

статистика України (2000-2006 рр.) – Київ: Центр медичної статистики МОЗ України, 2006. – 384 с. 7. Черкасский Б. Л. Эпидемиология зоонозов / Б. Л. Черкасский // Руководство по зоонозам; под ред. В. И. Покровского. – Л.: Медицина, 1983. – С. 19–38.

Статья передана в печать 05.09.2012 г.

УДК 619:616.98:579.873.21-07636.2

ПОЛУЧЕНИЕ ВЫСОКОАКТИВНОГО И СПЕЦИФИЧЕСКОГО АЛЛЕРГЕНА ДЛЯ МАССОВОЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЁЗА У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Притыченко А.Н.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»
г. Витебск, Республика Беларусь, 210026

Ультрафилтрация туберкулопротеинов позволила разработать мембранную технологию получения аллергена для диагностики туберкулеза животных с использованием современного оборудования, которая внедрена на ГП «Витебская биофабрика».

Ultrafiltration membrane tuberkuloproteins allowed to develop technology for the production of allergen for the diagnosis of tuberculosis animals using modern equipment, which is integrated in the Enterprise "Vitebsk Biofactory."

Введение. Туберкулинодиагностика была основой программ оздоровления и определила успех их реализации. Вместе с тем, к настоящему времени, стала заметна активизация эпизоотической и эпидемической обстановки. В благополучных странах периодически отмечаются вспышки болезни, растет число реагирующих на туберкулин животных, заболеваемость людей поднимается до эпидемического порога [8, 10].

Можно предположить, что приемы борьбы с болезнью, эффективные при ее широком распространении, не дают ожидаемого эффекта в условиях превалирования скрытой туберкулезной инфекции и отмечающейся изменчивости и адаптации возбудителя [3, 5].

Расшифровка генома, новые методы исследований открыли целый ряд ранее не известных адаптационных свойств МБТ для сохранения вида в условиях химиотерапии, воздействия дезинфектантов, разрыва эпидемической цепи [3, 7].

Не только при производстве туберкулина, но и в системе мер профилактики широко используют термическую инактивацию. Считается, что не только автоклавирование при 120°C, но и пастеризация при 75°C убивает возбудитель [2]. Вместе с тем, это может быть не столь однозначно. Straus, Gamaleia еще в 1891 г. обнаружили, что автоклавированные МБТ могут вызывать у животных казеозные поражения и перитонит (некротуберкулез) [2, 10]. Grancher, Ledoux – Lebard (1901) установили устойчивость высушенного возбудителя к нагреванию до 100°C [10]. Разработка новых средств бактериологической диагностики, в частности, стимуляторов роста и питательных сред ВКГ и Микофаст для выращивания измененных (трансформированных) микобактерий туберкулеза, существенно расширила возможности изучения биологии возбудителя болезни и его устойчивости к неблагоприятным факторам [3, 5, 7]. С использованием новых питательных сред было установлено, что туберкулины содержат защитные образования в виде спор, из которых МБТ могут восстанавливать жизнеспособность в виде некислотоустойчивых измененных форм [3, 7].

Сообщения о существовании у возбудителя туберкулеза спор или подобных им защитных структур появились достаточно давно [10], но только в последнее время это достоверно подтверждено с использованием современных молекулярно-генетических методов [3].

Предполагается, что автоклавирование вызывает гибель патогенных бацилл, но не предотвращает образования защитных термостабильных форм, выдерживающих высокую температуру и проходящих через стерилизующие фильтры [5]. Вероятно, в этом процессе принимают участие белки теплового шока (heat shock proteins – hsp) и другие регуляторные белки, синтез которых у микобактерий резко возрастает при подъеме температуры и они в значительных концентрациях присутствуют в туберкулинах [3].

Туберкулины строго контролируются производителями на безопасность [14], но полученные сведения о защитных структурах МБТ нельзя игнорировать. Изоляты из туберкулинов оказались способными к длительной персистенции в организме и частичному восстановлению кислотоустойчивости. Пока нет данных о возможности восстановления их патогенности, но проблема нуждается в дальнейшем изучении.

В мировой практике для диагностики туберкулеза чаще применяют PPD (Purified Protein Derivative) – белок (туберкулопротеин), выделенный химическим путем из культурального фильтрата возбудителя туберкулеза, выращенного на синтетической питательной среде. Такой туберкулин представляет смесь фракций разной молекулярной массы, в том числе и высокомолекулярных антигенов, которые снижают видовую специфичность [11, 12, 13].

Технологии производства PPD туберкулина имеют ряд недостатков: потери туберкулопротеинов (до 80%), вероятность контаминации и протеолиза, использование токсичных реагентов, загрязняющих окружающую среду [8].

В этой связи для получения очищенных препаратов туберкулина и его концентрирования предпринимались попытки использования ультрафилтрации. Описан способ получения туберкулина,

включающий выращивание штамма, автоклавирование, стерилизующую фильтрацию и ультрафильтрацию для очистки целевого продукта на мембранах со 100 и 15 кДа. После ультрафильтрации через мембраны 100 кДа ретентат отбрасывают. Фильтрат концентрируют на мембранах 15 кДа и используют в качестве целевого продукта [1, 4]. Недостаток способа - потеря фракции с массой молекул 100-300 кДа с высокой специфической активностью, что снижает выход и качество целевого продукта [6, 8]. Это было подтверждено и в наших исследованиях [8]. Вместе с тем, полученные результаты позволили предположить технологическую схему, включающую выращивание штамма *M. bovis* №8 на синтетической питательной среде, автоклавирование, стерилизующую фильтрацию и ультрафильтрацию на мембранах с порогом задержания 300 кДа, концентрирование целевого продукта на мембранах 10 кДа [6, 8].

Таким образом, несмотря на определённые успехи в получении аллергенов перспективным направлением является получение высокоактивного и специфического препарата для массовой диагностики туберкулеза животных.

Цель исследований – изучение возможности получения высокоактивного и специфического аллергена для массовой диагностики туберкулёза у крупного рогатого скота

Материалы и методы исследований. Работа выполнена на кафедре микробиологии и вирусологии УО ВГАВМ, УП «Витебская биофабрика», в отделе зоонозов и разработки диагностических препаратов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Параметры ультрафильтрации обрабатывали на установках Minitan II S с мембранами РНТК с пределом задержания 100, 30 и 10 кДа.

На мембране 100 кДа собирали задерживаемую фракцию - ретентат, (Р100) и фильтрат (Ф100). Часть фильтрата Ф100 подвергали ультрафильтрации на мембране 30 кДа, собирая ретентат 30 (Р30) и фильтрат 30 (Ф30). Из части Ф30 на мембране 10 кДа, получены фракции Р10 и Ф10.

Путем смешивания равных объемов каждого сониката получили антиген, который на дезинтеграторе Vandelin диспергировали в эмульсии. Полученную смесь использовали для реиммунизации 2 волов-продуцентов (из расчета 200 мкг на 1 кг массы) с последующей бустер-инъекцией через 60 суток.

Туберкулины, использованные в работе:

Туберкулины вводили безыгольными инъекторами. Расстояние между точками инъекции составляло 15-20 см. Реакции учитывали через 72 ч. путем измерения утолщений кожных складок.

- стандартный раствор ППД туберкулина для млекопитающих Курской биофабрики (серии изготовленные в разные годы);

ППД Sanofi сер.02796/2

- PPD tuberculina mamifera AN5, Rosenbusch, Argentina, 3412487 H, SENASA 121 12/06 ELAB;

Первой контрольной серией, которую стандартизированной по международному эталону была серии 37 TO. В работе использовали 1st International standard PPD *M. bovis* (IS PPD), полученный из NIBSC. 1 ампула эталона содержала 1,8 мг туберкулопротеина с активностью 58000 IU. При добавлении в ампулу 1,8 мл растворителя получали раствор с концентрацией 1 мг/мл или 32500 IU/мл.

Для оценки эффективности технологии *M. bovis* 8 выращивали на среде Сотона при 37° С 8 недель, инaktivировали автоклавированием при 121° С 30 мин. Бактериальную массу отделяли фильтрацией через «грубый» и стерилизующий фильтры. Культуральный фильтрат (0,3-0,5 мг/мл) подвергли ультрафильтрации через мембраны РТМК 300К (РТМКОМР04) с задерживающей способностью 300 кДа до уменьшения объема ретентата (задерживаемой фракции Р300) не более, чем в 20 раз.

Полученный фильтрат (Ф300) концентрировали на мембранах с пределом задержания 10 кДа до концентрации туберкулопротеинов 0,6±0,18 мг/мл. Концентрат стабилизировали добавлением фенола, глицерина и твина 80 (соответственно 0,5%, 10% и 0,001%).

Результаты исследований. Полученный образец (туберкулин очищенный серия ТО-00) был проверен на активность по ГОСТ 16739-88 в сравнении с ППД туберкулином Sanofi philaxia сер.02796/2 и ППД Курской биофабрики на морских свинках и крупном рогатом скоте (таблицы 1 и 2).

Как видно из таблицы 1, сумма диаметров папул у морских свинок и, следовательно, активность ТО-00 и ППД Sanofi (50000 ME/мл) существенно не различалась. По ГОСТ 16739-88 активность ТО-00 составила 151:149 x 50000 M.E. = 50650 ME в 1 мл. Результаты оценки зависимости диаметра папул от логарифма дозы представлены на рис. 38. Как видно, линии активности накладывались друг на друга, что также свидетельствует о равной активности сравниваемых препаратов.

Таблица 58

Активность ТО-00 на морских свинках, сенсibilизированных *M. bovis* BCG -1

Номера животных	Диаметр папул в мм через 24 ч после введения			
	ППД туберкулина Sanofi сер.02796/2 (1 мг/мл)		Испытуемая серия ТО-00	
	100 ME	10 ME	1 разведение	2 разведение
1	9	9,5	9	6
2	15	8	16	9
3	13	7	14	11
4	12	11	13	10
5	10	6,5	11	7
6	8	6,5	9	5
7	9	5	9	5
8	12	7,5	9	8

М	11	7,63	11,3	7,63
Сумма диаметров	149		151	

При испытании на крупном рогатом скоте, зараженном *M. bovis* VCG (табл. 2), в 4 случаях реакции на контрольную серию ППД Курской биофабрики были интенсивнее, в 4 случаях менее интенсивными, чем на ТО, что при интерпретации реакций по ГОСТ 16739-88 указывает на их равную аллергическую активность.

Изучение специфичности ТО-00 проведено в сравнении с ППД серии 11 Курской биофабрики в длительно благополучном по туберкулезу стаде. Установлено, что из 102 обследованных коров реакция на туберкулины отмечена у 5 животных (табл. 38).

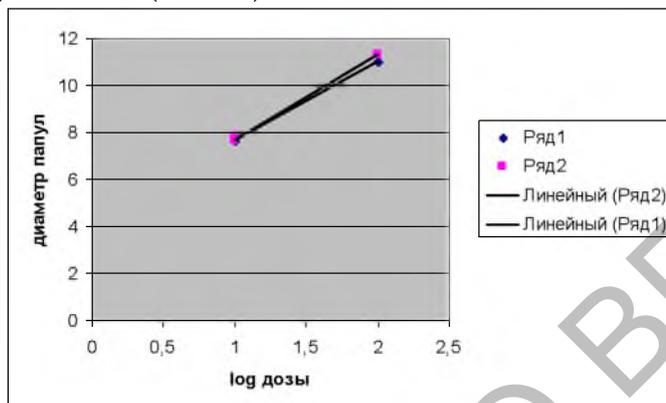


Рис. 38. Зависимость диаметра папул от логарифма дозы ППД туберкулина Sanofi и ТО-00 при введении морским свинкам, сенсibilизированным *M. bovis* VCG -1

Таблица 59

Интенсивность реакций у крупного рогатого скота, инфицированного *M. bovis* VCG -1 на ТО-00 и ППД туберкулинов для млекопитающих

№ животного	Доза	Утолщение кожных складок в мм через 72 ч		Оценка интенсивности реакций
		ППД серии 20	ТО-00	
3685	5000МЕ	8	9	+
3776	5000МЕ	18	7	-
3212	10000МЕ	14	11	-
4783	10000МЕ	2	3	+
3837	10000МЕ	14	6	-
3246	10000МЕ	18	16	-
3609	10000МЕ	12,5	16	+
9758	10000МЕ	8	10,5	+

Таблица 60

Сравнение специфичности ТО-00 и ППД туберкулина Курской биофабрики в длительно благополучном по туберкулезу стаде

№ коровы, кличка	Утолщения кожных складок через 72 ч (в мм)	
	ППД сер.11 5000МЕ	ТО-00 5000МЕ
Мечта	3	2
316	5	4
Фея	6	6
Рада	4	3
929	4	2

Как видно из таблицы 59, все 5 выявленных коров реагировали на ППД туберкулинов с утолщением кожной складки на 3 мм и более. Но только 3 коровы реагировали на ТО-00, что указывает на его большую специфичность (на 40%).

Для оценки материального потока и баланса туберкулопротеинов при воспроизведении метода, 10 л культурального фильтрата с содержанием туберкулопротеинов 0,25 мг/мл или 2500 мг во всем объеме подвергли ультрафильтрации через мембраны РТМК 300К. В результате было получено 500 мл ретентата (удаляемой фракции) и 9500 фильтрата. Содержание туберкулопротеинов в ретентате составило 0,6 мг/мл или 300 мг в общем объеме. Полученный фильтрат (9500 мл) содержал 2200 мг туберкулопротеинов (0,23 мг/мл).

9500 мл фильтрата концентрировали на мембранах РТМК ОМР04 с пределом задержания 10 кДа до объема 3166 мл (в 3 раза). В полученном концентрате содержание туберкулопротеинов составило 0,66 мг/мл (всего 2089 мг).

В каждом тесте на морских свинках активность 1 мл полученного продукта составила 50650 МЕ, т.е. он отвечал требованиям ГОСТ 16739-88. Полученный объем содержал 3166 мл : 0,2 мл = 15830

диагностических доз. Следовательно, из 10 литров культурального фильтрата удалось получить 15830 доз туберкулина, что на 40-50% больше, чем по традиционной методике получения ППД туберкулина.

На основании проведенных исследований была разработана промышленная технология получения туберкулина очищенного для млекопитающих, которая была внедрена на реконструированном ГП «Витебская биофабрика».

Заключение. Последовательная ультрафильтрация как негретого, так и автоклавированного культурального фильтрата *M. bovis* на мембранах с пределом задержания 100, 30 и 10 kDa не позволяет получить фракцию, которую можно использовать в качестве диагностикума. При последовательной ультрафильтрации культурального фильтрата *M. bovis* на мембранах с пределом задержания 100, 30 и 10 kDa отмечена тенденция роста видовой специфичности с уменьшением размера молекул. Ультрафильтрация культурального фильтрата *M. bovis* на мембранах с пределом задержания 300 kDa позволяет разделить его на высокомолекулярную фракцию (ретентат) с массой молекул более 300 kDa, в которой концентрируется основная масса низкоспецифичных перекрестно реагирующих антигенов и фильтрат с массой молекул менее 300 kDa с видовой специфичностью в каждой пробе, превосходящей ППД туберкулин. Изучение эффективности ультрафильтрации для очистки туберкулопротеинов позволило разработать мембранную технологию получения аллергена для диагностики туберкулеза животных с использованием современного оборудования, которая внедрена на ГП «Витебская биофабрика».

Литература. 1. Безгин, В.М. Совершенствование промышленной технологии (ППД) туберкулина и его биохимическая характеристика : автореф. дис. ... канд. вет. наук : 16.00.03 / В.М. Безгин ; ВАСХНИП. – Москва, 1990. – 27 с. 2. Василев, В.Н. Микобактериозы и микозы легких / В.Н. Васильев // София : Медицина и физкультура. - 1971. - С. 9-13, 30-37, 42-53, 181-202, 205-227, 231-271. 3. Власенко, В.В. Микробиология туберкулеза в фокусе проблем современности / В.В. Власенко. – Винница : «Гипанис», 1999 – 224 с. 4. 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. 5. Леммиш, А.П., Выявление адаптивных форм микобактерий в туберкулинах Современные проблемы инфекционной патологии человека / А.П. Леммиш, Т.П. Новик, Архипов И.Н., Притыченко А.Н., Власенко И.Г. // Сборник научных трудов. - Выпуск 1. - Минск - «Белпринт», 2008. - с. 227-230. 6. Лысенко, А.П. Антигены *M. bovis* и атипичных микобактерий, изучение и применение для дифференциальной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота : автореф. дис. ... докт. вет. наук : 16.00.03 / А.П. Лысенко ; Бел. НИИ экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского. - Мн., 1994. - 35 с. 7. Лысенко, А.П. Туберкулез животных и человека в свете новых данных о возбудителе болезни / А.П. Лысенко // Ветеринарная наука – производству. Научные труды РНИУП ИЭВ, 2005. - Т. 37. – С. 73-78. 8. 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. Вышелесского. – Минск, 2002. - 17 с. 9. Шаров, А.Н. Аллергическая диагностика туберкулеза у животных : повышение её эффективности : автореф. дис. ... докт. вет. наук : 16.00.03 / Всесоюзный ин-т экспериментальной ветеринарии. - М., 1989. - С. 9-10, 32-34. 10. Юсковец, М.К. Туберкулез сельскохозяйственных животных и птиц / М.К. Юсковец. – Минск : Ураджай, 1963. - 448 с. 11. Dorset, M. A Comparison of Koch's old Tuberculin with a New Synthetic Medium Tuberculin. / M. A Dorset // J. Amer. Vet. Med. Ass., V. 84. 1934, P. - 439-449. 12. Green, H. Weybridge PPD tuberculins / H. Green // The Veterinary Journal 102, 1946. – P. 267-268. 13. Haagsma, J. A comparison of the relative potencies of various bovine PPD tuberculins in naturally infected tuberculous cattle / J. Haagsma [et al.] // J. Biol. Stand. –1982. – Vol. 10. - P. 273-284. 14. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals, 5th edition, 2004.

Статья передана в печать 18.09.2012 г.

УДК 619:579.873.21

СПЕЦИФИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ППД ТУБЕРКУЛИНА И АВТОКЛАВИРОВАННОГО КУЛЬТУРАЛЬНОГО ФИЛЬТРАТА *MYCOBACTERIUM BOVIS* В ИФА И В КОЖНОЙ АЛЛЕРГИЧЕСКОЙ ПРОБЕ НА МОРСКИХ СВИНКАХ

Притыченко А.Н.

Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь, 210026

Автоклавированные культуральные фильтраты Mycobacterium bovis 8 содержат на 11 - 22% больше перекрестнореагирующих компонентов, чем ППД туберкулин, их перекрестная активность в кожной аллергической пробе не отличается от ППД туберкулина. Повышение специфичности туберкулина эффективнее за счет группового фракционирования и удаления высокомолекулярной фракции, а также удаления общеродовых антигенов биоспецифическим методом.

Autoclaved Mycobacterium bovis 8 culture filtrate contains to 11 - 22% more crossreacting components than PPD tuberculin, their activity in the cross-patch test is no different from PPD tuberculin. Increasing the specificity of the tuberculin is more efficient through group fractionation and removal of high molecular weight fraction, and the removal of comongeneric antigens by biospecific method.

Введение. Туберкулез остаётся серьёзной проблемой в инфекционной патологии человека и животных во всём мире. В нашей стране благополучие по туберкулезу обеспечивается проведением плановых массовых мероприятий [2, 5, 6].