

падеж – 2,0 – 4,0%.

У поросят 1, 2, 3 и 4 опытных групп заболеваемость к 90 суточному возрасту составила 11,0; 10,0; 19,0 и 12,0%, а падеж соответственно 3,0; 3,0; 7,0 и 4,0%.

Таблица 2 – Хозяйственно-экономические показатели эффективности иммунокоррекции препаратом “ПулСал”

Показатели	№ опытной группы поросят				
	1	2	3	4	5 (контроль)
Заболеваемость с отъема до 60 суток, %	3,0	3,0	9,0	4,0	15,0
Падеж с отъема до 60 суток, %	2,0	2,0	4,0	2,0	6,0
Привес с отъема до 60 суток, г/сутки	282	284	251	280	247
Заболеваемость с отъема до 90 суток, %	11,0	10,0	19,0	12,0	28,0
Падеж с отъема до 90 суток, %	3,0	3,0	7,0	4,0	10,0
Привес с отъема до 90 суток, г/сутки	400	402	388	396	380
Средний вес поросенка в 90 суточном возрасте, кг	30,20	30,35	29,22	29,89	28,65
Повышение веса поросят опытных групп по сравнению с контролем	+ 1,55	+ 1,7	+ 0,57	+ 1,24	

Наиболее низкая заболеваемость поросят отмечалась в 1, 2 и 3 группах и составила 10,0 – 12,0%. Наиболее высокая сохранность установлена в 1, 2 и 3 группах животных – 96,0 – 97,0%.

Прирост живой массы за период наблюдения был выше у поросят, обработанных препаратом “ПулСал” серии №3, 4 и 5 при этом наиболее значимо у животных 1, 2 и 4 групп и составило 396 – 402г, в то же время в контрольной группе – 380г/сутки. Средний вес поросят 1, 2 и 4 опытных групп к 90 суточному возрасту был выше, чем в контрольной группе соответственно 1550г, 1700г и 1240г.

Заключение. По результатам проведенных исследований можно сделать следующие выводы:

Препарат “ПулСал” серии №3, 4, 5 является безвредным для лабораторных животных и повышает иммунологические показатели крови у поросят;

Наиболее выраженным иммунокорректирующим эффектом при четырехкратном и шестикратном введении обладает препарат серии №3, полученный из баксуспензии, содержащей 50 млрд/см³ м. к. сальмонелл.

Литература: 1. Бабина, М.П. Профилактика желудочно-кишечных болезней у цыплят-бройлеров микробным полисахаридом / М.П. Бабина // Ученые записки ВГАВМ. - Витебск, 1999. - Т. 35, ч. 1. - С. 157-159. 2. Бабина, М.П. Препарат Сальмопол в повышении неспецифической и адаптивной защиты против болезни Ньюкасла / М.П. Бабина // Ученые записки ВГАВМ. - Витебск, 2001. - Т. 37, ч. 2. - С. 7-8. 3. Баева, Е.В. Функции иммунной системы при стрессовых воздействиях в раннем постнатальном онтогенезе: Автор. дисс. ... докт. биол. наук: 14. 00. 16. / Е.В. Баева // НИИ эксп. медиц. - Ленинград, 1991. - 34 с. 4. Басова, Н.Ю. Иммунологическая реактивность и её коррекция при респираторных болезнях телят / Н.Ю. Басова, А.Ч. Шипицин // Ветеринария. - 2005. - №12. - С.18. 5. Иммунотерапевтические возможности применения липида у больных с вторичными иммунодефицитными состояниями. Метод. реком. М., 1996. 6. Карпуть, И.М. Профилактика гастроэнтеритов у поросят посредством коррекции иммунной недостаточности / И.М. Карпуть, В.М. Проценко, Т.Р. Жишкевич // Ученые записки ВГАВМ. - Витебск, 1999. - С. 180-182. 7. Ковзов, В.В. Лечение телят, больных энзоотическим зобом с коррекцией иммунного статуса / В.В. Ковзов // Ученые записки: Материалы научно-практической конференции, посвященной 70-летию клинических кафедр, г. Витебск, 14-15 апреля 1998г. - Витебск, 1998. - С. 42-44. 8. Красочко, П.А. Бактериальный липополисахарид – стимулятор поствакцинального иммунитета при вирусных, респираторных инфекциях телят / П.А. Красочко, В.А. Машеро // Ученые записки ВГАВМ. - Витебск, 1998. - С. 144-146. 9. Красочко, П.А. Иммулитет и его коррекция в ветеринарной медицине / П.А. Красочко [и др.]. - Смоленск, 2001. - 340 с. 10. Начарова, Е.П. Превентивная иммунокоррекция как способ повышения эффективности и безопасности вакцинации / Е.П. Начарова, С.М. Харит, С.В. Петленко // Terra Medica. - 2004, 1(33). - Р. 134-137. 11. Орлов, Т.В. Зависимость эффективности вакцинопрофилактики гриппа от исходного состояния иммунной системы / Т.В. Орлов, Ю.Г. Суховой, И.Г. Унтер // Эпидемиол. вакцинопроф. - 2004. - 4(17). - С. 17-20. 12. Проценко, В.М. Липополисахариды в коррекции иммунной недостаточности в профилактике гастроэнтеритов у поросят / В.М. Проценко, Т.Р. Жишкевич // Ученые записки ВГАВМ. - Витебск, 1998. - С. 66-88. 13. Семенов, Т.А. Эпидемиологическое обоснование применения иммуномодуляторов для профилактики массовых инфекционных заболеваний человека: Автореф. дисс. ... доктора мед. наук / Т.А. Семенов. - М., 1989. - 36 с. 14. Шляхов, Э.Н. Стимуляция поствакцинального процесса (на примере иммунизации против сибирской язвы) / Э.Н. Шляхов, В.Ф. Кику. - Кишинев: Штипанца, 1984. - 200 с.

УДК 619: 579. 842. 11

ПОЛУЧЕНИЕ АДГЕЗИВНЫХ АНТИГЕНОВ E. Coli

Зайцев В.В., Билецкий М.О.

УП “Витебская биофабрика”, Республика Беларусь

Авторами статьи разработан метод очистки и концентрирования адгезивных антигенов эшерихий с использованием мембранной технологии, который позволяет получать очищенный препарат, удельная активность которого в 2 – 4 раза выше, чем не очищенного.

A technique for purification and concentrating the adhesive antigens of E. coli using a membrane technology yielding a purified substance with a 2-4 times higher efficiency has been developed.

Введение. Способность прикрепляться (адгезия) к различным поверхностям широко распространена среди микроорганизмов. Природа феномена адгезии длительное время не изучалась, однако в последние годы сформировался единый методологический подход, позволяющий рассматривать взаимодействие микробных клеток с чужеродными поверхностями в аспекте общих закономерностей явления биологического узнавания.

Что касается адгезии бактериальных клеток к клеткам тканей микроорганизма, то наиболее изучено взаимодействие со слизистой оболочкой желудочно-кишечного тракта.

Некоторые виды микроорганизмов, прикрепляющиеся к участкам поверхности желудочно-кишечного тракта, где подвижность содержимого просвета и слизи более интенсивная, нуждаются в специальных структурах, с помощью которых они связываются с мембраной эпителиальных клеток.

В бактериальной клетке функцию распознавания и прикрепления несут субстанции, названные адгезинами. Адгезины – компоненты бактериальной поверхности. Они участвуют в прикреплении бактерий к другим поверхностям. Часто они входят в состав органелл – фимбрий. Поскольку фимбриии известны в основном для грамотрицательных бактерий, а функция прикрепления свойственна всем бактериям, то можно считать, что роль адгезинов выполняют и макромолекулы, не входящие в состав фимбрий.

Функциональные особенности фимбрий свидетельствует об их способности узнавать различные структуры на поверхности чувствительной эукариотической клетки и связывается с ними. В основе специфического прикрепления фимбрированных бактерий к клеткам определенных тканей в макроорганизме лежит средство соответствующих фимбриальных адгезинов к структурам, выполняющим функцию рецепторов. Однако помимо комплементарного взаимодействия, в адгезии участвуют силы (гидрофобные, электростатические), обуславливающие неспецифическое прикрепление фимбрий.

Штаммы *E. coli*, вызывающие кишечную патологию, могут быть разделены на две группы. Первую группу составляют инвазивные штаммы, вызывающие дизентериеподобный синдром (энтероколиты). Во вторую группу входят неинвазивные формы, ответственные за развитие диарейного синдрома у животных или человека. Неинвазивные энтеропатогенные штаммы характеризуются двумя особенностями: 1) размножаются и колонизируют область тонкого кишечника и 2) продуцируют один или больше энтеротоксинов [10].

У штаммов второй группы токсины, ответственные за развитие энтеротоксического эффекта, к первой стадии взаимодействия микроба с клетками эпителия кишечника отношения не имеет. Эта стадия осуществляется поверхностно расположенными субстанциями, названными адгезинами.

Адгезины у кишечной палочки выполняют роль медиатора в прикреплении микробной клетки к микроворсинкам эпителия, и поэтому часто рассматриваются как фактор колонизации. С помощью адгезинов осуществляется процесс узнавания энтеротоксигенной кишечной палочки соответствующей ткани в тонком кишечнике, чувствительной к действию токсина, продуцируемого этим патогенном.

У кишечной палочки существует несколько видов адгезинов, характеризующиеся различной специфичностью в отношении отдельных видов эукариотических клеток. Все эти адгезины входят в состав фимбрий или фимбриоподобных образований, посредством которых и осуществляется связывание.

В узнавании и колонизации эпителиальной ткани у кишечной палочки участвуют адгезины, обозначенные как CFA/1, CFA/11, K99, K88, F41 и 987P. Адгезины CFA/1 и CFA/11 свойственны штаммам, вызывающим энтеротоксигенный эффект у человека [7, 8, 9]. Адгезин K99 обнаружен у штаммов, энтеротоксигенных для телят, ягнят и поросят [11]. Адгезин K88 и 987P свойственны штаммам, вызывающим диарею у поросят. Адгезин F41 обнаружен в штамма, энтеропатогенных для телят [6]. Однако адгезия кишечной палочки часто обусловлена не одним, а несколькими адгезинами.

По химической природе адгезины кишечной палочки представляют собой белки. Фибриллы, образованные адгезином (антигеном K88), имеют длину 0,1-1 мкм и диаметр 2,1 нм. У них отмечена тенденция к скручиванию и образованию узлов и агрегатов различного размера. Фибриллы легко отделяются от клетки и поэтому могут быть обнаружены как в связанном, так и свободном состоянии. Макромолекулы фибрилл состоят из отдельных идентичных субъединиц антигена K88, количество которых в единичной нити достигает 100.

Адгезин K88 характеризуется антигенной гетерогенностью. В настоящее время известно несколько серологически различных вариантов этого адгезина: K88ab, K88ac, K88ad, K88ad(e). Однако, несмотря на иммунологическую гетерогенность все эти адгезины имеют общую антигенную детерминанту, обозначенную K88a.

Адгезин K99 был выделен из штаммов *E. coli*, вызывающих диарею у телят и ягнят. Адгезин образует фимбриии спиралевидной формы с диаметром 4,8 нм [12].

Адгезин 987P продуцируется штаммами *E. coli* выделенными от свиней и образует на поверхности клетки фимбриии, диаметром 7 нм и внутренним осевым каналом.

Адгезин 987P выделенный и очищенный методом повторного переосаждения $MgCl_2$, представляет собой белок с молекулярной массой 19000-20000 и изоэлектрической точкой 3,7 [12].

На поверхности бактериальной клетки адгезин F41 образует нитевидные структуры с диаметром 3,2 нм. Адгезин получен в виде высокоочищенного препарата. Показано, что выделенный белок состоит из субъединиц с молекулярной массой 29500 [6]. Адгезин носит моннозонаезависимый характер и подавляется формальдегидом и предварительным нагреванием.

Причиной заболевания и гибели поросят и телят в течение двух недель после опороса или отела в 80% случаев является неонотальная колидиарея [1].

В большинстве случаев колидиарею вызывает кишечная палочка энтеротоксигенных штаммов с адгезивными антигенами K88, K99, F41 и P987 [2, 3, 4, 5].

С помощью адгезинов (пилей) бактерии прикрепляются к эпителиальным клеткам верхних участков кишечных ворсинок, в криптах, как правило, эшерихии не обнаруживаются.

Пили выполняют функцию якоря, способствуют колонизации бактерий в кишечнике. При фиксации на слизистой оболочке бактерии выделяют энтеротоксин в клетки хозяина, метаболизм их изменяется, ухудшается всасываемость.

В просвете кишечника накапливается повышенное количество жидкости. Это приводит к диарее, дегидратации, ацидозу и гибели животных.

Создание вакцины на основе адгезивных антигенов с целью формирования антиадгезивного иммунитета, обеспечивает защиту животного от колиинфекции на стадии прикрепления патогенных бактерий к эпителиальным клеткам слизистой кишечника.

Исходя из приведённых выше данных, нами были получены и изучены препараты адгезинов K88, K99, F41 и P987. Биомассу производственных штаммов. Эшерихий – продуцентов адгезивных антигенов получали на питательных средах определённой рецептуры.

Цель настоящих исследований – разработка метода очистки и концентрирования адгезивных антигенов эшерихий с использованием мембранной технологии.

В задачу исследований входило: выбор ультрафильтрационных мембран, обеспечивающих оптимальную селективность и производительность процесса, а так же изучение влияния некоторых факторов на процесс концентрирования адгезинов методом ультрафильтрации.

Материалы 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 $\text{дм}^3/\text{м}^2 \text{ ч}$;

S – поверхность фильтрации, м^2 ;

t – время фильтрации, ч;

V – объём фугата, дм^3 .

А так же по их селективности, которую рассчитывали по формуле в %:

$$U=(A_u-A_n/A_n) \cdot 100\%$$

где A_u – активность адгезина в РИД в исходном растворе;

A_n – активность адгезина в РИД в пермеате.

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

Кратность концентрирования определялась соотношением:

$$K=V_u/V_k$$

где V_u – исходный объём фугата, дм^3 ;

V_k – объём концентрата, см^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 РА.

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

В нём содержатся остатки питательной среды, ферментативно активные и неактивные белки, бактериальные клетки продуценты, 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, фальт-пластины "Ф" и фильтр ФПКН-3-0,5. Полученные фильтраты далее очищали с использованием мембран с разными характеристиками. Проведённые 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, отделённой от питательного раствора;

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

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

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

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

Способ № 6 – адгезин готовили из $100 \text{млрд. м.т./см}^3$ взвеси эшерихий не отделённых 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	Ф41
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
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 согласно НД (контроль)	1: 8	1:200	1:200	1:200	1:200

Из результатов приведенных в таблице 1 видно, что получение адгезинов эшерихий с высокой биологической активностью обеспечивает способ №5.

Таким образом, для повышения выхода и активности адгезинов, экстракцию эшерихий проводят без отделения от культурной среды, полученный экстракт очищать на фильтре ФПКН-3-0,5, а далее их доочищать и концентрировать на мембранах УПМ-5 и УПМ-50.

Заключение. В ходе проведенных исследований получены результаты, на основании которых можно сделать следующие выводы:

1. Получение адгезивного антигена необходимо осуществлять из баксуспензии эшерихий, отделённой от питательного раствора, путем очистки и концентрирования с помощью мембран УПМ-5 и УПМ-50.

2. Разработанные условия очистки и концентрирования адгезивных антигенов эшерихий позволяют получить очищенный препарат, удельная активность которого в 2 – 4 раза выше, чем не очищенного.

Литература: 1. 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. 2. Гутковский, А.А. К методике исследования превентивных свойств сыворотки крови при разработке противозэшерихиозных биопрепаратов / А.А. Гутковский // Ветеринарные и зооинженерные проблемы животноводства. – Витебск, 1996. – 97с. 3. Гутковский, А.А. Первичный и вторичный колибактериоз поросят-отъемышей в комплексах / А.А. Гутковский // Ветеринарные и зооинженерные проблемы животноводства. – Витебск, 1996. – С.97-98. 4. Зелютков, Ю.Г. Идентификация адгезивных антигенов патогенных эшерихий / Ю.Г. Зелютков // Ученые записки ВГАВМ. – Витебск, 1995. – Т. 32, ч.1. – С. 108-110. 5. Ломако, Ю.В. Получение протективных антигенов на основе фимбриальных адгезинов и исследование их свойств / Ю.В. Ломако // Ученые записки ВГАВМ. – Витебск, 2002. – Т. 38, ч.1. – С. 66-68. 6. De Graat, F.K. Production, purification and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 isolated from calf enteropathogenic *Escherichia coli* strain B41 M / F. de Graat, I. Roorda // Infect. Immun. – 1982. – Vol. 36. – P. 751-753. 7. Evans, D.G. New surface-associated heat-labile colonization factor antigen (CFA/11) produced by enterotoxigenic *E. coli* of serogroups 06 and 08 / D.G. Evans, D.J. Evans // Infect. Immun. – 1978. – Vol. 21. – P. 638-647. 8. Evans, D.G. Detection and characterisation of colonization factor of enterotoxigenic *E. coli* isolated from adults with diarrhea / D.G. Evans, D.J. Evans, W.S. Tjoa // Infect. Immun. – 1978. – Vol. 19. – P. 727-736. 9. Evans, D.G. Purification and characterisation of the CFA/1 antigen of enterotoxigenic *Wscherichia coli* / D.G. Evans, D.J. Evans, S. Clegg // Infect. Immun. – 1979. – Vol. 25. – P. 738-748. 10. Gaastra, W. Hostspecific fimbrial adhesive of noninvasive enterotoxigenic *E. coli* strains / W. Gaastra, F. de Graaf // Microbiol. Rev. – 1982. – Vol. 46. – №2. – P. 129-161. 11. Isaacson, R.E. K99 surface antigen of *E. coli*: purification and partial characterization / R.E. Isaacson // Infect. Immun. – 1977. – Vol. 15/ - P. 272-279. 12. Isaacson, R.E. *Escherichia coli* 987P pili: purification and partial characterization / R.E. Isaacson, P. Richter // J. Bacteriol. – 1981. – Vol. 146. – P. 784-789.

УДК 619:615.373

ИЗГОТОВЛЕНИЕ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА СЫВОРОТКИ ПРОТИВ РОЖИ СВИНЕЙ, ПОЛУЧЕННОЙ ПО УСОВЕРШЕНСТВОВАННОЙ ТЕХНОЛОГИИ

Зайцев В.В., Дремач Г.Э.

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

Авторами статьи усовершенствована технология изготовления сыворотки против рожы свиней за счет приготовления новой питательной среды для культивирования рожистых бактерий, определения оптимального срока инактивации микроорганизмов, разработки способа очистки сыворотки от балластных веществ, изготовлена опытная партия препарата и проведен контроль его качества.

The technology for porcine erysipelas serum has been developed through the use of a new medium for cultivation, optimization of bacterium inactivation moment, a new method of purification and quality control.

Введение. Инфекционные болезни – одна из сложных проблем ветеринарной науки и практики. В борьбе с ними большое значение имеют специфические биологические препараты, которые предназначены для профилактики этих болезней и лечения больных животных.

Применение биопрепаратов, предназначенных для пассивной иммунизации, значительно улучшают эпизоотическое состояние животноводства, повышает продуктивность и сохранность поголовья, качество продуктов питания и сырья животного происхождения, играют важную роль в охране окружающей среды.

Для пассивной профилактики и лечения животных, больных инфекционными болезнями применяют гипериммунные сыворотки и выделяемые из них иммуноглобулины. Характерной особенностью сывороточ-