клеток хозяина и вызывает рост двуцепочечных разрывов ДНК [7].

Цитотоксический эффект, характеризующийся увеличением процента апоптотических клеток в костном мозге беременных самок и их эмбрионов при внутрибрюшинном введении БСЭСР, можно объяснить повышением количества в организме белка теплового шока Hsp 70. Иммуномодуляторная функция Hsp 70 состоит в том, что если в клетке происходят нарушения под воздействием метаболитов паразита, то эта клетка выбрасывает во внеклеточную среду свои белки, которые клетки иммунной системы воспринимают как сигнал опасности [3].

Таким образом, можно сделать выводы, что БСЭСР личинок *T. spiralis* обладает эмбриотоксическим и фетотоксическим эффектами, которые характеризуются повышением в 6,4-10 раз уровней постимплантационной гибели эмбрионов при внутрибрюшинном введении на всех стадиях развития.

Эмбриотоксический эффект на стадии раннего органогенеза сопровождается понижением средней массы эмбрионов в 1,5 раза и уменьшением среднего краниокаудального размера в 1,3 раза. Инъекции белковым секреторно-эксреторно-соматическим продуктом личинок *T. spiralis* на стадии позднего органогенеза приводят к увеличению: средней массы эмбрионов в 2,69 раз и среднего краниокаудального размера в 1,19 раза.

БСЭСР личинок *T. spiralis* обладает генотоксическим эффектом в клетках костного мозга беременных самок крыс и их эмбрионов при введении на стадии раннего и позднего органогенеза, в плодном периоде, которые характеризуются повышением процента ДНК в «хвостах комет», увеличением «длины хвостов комет» и «момента хвоста комет». Изменения этих показателей говорит о росте количества одноцепочечных разрывов и щелочно-лабильных сайтов ядерной ДНК в 2,12-7,5 раз. Рост числа апоптотических клеток в 2,63-10,4 раза характеризует цитотоксический эффект БСЭСР личинок *T. spiralis*.

**Литература.** 1. Бекиш, В.Я. Состояние генома хозяина при гельминтозах / В.Я. Бекиш, О.-Я.Л. Бекиш // Витебск.– Изд. ВГМУ. – 2004. – С. 40–43. 2. Бекиш, О.-Я.Л. Нарушения в генетическом аппарате соматических и генеративных клеток хозяина, вызванные метаболитами гельминтов / О.-Я.Л. Бекиш, Вл.Я. Бекиш, В.В. Побыржин, В.И. Колмогоров // Вести НАН Беларуси. Сер. мед.-биол. наук. News of biomedical science. – 2001. – №2. – С. 70-74. 3. Евдонин, А.Л. Внеклеточный белок теплового шока 70 и его функции / А.Л. Евдонин, Н.Д. Медведева.- С.-Петербурга, 2009. - т. 51.- № 2: Цитология. – 130-137. 4. Любимов, Б.И. Методические рекомендации по доклиническому изучению репродуктивной токсичности фармакологических веществ / Б.И. Любимов и др. // Ведомости Фармакологического комитета. – М.: – 1998. – №1. – 20 с. 5. Пашинская, Е.С. Применение щелочного гель-электрофореза изолированных клеток в эмбриональных тканях мышей / Е. С. Пашинская, В.В. Зорина, В.Я. Бекиш, В.В. Побыржин // Достижения фундаментальной, клинической, медицины и фармации (Матер. 62-й научной сессии УО «ВГМУ»). – 2007, Витебск. – С. 163–165. 6. Хабриев, Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Р.У. Хабриев и др. // 2-е изд., перераб. и доп. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 832 с. 7. MacLea, K.S. A family history of deoxyribonuclease II: surprises from *Trichinella spiralis* and *Burkholderia pseudomallei* / K.S. MacLea, R.J. Krieser, A. Eastman // Gene. – 2003. – Vol. 13, № 305(1). – P. 1–12. 8. Mak, C.H. Single-stranded endonuclease activity in the excretory-secretory products of *Trichinella spiralis* and *Trichinella pseudospiralis* / C.H. Mak, Y.Y. Chung, R.C. Ko // Parasitology. – 2000. – Vol. 120, Pt. 5. – P. 527–533.

Статья передана в печать 3.01.2011 г.

УДК 619:579.873.21

#### МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ И АНТИГЕННАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ШТАММОВ *MYCOBACTERIUM BOVIS* 8 И *MYCOBACTERIUM BOVIS VALLEE*, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ТУБЕРКУЛИНА ДЛЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ НА УП «ВИТЕБСКАЯ БИОФАБРИКА»

**Притыченко А.Н.**

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

**Лысенко А.П.**

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»,  
г. Минск, Республика Беларусь

Штаммы *M. bovis* 8 и *M. bovis* Vallee, депонированные в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» в ПЦР идентифицированы как *Mycobacterium bovis*, имеют типовые антигенные свойства и могут быть использованы для производства туберкулина для млекопитающих на УП «Витебская биофабрика».

*M. bovis* 8 and *M. bovis* Vallee strains deposited by The Institute of Experimental Veterinary after S. Vyshellessky have identified as *Mycobacterium bovis* by PCR and have typical antigenic properties and can be used for manufacturing the tuberculin for mammals by Vitebsk biological factory.

**Введение.** Туберкулёз признан проблемой №1 в мире. Туберкулёзом болеют большинство видов животных, а также человек. На протяжении более чем 100 последних лет в области туберкулеза достигнуты огромные успехи, однако учитывая биологические свойства микобактерий туберкулёза, ситуация по данной болезни остаётся по-прежнему сложной. Из числа животных туберкулёз чаще регистрируется среди крупного рогатого скота.

В нашей стране создана система мероприятий по поддержанию благополучия по туберкулёзу животных и в частности крупного рогатого скота [1]. В данной системе мероприятий аллергическая диагностика является ведущей, реализация которой достигается за счёт применения туберкулина очищенного для млекопитающих преимущественно производства УП «Витебская биофабрика».

Для производства туберкулина очищенного для млекопитающих на УП «Витебская биофабрика» используют штамм *Mycobacterium bovis* № 8 и Vallee депонированные в коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», что соответствует международным требованиям.

Несмотря на то, что микобактерии туберкулеза имеют достаточно консервативный антигенный состав [1, 2, 3, 4], к штаммам, из которых готовят туберкулин, предъявляются определенные требования.

В соответствии с Manual of Diagnostic Terrestrial Animals (5<sup>th</sup> edition, 2004) [5], туберкулин для млекопитающих должен производиться из штаммов *Mycobacterium bovis*, идентифицированных в соответствующих тестах, причем история их происхождения, должна быть документирована [7]. Наиболее часто туберкулин производят из штаммов *M. bovis* AN5 или *M. bovis* Vallee [4]. В бывшем СССР, а также в Российской Федерации туберкулин для млекопитающих готовили и готовят из штамма *M. bovis* 8, выделенного в 30-х годах прошлого века от коровы больной туберкулезом [6, 8]. Для производства туберкулина на УП «Витебская биофабрика» были отобраны штаммы *M. bovis* 8 и Vallee, которые поддерживались на среде Гельберга в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», пассированные через организм крупного рогатого скота (*M. bovis* 8 - в 1980 г. и в 1990 г., *M. bovis* Vallee - в 1988 г. и в 1991 г.) [1]. Для выполнения требований Manual of Diagnostic Terrestrial Animals возникла необходимость молекулярно-генетического подтверждения их видовой принадлежности и соответствия антигенного состава типовому штамму *M. bovis* AN5 [1, 9]. Кроме того, сведения об антигенном составе необходимы для текущего контроля первичных посевных серий производственного штамма, из которых готовят вторичные посевные серии для замены их после каждого четвертого производственного пассажа культуры.

Цель исследований - подтверждение видовой принадлежности штаммов *M. bovis* 8 и *M. bovis* Vallee РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» и соответствия их антигенного состава типовому для *Mycobacterium bovis*.

Материалы и методы исследований. В работе использовали штаммы *Mycobacterium bovis* № 8 и Vallee (депонированные в коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»), *Mycobacterium bovis* БЦЖ-1 246 пассажа (Государственный научно-контрольный институт им. Тарасевича, Москва). Культуры выращивали на средах Гельберга и Сотона. Для получения первичных посевных серий проводили получение и рассев единичной типичной колонии.

Для полимеразной цепной реакции (ПЦР) ДНК выделяли из суспензий бактериальной массы культур в лизирующем буфере после прогревания 5-10 мин при 100°C. Лизаты депротеинизировали, ДНК сорбировали на сорбенте и элюировали этанолом. Для идентификации применяли праймеры IS1081, IS81, IS6110, ET, MPV 70. Реакцию ставили по протоколу: 1 цикл (94°C, 4 мин), 30 циклов (94°C, 1 мин, 60°C, 1 минута, 72°C, 1 мин), 1 цикл (72°C 10 мин). С помощью источника тока «Power pac 300» (Bio-Rad) в течение 30 минут при 10 В/см ампликоны подвергали электрофорезу в 1,5% агарозном геле с бромистым этидием. Для оценки результатов использовали трансиллюминатор 2000 (Bio-Rad) с длиной волны 310нм и видеосистему для регистрации «Samsung» с программой «Cell Explorer» версия 1,0.

Для изучения антигенного состава использовали бараны, бычки и кроличьи антисыворотки к соникатам не гретых культур *M. bovis* 8, *M. bovis* Vallee (из банка сывороток отдела зоонозов и разработки диагностических препаратов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»). Для изготовления антигенов культуры выращивали на среде Сотона и инактивировали фенолом (3 - 4%), бактериальную массу дезинтегрировали на УЗДН-1 (15 кГц, 100 Вт/см<sup>2</sup>, 15 мин), клеточный детрит удаляли центрифугированием при 1000g. Содержание белка определяли по модифицированному методу Bredford и доводили до 5-6 мг/мл. Кроме этого, исследовали антигенный состав автоклавированных культуральных фильтратов *M. bovis* № 8, *M. bovis* Vallee после 8 недельного выращивания штаммов на среде Сотона (121°C, 30 мин, 0,8 мг/мл), контролем служили ППД туберкулины из штамма *M. bovis* AN5 производства Dilab Argentina и Bioveta (Польша), а также ППД туберкулин из штамма *M. bovis* 8 Курской биофабрики.

Антигенный состав исследовали в реакции иммунодиффузии (РИД), в ракетном иммуноэлектрофорезе (РИЭФ) и в перекрестном иммуноэлектрофорезе (ПИЭФ) с промежуточным гелем (ПГ).

РИД ставили на стеклах 9x12 см в 1% агаре Difco в лунках диаметром 5 мм. После 96 ч инкубации пластинки отмывали в 6% растворе хлорида натрия и в дистиллированной воде, 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 в течении ночи. После отжимания и отмывки гели высушивали и окрашивали 0,2% раствора кумасси голубым R 250 (Fluka).

**Результаты исследований.** При исследовании штаммов *Mycobacterium bovis* № 8 и Vallee (рис. 1-4)



Рис. 1 ПЦР с праймерами IS6110 (123 п.н.)



Рис.2. ПЦР с праймерами IS1081 (238 п.н.)



Рис.3. ПЦР с праймерами ET (146 п.н.)

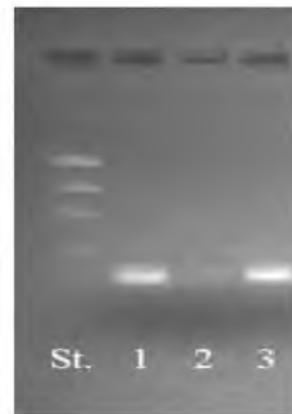


Рис.4. ПЦР с праймерами IS81 (365 п.н.)

в ПЦР с праймерами IS6110 IS1081, ET, IS81, специфичными для комплекса bovis-tuberculosis, контролем служил штамм *M. bovis* БЦЖ-1 246 пассажа (1). Установлено, что во всех случаях продукты амплификации ДНК штаммов *M. bovis* 8 (2) и *M. bovis* Vallee (3) в электрофорезе демонстрировали амплификаты соответствующих размеров (рис. 1 - 4), что позволило отнести их к *Mycobacterium bovis*.

При исследовании антигенного состава в РИД соникаты *M. bovis* 8 и *M. bovis* Vallee с гомологичными антисыворотками образовывали идентичные (плавно сливающиеся) преципитаты с преципитатами *M. bovis* БЦЖ-1 (рис.5), что свидетельствует об их антигенной идентичности.

В ПИЭФ *M. bovis* 8 и *M. bovis* Vallee формировали спектр до 23 п реципитатов. Включение в промежуточный гель бараньей антисыворотки к *M. bovis* БЦЖ-1 вызывало опускание всех преципитатов в промежуточный гель (рис.6), что подтверждает иммунологическую идентичность сравниваемых штаммов.

При исследовании в РИД автоклавированных культуральных жидкостей *M. bovis* 8 и *M. bovis* Vallee в сравнении с ППД туберкулином, приготовленным из эталонного штамма AN5 установлено, что они формировали идентичные преципитаты (рис.7)

Антигенное родство исследуемых штаммов со штаммом AN5 было также подтверждено в слитном ракетном иммуноэлектрофорезе с не гретым культуральным фильтратом *M. bovis* Vallee. Как видно на рисунке 8, все образованные преципитаты оказались двойными.

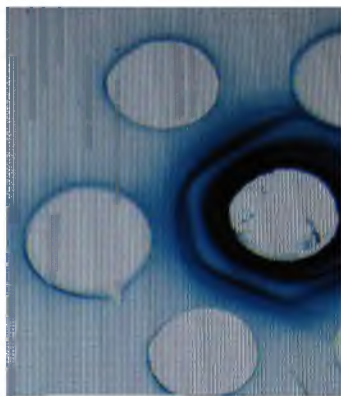


Рис. 5. РИД гамма-глобулиновой фракции сыворотки крови барана, гипериммунизированного *M. bovis* Vallee (в центральной лунке) с соникатами *M. bovis* Vallee, *M. bovis* БЦЖ-1, *M. bovis* 8 (снизу вверх)

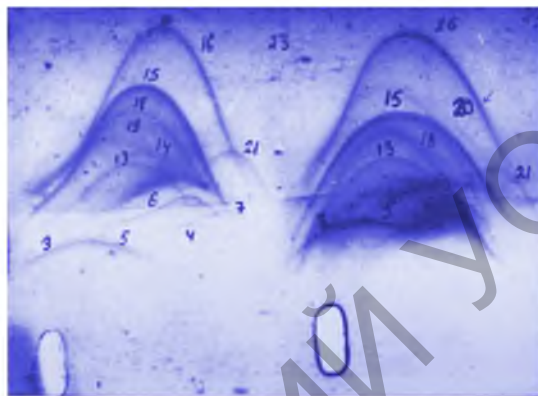


Рис. 6. ПИЭФ сониката *M. bovis* 8 с включением в промежуточный гель антисыворотки к *M. bovis* БЦЖ-1 (справа)



Рис. 7. РИД ППД туберкулина из эталонного штамма AN5 и автоклавированного культурального фильтрата *M. bovis* 8 (в центре антисыворотка к *M. bovis* Vallee)

В целом, исследования антигенного состава показали, что штаммы, предполагаемые использовать для производства туберкулина, имели типичный для возбудителей туберкулеза антигенный состав, не отличающийся от штамма *M. bovis* AN5, рекомендованного OIE для изготовления туберкулина. Более того, у сравниваемых штаммов был идентичный набор видоспецифических антигенов, которые выявлялись в РИД с моноспецифической антисывороткой *M. bovis* (рис.9). Необходимо отметить, что технология получения туберкулина с использованием ультрафильтрации, примененная на УП «Витебская биофабрика» позволяла получать туберкулин с меньшей концентрацией общеродовых антигенов. Так, на рисунке 10 представлены результаты ПИЭФ ППД туберкулина Курской биофабрики с внесением в промежуточный гель соникатов нетуберкулезных микобактерий I-IV группы по Раньону. Как видно на рисунке 10 практически все преципитаты меняют высоту или образуют базовые линии, что свидетельствует о том, что соответствующие антигены есть у нетуберкулезных микобактерий. В особенности это касается антигенов, лежащих в геле первого направления. В тоже время, результаты ПИЭФ туберкулина, очищенного ультрафильтрацией показали отсутствие именно таких антигенов (рис. 11).

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

Для обеспечения производства туберкулина были созданы первичные посевные серии, состоящие из лиофильно высушенных (по 180 флаконов) штаммов *M. bovis* 8 и *M. bovis* Vallee, которые были заложены на хранение в коллекцию культур микроорганизмов и культур клеток РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

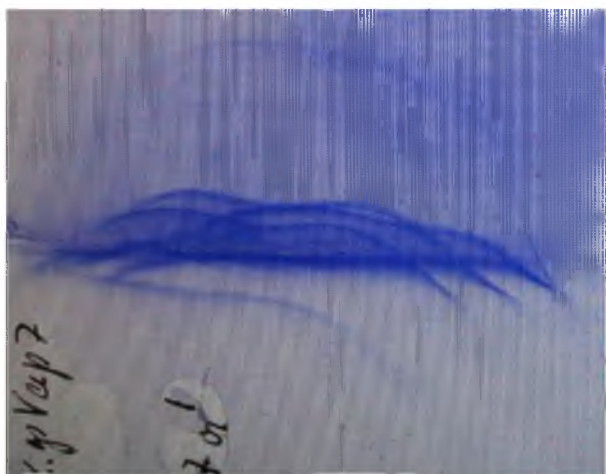


Рис. 8. Слитный ракетный иммуноэлектрофорез негетерогенного культурального фильтрата *M. bovis* Vallee с ППД туберкулином из штамма *M. bovis* AN5. В геле второго направления антисыворотка к *M. bovis* 8.

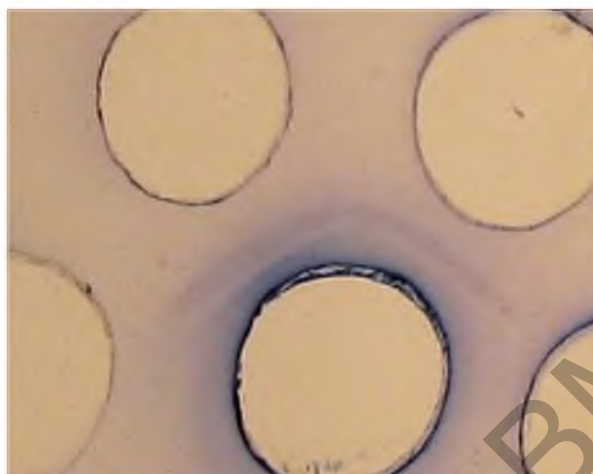


Рис. 9. РИД моноспецифической антисыворотки *M. bovis* (в центре), автоклавированной культуральной жидкости *M. bovis* 8 и ППД туберкулина из штамма *M. bovis* AN5

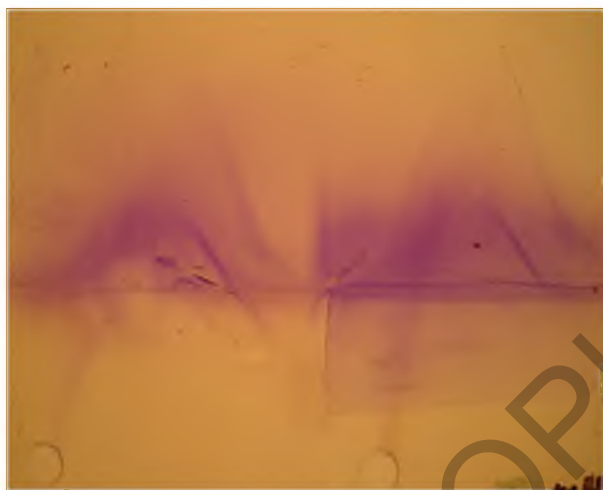


Рис. 10. ПИЭФ ППД туберкулина Курской биофабрики (круглые лунки) с антисывороткой к *M. bovis* Vallee. В промежуточный гель внесены соникаты нетуберкулезных микобактерий (*M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum*)



Рис. 11. ПИЭФ сониката *M. bovis* 8 с антисывороткой к *M. bovis* Vallee. В промежуточный гель внесено 0,2 мл туберкулина очищенного для млекопитающих УП «Витебская биофабрика»

**Заключение.** 1. Штаммы *M. bovis* 8 и *M. bovis* Vallee, депонированные в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», по данным ПЦР с праймерами IS1081, IS81, IS6110, ET, MPB 70 идентифицированы как *Mycobacterium bovis*. 2. Штаммы *M. bovis* 8 и *M. bovis* Vallee, депонированные в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» имеют типовые антигенные свойства и могут быть использованы для производства туберкулина для млекопитающих на УП «Витебская биофабрика».

**Список литературы.** 1. Лысенко, А.П. Антигены *Mycobacterium bovis* и атипичных микобактерий, изучение и применение для дифференциальной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота : автореф. дис. ... д-ра вет. наук : 16.00.03 / А.П.Лысенко ; БНИИ экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского. – М., 1994.-34 с. 2. Closs, O. The antigens of *M.bovis* strains BCG. Studied by crossed immunoelectrophoresis a reference system / O.Closs [et al] // Scand. J. immunol. – 1980. – № 12. – P. 249-263. 3. Cross-reactions between *Mycobacteria*.II. Crossed immunoelectroforetic analysis of soluble antigens of BCG and comparison with other *Mycobacteria* / M. Harboe [et al.] // Scand. J. immunol. – 1979. – Vol. 9. –P. 115-124. 4. Fiffis, T. Soluble *M. bovis* protein antigens: studies on their purification and immunological evaluation / T. Fiffis, J. Rothel, P. Wood // Vet. Microbiol. -1994. - 40 (1-2). - P. - 65-81. 5. Manual of Diagnostic Terrestrial Animals (5<sup>th</sup> edition, 2004). 6. Юсковец, М.К. Туберкулез сельскохозяйственных животных и птиц / М.К. Юсковец. - Мн. : Ураджай,1963.- 448 с. 7. 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. 8. 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. 9. Шаров, А.Н. ПЦР при диагностике туберкулеза у крупного рогатого скота / А.Н. Шаров, И.П. Суханов, Л.А. Ероменко // Полимеразная цепная реакция в диагностике и контроле лечения инфекционных заболеваний : материалы II Всероссийской научно-практич. конф., Москва, 20 - 22 янв. 1998 г – Москва, 1998 – С. 103 — 104.

Статья передана в печать 3.01.2011 г.