

раза по отношению к контролю (121,00±6,18). Достоверных отличий между группами вакцинированных свиней не наблюдалось.

Заключение. Проведенные нами исследования показали, что при иммунизации свиней против лептоспироза отечественными инактивированными вакцинами в периферических органах системы иммунитета животных развиваются выраженные морфологические изменения, проявляющиеся активной плазмоцитарной реакцией в регионарных месту введения вакцины лимфатических узлах и в селезенке уже на 7-й день после вакцинации, усилением бласттрансформации лимфоцитов в селезенке и лимфатических узлах на 14-й день после иммунизации. При этом наиболее активная плазмоцитарная реакция развивается у свиней, иммунизированных гидроокисью алюминия вакциной. Выраженные морфологические реакции сохраняются и на 21-й день после иммунизации, что свидетельствует о формировании напряженного поствакцинального иммунитета.

Литература. 1. Данишевич, Ю.С. О природных очагах лептоспироза на территории Беларуси / Ю.С. Данишевич, Ю.А. Грачев, В.П. Лучко // Зооантропонозные болезни, меры профилактики и борьбы : материалы Международной научно-практической конференции 23-24 октября 1997 года Гродно. – Минск, 1997. – С. 112-113. 2. Десятьев, В. И. Лептоспироз свиней. Этиология, эпизоотология, патогенез, клиническое проявление, патологоанатомические изменения, диагностика, лечение, профилактика, оздоровительные мероприятия / В.И. Десятьев; Ред. К.А. Дорофеев ; Северо-Кавказский зональный научно-исследовательский ветеринарный институт. – Ростов-на-Дону : Ростовское кн. изд-во, 1972. – 391 с.; ил. 3. Карпуть, И.М. Гематологический атлас сельскохозяйственных животных / И.М. Карпуть. – Минск : Ураджай, 1986. – 183 с. 4. Кирпиченок, В. А. Эпизоотология и совершенствование мер борьбы с лептоспирозом свиней и крупного рогатого скота в Республике Беларусь : автореферат дис. ... д-ра ветеринарных наук : 16.00.03 / В. А. Кирпиченок ; Белорусский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского. - Минск, 1996. - 34 с. 5. Малахов, Ю.А. Лептоспироз животных / Ю.А. Малахов, А.Н. Панин, Г.Л. Соболева. – Ярославль : ДИА-пресс, 2000. – 584 с. 6. Максимович, В.В. Эпизоотическая ситуация по лептоспирозу свиней в Республике Беларусь / В.В.Максимович, С.Л. Гайсенюк // Ученые записки УО ВГАВМ. – Витебск, 2007. – Т.43, вып.2. – С. 75-78. 7. Меркулов, Г.А. Курс патогистологической техники / Г.А. Меркулов. – Ленинград : Медицина, 1969. – 432 с. 8. Рябцева, Н.Л. Проявление лептоспирозного эпидемического процесса на современном этапе / Н.Л. Рябцева, Ю.А. Грачев, Ю.С. Данишевич // Зооантропонозные болезни, меры профилактики и борьбы : материалы Международной научно-практической конференции, 23-24 октября 1997 года, Гродно. – Минск, 1997. – С. 114-115. 9. Состояние природных очагов и особенности эпидемиологии лептоспирозов на территории города Москвы / Л.В. Родина [и др.] // Диагностика, профилактика и лечение лептоспироза людей и животных : материалы Московской Международной научно-практической конференции по лептоспирозу. – Москва, 2007. – С. 52-53. 10. Частная эпизоотология : учебное пособие для студентов вузов по специальности "Ветеринарная медицина" / В. В. Максимович [и др.] ; ред. В. В. Максимович. - Минск : ИВЦ Минфина, 2010. – 628 с.

Статья передана в печать 24.02.2012 г.

УДК 619:579.873.21

ВЛИЯНИЕ УДАЛЕНИЯ ИЗ КУЛЬТУРАЛЬНОГО ФИЛЬТРАТА *Mycobacterium bovis* ФРАКЦИИ БОЛЕЕ 300 КДА И 10 КДА НА АКТИВНОСТЬ, СПЕЦИФИЧНОСТЬ И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ

Притыченко А.Н.

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

*При ультрафильтрации культурального фильтрата *Mycobacterium bovis* необходимо использовать мембраны с пределом задержания 300 кДа и 10 кДа, что повышает качество целевого продукта.*

*The ultrafiltration of culture filtrate of *M. bovis* is carried out on the membranes with the 300 KDa and 10 KDa grit which enables a high quality end product.*

Введение. Остаётся актуальной проблема туберкулёза как в Беларуси, так и во всём мире. В нашей стране налажена система плановых противозооотических мероприятий, что обеспечивает благополучие страны по туберкулёзу [9].

Диагностика туберкулёза осуществляется преимущественно аллергическим методом с использованием туберкулина очищенного для млекопитающих производства УП «Витебская биофабрика» [6].

Для аллергической диагностики туберкулёза также применяют ППД туберкулин для млекопитающих, технология получения которого предусматривает осаждение туберкулопротеинов культуральной жидкости трихлоруксусной кислотой (ТХУ) и сульфатом аммония (СА). Это повышает специфичность и облегчает стандартизацию, но глубокой биологической очистки в процессе изготовления препарата не происходит [5, 6, 10, 11].

В мировой практике альтернативой препаратам ППД, являются туберкулины типа HC5M (heat culture syntetic medium), гретье культуральные фильтраты синтетической среды, которые по диагностическим свойствам не уступают ППД туберкулину, а технология его производства значительно проще [3, 6, 10].

Поэтому поиск путей получения туберкулинов, сочетающих высокую активность, специфичность и себестоимость, является актуальной проблемой для ветеринарной практики [2, 6].

В биотехнологии все большее применение находит ультрафильтрация, позволяющая фракционировать большие объёмы биологически активных продуктов по размеру молекул с сохранением их свойств. Следовательно, актуальным является выяснение диапазонов фракционирования, обеспечивающих получение наиболее активных и специфичных диагностикумов, а также развитие методов и средств стандартизации туберкулина, отражающих не только суммарные показатели активности и содержания белка, но и антигенный состав, а также видовую специфичность [6].

Автоклавированные культуральные фильтраты *M. bovis* обладают сопоставимой активностью и не уступают по специфичности ППД туберкулину для млекопитающих. Вместе с тем, ввиду наличия в их составе высокомолекулярных антигенов и фрагментов клеточных стенок, полисахаридов и других продуктов аутолиза целесообразно было бы разработать простой и технологичный способ их очистки [1, 6, 8].

Выделение индивидуальных антигенов обычно связано с многоступенчатым фракционированием по размеру молекул и заряду или одноэтапной очисткой методом аффинной хроматографии. В обоих случаях выход очищенных антигенов невелик. Поэтому значительный интерес представляют методы разделения макромолекул, обеспечивающие фракционирование больших объемов исходного материала. В первую очередь, это касается ультрафильтрации [2, 5, 6].

С учетом того, что при использовании ультрафильтров с пределом задержания 100, 30 и 10 кДа в полной мере не удалось получить технологичный вариант очистки автоклавированного культурального фильтрата *M. bovis*, были проведены исследования по использованию ультрафильтра с пределом задержания 300 кДа [6].

В связи с этим разработкой эффективной и экономически выгодной технологии получения туберкулина очищенного для млекопитающих и совершенствование методов его очистки и контроля является актуальной научной и практической проблемой.

Цель работы - изучение влияния удаления из культурального фильтрата *Mycobacterium bovis* фракции более 300 кДа и 10 кДа на активность, специфичность и биохимические показатели целевого продукта.

Материал и методы исследований. Культуру производственного штамма *Mycobacterium bovis* 8 выращивали 8 недель на среде Сотона при 37° С. Часть посевов инактивировали фенолом (3%), часть автоклавировали 30 мин при 121° С. Для удаления бакмассы культуральную жидкость фильтровали через бумажный фильтр и пластины "Владипор". Негретый и автоклавированный фильтрат подвергали последовательной ультрафильтрации на установке Minitan 11S с мембранами, обеспечивающими задержание молекул 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.

Содержание белка во фракциях определяли путем осаждения 20%-ным раствором трихлоруксусной кислоты и фотоколориметрией смеси при 560 нм в сравнении со стандартами, изготовленными из сухого ППД туберкулина, содержание гексоз определяли ортотолуидиновым методом.

Антигенную нагрузку фракций изучали в ракетном иммуноэлектрофорезе (РИЭФ) с бычьей референс-антисывороткой к комплексу негретых антигенов *M. bovis* Vallee (А.П. Лысенко, 1994). При проведении РИЭФ в агарозу вносили антисыворотку *M. bovis* Vallee (60 мкл/мл), 3 V/cm в течение 12 ч.

Специфическую и перекрёстную активность фракций определяли в непрямом варианте ИФА на панелях Sarstedt, сенсibilизированных исходным препаратом и фракциями (1 - 5 мкг белка на лунку). Антисыворотки к комплексу негретых антигенов *M. bovis* Vallee и к смеси антигенов НТМБ использовали в разведениях 1:100 - 1:12800. Комплекс антиген-антитело выявляли пероксидазным конъюгатом анти-IgG быка (Sigma). В качестве контроля в ИФА применяли ППД туберкулин для млекопитающих Курской биофабрики.

Аллергическую активность и специфичность фракций определяли на 12 морских свинок, сенсibilизированных вакциной БЦЖ (0,5 мг в/к), и 10 морских свинок, зараженных подкожно смесью НТМБ. Пять интактных животных служили контролем.

В качестве контроля животным вводили стандартный раствор ППД туберкулина для млекопитающих Курской биофабрики серии 29 (25 МЕ в 0,1 мл), а исследуемые фракции - в дозе, эквивалентной по белку 25 МЕ.

Для биохимической характеристики определяли содержание белка, гексоз в культуральных фильтратах серий 1-98, 2-98, 3-99 и в их фракциях, в ППД туберкулинах серий 47, 2, 29 (производства Курской биофабрики), ППД Sanofi, ППД Bioveta (7500МЕ в 0,2 мл).

Для проведения исследований использовали автоклавированный культуральный фильтрат *M. bovis* 8, который фракционировали методом ультрафильтрации на колонках с полыми волокнами, удерживающими молекулы 300 кДа и 15 кДа. Контролем служил автоклавированный культуральный фильтрат *M. bovis* 8, разделенный с помощью ультрафильтрации на Millipore Minitan II на фракции: Р100 (размер молекул более 100 кДа), Ф100 (менее 100 кДа), Р30 (более 30 кДа), Ф30 (менее 30 кДа), Р10 (более 10 кДа).

Видовую специфичность фракций исследовали в ИФА с бычьими антисыворотками к *M. bovis* и к смеси антигенов НТМБ в разведениях от 1:100 до 1:25600. В качестве конъюгата использовали кроличьи IgG к IgG крупного рогатого скота, меченные пероксидазой (Sigma). Результаты оценивали по отношению оптической плотности с разными антисыворотками в сравнении с исходной культуральной жидкостью и коммерческими образцами туберкулинов, определенной при 492 нм.

Результаты исследований. По результатам ИФА рассчитывали показатель перекрестной активности (превышение ОП с антисывороткой I-IV к ОП нормальной сыворотки) и индекс специфической активности (отношение показателя превышения ОП фракции с антисывороткой *M. bovis* к показателю ОП с антисывороткой к антигенам НТМБ).

В таблице 1 представлены результаты исследования: исходного культурального фильтрата, фракции с массой молекул более 300 кДа (Р300), фракции с массой менее 100 кДа (Ф300) и стандартного раствора ППД туберкулина серии 6 (контроль).

Таблица 1 - Специфическая активность фракций автоклавированного культурального фильтрата *M. bovis*, полученных ультрафильтрацией на колонках с полыми волокнами, удерживающими молекулы 300 кДа и 15 кДа, по результатам ИФА

Показатели	Культуральный фильтрат	Р 300	Ф300	ППД туберкулин
Индекс специфической активности	2,7	1,6*	2,6	3,4
Перекрестная Активность	6,5	9,1*	4,9	4,4

Примечание: * - различия статистически достоверны;

Как видно из таблицы 1, специфическая активность у Р300 была достоверно ниже, а перекрестная активность достоверно выше, чем у исходных и контрольного препаратов. Следовательно, основная масса перекрестно реагирующих антигенов удалялась при ультрафильтрации с ретентатом 300.

В таблицах 2 и 3 представлены результаты исследования фракций, полученных при «детальном» фракционировании культурального фильтрата.

Как видно из таблицы 2, использование фильтра с пределом задержания 100кДа не повышало серологическую специфичность фракций. Лишь применение фильтра с пределом 30кДа способствовало снижению перекрестной активности фракций.

Таблица 2 - Результаты оценки в ИФА специфической и перекрестной активности фракций автоклавированного культурального фильтрата *M. bovis*, полученных при использовании ультрафильтров с пределом задержания 100, 30 и 10 кДа

Препараты	Индекс специфической активности	Показатель перекрестной активности
ППД туберкулин	1,6	4,0
Культуральный фильтрат автоклавированный	1,3	4,2
Р100	1,3	3,1
Ф100	1,3	3,4
Р30	1,2	4,0
Ф30	1,2	2,2
Р 10	1,2	2,1

Таблица 3 - Результаты оценки специфической и перекрестной активности фракций культурального фильтрата, полученных при использовании ультрафильтров с пределом задержания 100, 30 и 10 кДа в кожной аллергической пробе

Вид микобактерий	Диаметры эритемы в мм (доза эквивалентна по белку 125 М.Е.)						
	ППД	К. фильтрат	Р100	Ф100	Р30	Ф30	Р10
<i>M. bovis</i>	10,4±0,4	9,3±1,1	8,9±0,7	7,7±0,7	6,0±0,3	8,6±1,1	6,6±0,5
НТМБ	6,4±0,4	7,1±0,5	6,8±0,5	5,7±0,5	6,4±0,5	5,2±0,4	5,2±0,5

Как видно из таблицы 3, у морских свинок, сенсibilизированных микобактериями бычьего вида, активность автоклавированного фильтрата и Р100, Ф30 достоверно не отличалась от активности ППД туберкулина. Перекрестная активность наименьшей была у Ф30, что коррелировало с данными изучения фракций в ИФА.

Таким образом, наиболее оправданным является удаление фракции с массой молекул более 300 кДа с максимальным сохранением молекул в диапазоне 300 - 10 кДа, обладающих высокой специфической активностью. Это подтверждают результаты проведения кожной аллергической пробы, показавшей сохранение у фильтрата (Ф300) высокой активности, сопоставимой с ППД, и видовой специфичности (табл. 4). Так, автоклавированный культуральный фильтрат с удаленной высокомолекулярной фракцией (Ф300) с концентрацией белка 0,66 мг/мл обладал такой же активностью и специфичностью, как стандартный раствор ППД туберкулина производства Sanofi phialaxia.

Таблица 4 - Результаты сравнения активности автоклавированного культурального фильтрата с удаленной высокомолекулярной фракцией (Ф300) и ППД туберкулина Sanofi phialaxia

Номера животных	Диаметр эритем, в мм.			
	ППД Sanofi сер. 02796/2		Ф 300	
	100 МЕ	10 МЕ	1 разв.	2 разв.
Сенсibilизированы <i>M. Bovis</i>				
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
X±m	11,00±0,845	7,35±0,704	11,25±0,977	7,62±0,800

Сенсибилизированы НТМБ				
9	6,5	-	6,0	-
10	6,5	-	6,5	-
11	7,5	-	7,0	-
12	5	-	5	-
13	5	-	5	-
X±m	6,10±0,484		5,90±0,400	

Удаление высокомолекулярной фракции (более 300 кДа) приводило к снижению в целевом продукте количества полисахаридов (табл. 5). Так, очистка автоклавированного культурального фильтрата снижала количество полисахаридов из расчета на 1 мг белка более чем в 4 раза. В результате фильтрат содержал количество полисахаридов сопоставимое с лучшими образцами ППД туберкулинов.

Таблица 5 - Общее содержание полисахаридов в препаратах туберкулинов

Препараты	Полисахариды мг/мл	Полисахариды на 1 мг белка
Автоклавированный культуральный фильтрат	3,7	7,4
ППД туберкулин сер. 29	2,4	2,8
ППД Sanofi сер. 02796/2	0,6	0,6
Ф300	1,2	1,8

Заключение. Ультрафильтрация культурального фильтрата *Mycobacterium bovis* с использованием мембран с пределом задержания 300 кДа и 10 кДа целесообразна, так как повышает качество целевого продукта.

Литература. 1. Аушрова, 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-й научно-контрольный ин-т. – М., 1991. – 21 с. 2. 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. 3. Евлевский А.А. Научные основы и практические подходы к разработке новых средств аллергической диагностики и специфической профилактики туберкулеза крупного рогатого скота. Автореф. дис. ... докт. вет. наук : 16.00.03 / Санкт-Петербургская акад. вет. мед. - Санкт-Петербург, 1997. – 40 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. 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 / Бел. НИИ экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского. – Мн., 1994. – 35 с. 6. 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. 7. 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. 8. Шаров А. Н. Аллергическая диагностика туберкулеза у животных: повышение ее эффективности // Автореф. дис. докт. вет. наук. – М., 1989. – 29 с. 9. Эпизоотическая обстановка по туберкулезу крупного рогатого скота в зарубежных странах в начале XXI века / Н.П. Овдиенко [и др.] // Ветеринарная патология. – 2004. – № 1-2. – С. 51-54. 10. Daniel, T.M. *Mycobacterial antigens: a review of their isolation, chemistry, and immunological properties* / T.M. Daniel, B.W. Janicki // *Microbiol Rev.* – 1978 – Vol.42, №1. – P. 84-113. 11. Harboe M. *Antigens of PPD, Old Tuberculin and Autoclaved M. Bovis BCG Studied by Crossed Immunoelectrophoresis.* – *Am. Rev. Resp. Dis.* Vol. 124, № 1, 1981, P. 80 – 87.

Статья передана в печать 15.02.2012 г.

УДК 619:616.98:578.831.3-07:636.2.053

ДИАГНОСТИКА ПНЕВМОЭНТЕРИТОВ МОЛОДНЯКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

Притыченко А.Н., Шашкова Ю.А., Чернецкая И.В., Притыченко А.В., Кравченко П.И.

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

Для диагностики пневмоэнтеритов молодняка крупного рогатого скота рекомендовано применение реакции иммунофлюоресценции (РИФ) в качестве дополнительного диагностического теста в ретроспективе показано использование иммуноферментного анализа (ИФА) и реакции непрямой гемагглютинации (РНГА).

The IF test is recommended for diagnosis of bovine pneumoenteritis in calves. The ELISA and HI test are supplementary tools for retrospective diagnosis.

Введение. Остаётся актуальной в Республике Беларусь проблема инфекционных болезней крупного рогатого скота. За последние годы уровень неблагополучия снизился, однако проблема респираторных и желудочно-кишечных болезней молодняка инфекционной природы приоритетна.