

2) циркуляция условно-патогенных и патогенных микроорганизмов в ослабленном организме поросят с низкой резистентностью усиливает их вирулентность и ведёт к массовому возникновению различных заболеваний, прежде всего респираторных;

3) у клинически здоровых поросят в послеоъёмный период развиваются энергодефициты и ацидотические состояния, характеризующие преморбидную стадию развития респираторных заболеваний;

4) высокий профилактический эффект оказывает антибактериальный препарат пролонгированного действия «Драксин», применение которого снижает заболеваемость поросят-отъёмышей респираторными заболеваниями и повышает их скорость роста.

Литература. 1. Медведский, В.А. Естественная резистентность свиней и пути ее повышения./ В. А. Медведский.– Витебск.: ВГАВМ, 1997. – 55 с. 2. Панин, Л. Е. Энергетические аспекты адаптации./Л. Е. Панин.- Л.: Медицина, 1978.– 190 с. 3. Пейсак, З. Болезни свиней/ З. Пейсак; пер. с польского Д. В. Потапчука. - Брест: ОАО «Брестская типография», 2008.- 424 с. 4. Санитарно-гигиеническая оценка микроклимата животноводческих помещений / В.А. Медведский [и др.]. – Минск, 2001. – 60 с. 5. Ascariasis, respiratory diseases and production indices in selected Prince Edward Island swine herds/ T. M. Bernardo [et al.]/ Can. J. Vet. Res.- 1990.- Vol. 54, № 2.- P. 267-273. 6. Choi, K. Y. Retrospective analysis of etiologic agents associated with respiratory diseases in pigs/ Y. K. Choi, S. M. Goyal, H. S. Joo// Can. Vet. J.- 2003.- Vol. 44, № 9.- P. 735-737. 7. Gastrointestinal dysfunction induced by early weaning is attenuated by delayed weaning and mast cell blockade in pigs/ A. J. Moeser [et al.]/ Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.- 2007.- Vol. 293, № 3.- P.413-421. 8. Gut function and dysfunction in young pigs: physiology/ J.- P. Lallésa [et al.]/ Anim. Res.- 2004.- Vol. 53, № 4.- P. 301-316. 9. Postweaning growth check in pigs is markedly reduced by intermittent suckling and extended lactation/ M. Berkeveld [et al.]/ J. Anim. Sci.- 2007.- Vol. 85, № 2.- P. 258-266. 10. Williams, C. H. Pigs susceptible to energy metabolism in the fulminant hyperthermia stress syndrome/ C. H. Williams, C. Houchins, M. D. Shanklin// Br. Med. J.- 1975.- Vol. 5980, № 3.- P. 411-413.

Статья поступила 18.10.2010г.

УДК 619:579.873.21

ИЗУЧЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПОВЫШЕНИЯ ВИДОВОЙ СПЕЦИФИЧНОСТИ ТУБЕРКУЛИНА ОЧИЩЕННОГО ДЛЯ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

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

Хорошун А. В.

УП «Витебская биофабрика», г. Витебск, Республика Беларусь

Показано, что культуральный фильтрат *M. bovis* 8 содержит общеродовые антигены с нетуберкулезными микобактериями. Удаление из культурального фильтрата фракции с размером молекул более 100 kDa достоверно снижает концентрацию общеродовых антигенов, что подтверждает возможность предварительной очистки исходного материала ультрафильтрацией на мембранах с пределом задержания 100 kDa с удалением ретентата. Иммуноадсорбция общеродовых антигенов автоклавированного культурального фильтрата производственного штамма *M. bovis* 8 с последующей ультрафильтрацией на мембранах с пределом задержания 100 kDa позволяет повысить видовую специфичность целевого продукта в каждой пробе до 100%. Иммуноадсорбция снижает специфическую активность целевого продукта в сравнении с исходным в пределах 25-30%, что даже без коррекции дозы обеспечивает чувствительность при выявлении больных животных не менее 60-75%.

It has been proved that M. bovis 8 generic antigens with non-tuberculosis mycobacteria. Elimination of plus 100 kDa fractions from the filtrate leads to a reduced content of the antigens giving ground to preliminary clearance on ultrafiltrate membranes with a 100 kDa grid. Absorbtion of the generic antigens from the M. bovis 8 autoclaved filtrate followed by ultrafiltration on 100 kDa – grid membranes allows a high specific target product with 100% skin sensitivity. Absorbtion also leads to a reduced activity of the target product by 25-30% allowing a 60-75% recovery of infected animals.

Введение. С введением в практику аллергической диагностики туберкулеза у крупного рогатого скота считалось, что туберкулин – строго специфичный диагностикум [1, 2, 3]. По мере ликвидации туберкулеза обозначилась проблема реагирующих на туберкулин коров, не имеющих на секции изменений, свойственных туберкулезу [2, 3]. Было установлено, что наряду с латентной туберкулезной инфекцией, причиной реакций на туберкулин могут быть нетуберкулезные микобактерии (НТМБ) [4]. С помощью референс-системы - антигенов *M. bovis* БЦЖ и перекрестного иммуноэлектрофореза установлено, что из 44 детектируемых антигенов *M. bovis* БЦЖ 25 - были общими с *M. avium*, 18 - с *M. smegmatis*, 15 - с *M. nonchromogenicum*, 12 - с *M. phlei*, 9 - с *Nocardia asteroides*, 2 - с *Corynebacterium pyogenes*. Девять антигенов *M. bovis* (№№ 20, 51, 60, 53, 71, 74, 85, 86, 89) обладали перекрестной реактивностью с антигенами большинства видов микобактерий. В целом исследования антигенного состава показали, что до 90% антигенов *M. bovis*, могут встречаться у НТМБ [6].

Изучение ППД туберкулина для млекопитающих выявило, что в процессе его получения и очистки происходит лишь количественное снижение концентрации общеродовых полисахаридных антигенов, а набор антигенов исходного культурального фильтрата сохраняется в целевом продукте [7].

Исследование видовой специфичности ППД туберкулина на крупном рогатом скоте показало, что она не превышает 30%, т.е. около 70% животных через 20-60 суток после инфицирования НТМБ могут давать реакции

на туберкулин [5]. Проблема таких парааллергических реакций на туберкулин, особенно в зонах, оздоровленных от туберкулеза, наносит значительный экономический ущерб из-за убоя фактически здоровых животных. В этой связи, предпринимались многочисленные попытки повышения видовой специфичности туберкулина и выделения видоспецифических антигенов *M. bovis* [5, 8, 9]. По данным Closs et al. [5] лишь антигены №№ 2, 3, 5, 21, 46, 63, 70, 81, 84 из спектра более чем 100 антигенов, были специфичны для *M. bovis* [5]. Вместе с тем, углубленное изучение видовой специфичности выявило, что их число ограничивается несколькими антигенами, в первую очередь MPB 70 с молекулярной массой 22-24 кДа в зависимости от степени гликозилирования. [8]. Его содержание в культуральной жидкости *M. bovis* может достигать 10%. В небольших количествах он присутствует у *M. tuberculosis* и возможно у *Nocardia asteroides* [9].

Получение видоспецифических индивидуальных антигенов для внутрикожной пробы ограничивается многоэтапной очисткой и возможностью получения лишь незначительных количеств диагностикума. Поэтому, актуальной задачей стала разработка масштабных методов повышения специфичности туберкулинов. Было установлено, что основная масса перекрестно реагирующих антигенов *M. bovis* имеет молекулярную массу более 100 кДа [5]. С возникновением мембранной ультрафильтрации появилась возможность масштабного фракционирования исходного культурального фильтрата *M. bovis* для повышения специфичности туберкулина [3]. Однако получаемый целевой продукт не обладал строгой видовой специфичностью [3]. В значительной степени решить проблему повышения препаратов для диагностики туберкулеза могут методы биоспецифической очистки [5]. Однако при их использовании возникает необходимость удаления избытка антител. Поэтому, представляет интерес сочетание биоспецифической очистки и ультрафильтрации, позволяющей одновременно удалять часть общеродовых антигенов, их комплексы с антителами и избыток антител.

Цель работы – оценка эффективности сочетания ультрафильтрации и биоспецифической очистки для получения аллергена с высокой видовой специфичностью, пригодного для массовой диагностики туберкулеза и дифференциации туберкулиновых реакций у крупного рогатого скота.

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

В работе использован автоклавированный культуральный фильтрат производственного штамма *Mycobacterium bovis* 8 с концентрацией туберкулопротеинов 0,57 мг/мл, являющийся исходным продуктом для получения туберкулина очищенного для млекопитающих УП «Витебская биофабрика».

Туберкулопротеины из автоклавированного культурального фильтрата производственного штамма *Mycobacterium bovis* 8 осаждали внесением трихлоруксусной кислоты (ТХУ) в конечной концентрации 7%.

Ультрафильтрацию проводили на ячейках Centrifugal Filter Devices Amicon Ultra 100 K и 5K. Содержание туберкулопротеинов определяли осаждением ТХУ с последующим определением ОП смеси при 540 нм.

Концентрацию общеродовых антигенов определяли в непрямом ИФА с кроличьими и бычьими антисыворотками к антигенам *M. bovis* и к смеси НТМБ. Препараты в эквивалентных дозах сорбировали на иммунологических панелях Sarstedt. Реакцию ставили по общепринятой схеме с применением конъюгатов пероксидазы с козьими IgG к IgG кроликов и кроличьими IgG к IgG быка и субстратной смеси ТМБ (Sigma). Результаты ИФА сопоставляли только те, которые были получены при постановке реакции в одинаковых условиях на одной и то же панели.

Активность и специфичность полученных препаратов исследовали во внутрикожной пробе на 5 волах, зараженных *M. bovis* BCG и смесью НТМБ. Контролями служили туберкулин очищенный для млекопитающих УП «Витебская биофабрика» (ТО) контрольной серии 66 в дозе 10000 МЕ/0,2 мл и автоклавированный культуральный фильтрат производственного штамма *M. bovis* 8 (КФ) с концентрацией белка 0,57 мг/мл - 0,2 мл (КФ).

Результаты исследований. 1 литр производственной серии автоклавированного культурального фильтрата штамма *M. bovis* 8 осаждали ТХУ (7%). Осадок растворили в 100 мл дистиллированной воды и стабилизировали фосфатным буферным раствором pH 7,0. Полученный раствор туберкулопротеинов «ППД ТХУ» фракционировали на ультрафильтрационных ячейках Centrifugal Filter Devices Amicon Ultra 100 K, оставляя объем ретентата, в пределах 10% исходного объема. В результате были получены: фракция «ППД фильтрат ≤ 100 кДа» и «ППД ретентат > 100 кДа». Концентрация общеродовых антигенов, в полученных фракциях, изучена в непрямом ИФА с кроличьими и бычьими антисыворотками к антигенам *M. bovis* и к смеси НТМБ в сравнении с ТО и КФ.

В таблице 1 приведены результаты сравнения в ИФА специфической активности и видовой специфичности культурального фильтрата, «ППД ТХУ» и «ППД фильтрата ≤ 100 кДа» с кроличьими антисыворотками. Как видно из таблицы 1 культуральная жидкость *M. bovis* реагировала с разведением антисыворотки *M. bovis* - 1:6400, «ППД ТХУ» - 1:3200, ППД фильтрат ≤ 100 кДа - 1:1600 (положительные реакции выделены жирным шрифтом). Вместе с тем, «ППД фильтрат ≤ 100 кДа» не реагировал с антисывороткой к НТМБ, в то время как неочищенные препараты давали реакции с разведением антисыворотки к НТМБ – 1:100. Таким образом, осаждение туберкулопротеинов ТХУ снижала их активность «ППД ТХУ», но существенно не повышало их специфичность. В то же время, удаление из «ППД ТХУ» высокомолекулярной фракции резко увеличивало видовую специфичность, поэтому «ППД фильтрата ≤ 100 кДа» вообще не реагировал с антисывороткой к НТМБ.

В таблице 2 приведены результаты сравнения активности и видовой специфичности в ИФА культурального фильтрата, «ППД ретентата > 100 кДа» и «ППД фильтрата ≤ 100 кДа» с кроличьими антисыворотками. Как видно из таблицы 2 культуральная жидкость *M. bovis* реагировала с разведением антисыворотки *M. bovis* - 1:6400, «ППД ретентат» - 1:6400, «ППД фильтрат ≤ 100 кДа» - 1:1600 (положительные реакции выделены жирным шрифтом). При этом, если с антисывороткой к НТМБ «ППД фильтрат ≤ 100 кДа», также как и в первом опыте (табл.1) не реагировал, то «ППД ретентат» давал выраженные перекрестные реакции до разведения 1:400.

Таблица 1 - Специфическая активность и видовая специфичность в ИФА культурального фильтрата, ППД ТХУ и ППД фильтрата ≤100 kDa с кроличьими антисыворотками

Разведение антисывороток 1:	Оптическая плотность при 450 нм								
	Культуральный фильтрат			«ППД ТХУ»			ППД фильтрат ≤100 kDa		
	Норм. с-ка	a/c M.bovis	a/c НТНБ	Норм. с-ка	a/c M.bovis	a/c НТНБ	Норм. с-ка	a/c M.bovis	a/c НТНБ
50	0,113	0,788^x	0,369	0,137	0,966	0,321	0,076	0,526	0,078
100	0,143	1,031	0,182	0,142	0,866	0,197	0,087	0,708	0,088
200	0,095	1,164	0,134	0,117	1,226	0,125	0,076	0,457	0,081
400	0,085	0,817	0,101	0,114	0,924	0,092	0,073	0,193	0,073
800	0,067	0,451	0,094	0,099	0,579	0,080	0,075	0,135	0,071
1600	0,078	0,337	0,083	0,101	0,364	0,084	0,069	0,116	0,071
3200	0,067	0,196	0,077	0,092	0,223	0,073	0,069	0,087	0,068
6400	0,072	0,166	0,081	0,096	0,160	0,073	0,072	0,072	0,072

^x - жирным шрифтом выделены значения положительных реакций

В таблице 3 приведены результаты сравнения активности и видовой специфичности в ИФА указанных выше препаратов, но с бычьими антисыворотками, причем антисывороткой к НТМБ, имевшей значительно более высокий титр, чем соответствующая кроличья. Полученные результаты подтвердили, что действительно основная масса перекрестно реагирующих антигенов была сосредоточена в высокомолекулярной фракции. Вместе с тем, перекрестно реагирующие компоненты были обнаружены и в «ППД фильтрате ≤100 kDa», что указывало на необходимость его дальнейшей очистки. С этой целью провели опыт, в котором автоклавированный культуральный фильтрат производственного штамма *Mycobacterium bovis* 8 с концентрацией туберкулопротеинов 0,57 мг/мл подвергли иммунопреципитации антителами к общеродовым антигенам. Проведена очистка 2 серий фильтрата (соотношения компонентов 2:1 и 1:2) с последующей ультрафильтрацией на Centrifugal Filter Devices Amicon Ultra 100 K и концентрированием на ячейке 5 K до исходного объема (целевой продукт - очищенный специфический аллерген).

Для испытания полученных серий аллергена 5 волам, зараженным *M. bovis* BCG и смесью НТМБ, внутривожно вводили:

- туберкулин очищенный УП «Витебская биофабрика» (ТО) контрольной серии 66 в дозе 10000МЕ/0,2 мл (ТО);
- очищенный специфический аллерген экспериментальной серии 1:2 – 0,2 мл;
- автоклавированный культуральный фильтрат производственного штамма *M. bovis* 8 (КФ) с концентрацией белка 0,57 мг/мл, 0,2 мл (КФ);
- очищенный специфический аллерген экспериментальной серии 2:1 – 0,2 мл;

Реакцию учитывали через 72 часа путем измерения кожной складки.

Таблица 2 - Результаты сравнения специфической активности и видовой специфичности в ИФА культурального фильтрата, «ППД ретентата >100 kDa» и «ППД фильтрата ≤100 kDa»

Разведение антисывороток 1:	Оптическая плотность при 450 нм								
	Культуральный фильтрат			ППД ретентат >100 kDa			ППД фильтрат ≤100 kDa		
	Норм. с-ка	a/c M.bovis	a/c НТНБ	Норм. с-ка	a/c M.bovis	a/c НТНБ	Норм. с-ка	a/c M.bovis	a/c НТНБ
50	0,185	1,049^x	0,380	0,312	1,077	0,610	0,094	0,149	0,080
100	0,131	1,196	0,300	0,164	1,364	0,454	0,088	0,617	0,089
200	0,106	1,146	0,116	0,122	1,276	0,300	0,085	0,368	0,081
400	0,086	0,791	0,086	0,105	0,818	0,206	0,079	0,191	0,073
800	0,083	0,452	0,080	0,090	0,399	0,093	0,076	0,133	0,074
1600	0,086	0,334	0,078	0,083	0,269	0,081	0,074	0,130	0,072
3200	0,073	0,187	0,076	0,081	0,154	0,073	0,073	0,099	0,071
6400	0,071	0,141	0,074	0,077	0,119	0,073	0,083	0,090	0,074

^x - жирным шрифтом выделены значения положительных реакций

Таблица 3 - Результаты сравнения специфической активности и видовой специфичности в ИФА культурального фильтрата, ППД ретентата >100 kDa и ППД фильтрата ≤100 kDa с бычьими антисыворотками

Разведения	Оптическая плотность при 450 нм								
	Культуральный фильтрат			ППД ретентат >100 kDa			ППД фильтрат ≤100 kDa		
	Норм. с-ка	a/c НТНБ	a/c M.bovis	Норм. с-ка	a/c НТНБ	a/c M.bovis	Норм. с-ка	a/c НТНБ	a/c M.bovis
50	0,261	0,906	1,515	0,280	0,729	1,149	0,085	0,168	0,469
100	0,169	0,617	1,363	0,189	0,532	1,331	0,072	0,192	0,326
200	0,133	0,525	1,186	0,138	0,445	1,191	0,078	0,171	0,286

Продолжение таблицы 3

400	0,100	0,309	0,883	0,105	0,295	0,931	0,062	0,133	0,512
800	0,085	0,306	0,538	0,102	0,215	0,568	0,092	0,090	0,118
1600	0,076	0,152	0,339	0,077	0,130	0,339	0,071	0,071	0,106
3200	0,076	0,115	0,218	0,072	0,091	0,256	0,060	0,075	0,095
6400	0,069	0,083	0,142	0,072	0,078	0,165	0,062	0,069	0,077

^x - жирным шрифтом выделены значения положительных реакций

Результаты исследований представлены в таблице 4. Как видно из таблицы 4 из трех особей, зараженных *M. bovis* BCG на ТО контрольной серии, реагировало - 3, на культуральный фильтрат - 2, на очищенный специфический аллерген серии 2:1 - 2 положительно, 1 сомнительно, серии 1:2 - 2 положительно. Таким образом, очищенные специфические аллергены выявляли 75-100% животных, инфицированных микобактериями туберкулеза, и обладали специфической активностью около 75% от активности ТО контрольной серии.

Таблица 4 - Результаты испытания 2-х серий очищенного специфического аллергена в кожной пробе на крупном рогатом скоте, инфицированном микобактериями

вола	№№	Утолщения кожных складок до и через 72 ч после введения			
		ТО сер. 66	ОСА серии 2:1	КФ	ОСА серии 1:2
		Сенсибилизированы смесью нетуберкулезных микобактерий			
	44	8-11=3	8-9=1	8-10=2	9-9=0
	14	10-10=0	10-10=0	10-12=2	10-10=0
	M ± m	1,5	0,5	2	0
		Сенсибилизированы <i>M.bovis</i> BCG			
	12	9-16=7	10-13=3	8-15=7	11-13=2
	25	9-18=9	10-19=9	13-22=9	11-14=3
	45	9-12=3	9-11=2	8-9=1	8-9=1
	M ± m	6,3	4,7	5,6	2,0

Все животные, инфицированные НТМБ, на введение обеих серий очищенного специфического аллергена не реагировали (видовая специфичность 100%). На ТО контрольной серии реагировало 1 животное (видовая специфичность 50%). На исходный культуральный фильтрат оба животных, инфицированных НТМБ, давали сомнительные реакции (видовая специфичность 50%). Таким образом, сочетание биоспецифической очистки и ультрафильтрации позволили получить строго специфичный диагностикум.

Заключение. По результатам исследования можно сделать следующие выводы:

1. Культуральный фильтрат *M. bovis* 8 содержит общеродовые антигены с нетуберкулезными микобактериями. Удаление из культурального фильтрата фракции с размером молекул более 100 kDa достоверно снижает концентрацию общеродовых антигенов, что указывает на возможность предварительной очистки исходного материала ультрафильтрацией на мембранах с пределом задержания 100 kDa с удалением ретентата.

2. Иммуноадсорбция общеродовых антигенов автоклавированного культурального фильтрата производственного штамма *M. bovis* 8 с последующей ультрафильтрацией на мембранах с пределом задержания 100 kDa позволяет повысить видовую специфичность целевого продукта в кожной пробе до 100%.

3. Иммуноадсорбция снижает специфическую активность целевого продукта в сравнении, с исходным в пределах 25-30%, что даже без коррекции дозы обеспечивает чувствительность при выявлении больных животных не менее 60-75%.

Литература. 1. Юсковец, М.К. Туберкулез сельскохозяйственных животных и птиц / М.К. Юсковец. – Мн. : Ураджай, 1963. - 448 с. 2. Туберкулез животных и меры борьбы с ним / Ю.Я. Кассич [и др.] - Киев : Урожай, 1990. – 304с. 3. 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. 4. Griffith, A. The serological classification of mammalian and avian tubercule bacilli / A. Griffith // Tubercule. – 1925. – Vol. 6. – P. 417-423. 5. 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. 6. 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. Вышесского. – Минск, 1994. - 34 с. 7. Лысенко, А.П. Антигенный состав ППД туберкулина для млекопитающих / А.П.Лысенко // Ветеринария. - 1989. - №5. - С. 30-32. 8. Harboe, M. MPB 70, a unique antigen of *M.bovis* BCG / M. Harboe, S. Nagai // Am.Rev.Resp.Dis. - 1994. – Vol. 129. – P. 444-452. 9. Soluble - *Mycobacterium bovis* protein antigens: studies on their purification and immunological evaluation / J. Fifis [et al.] // Microbiol. – 1994. – № 40. – P. 65-81.

Статья поступила 30.10.2010г.