

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].

Для обеспечения противотуберкулёзных мероприятий в настоящее время используется аллергическая проба с туберкулином очищенным для млекопитающих производства Витебской биофабрики [4, 5].

Основной проблемой туберкулинодиагностики считаются неспецифические (парааллергические) реакции, т.е. реакции, возникающие у животных без туберкулезных изменений и часто с отрицательными результатами бактериологического анализа. Еще в 30-е годы прошлого века такие реакции начали связывать с инфицированием животных НТМБ, имеющим общие антигены с МБТ [7]. Однако, ранее использовавшийся ГОСТ 16739-88 оценки качества ППД туберкулина даже не предусматривал параметра видовой специфичности. Этот параметр рекомендован МЭБ и выражается уровнем активности аллергена в гетерологичной системе, который не должен превышать 10 % от уровня активности равной дозы гомологичного (по отношению к сенсibilизирующему агенту) туберкулина [10, 14].

В рамках традиционных технологий решить проблему существенного повышения специфичности туберкулинов не удастся, поэтому с середины 20 века были начаты исследования по выделению видоспецифичных антигенов МБТ [4, 8, 12, 13]. Несмотря на значительный прогресс в этом направлении, ни один из очищенных физико-химическими методами препаратов антигенов МБТ не был внедрен в практику диагностики туберкулеза крупного рогатого скота. Это касается и индивидуальных рекомбинантных антигенов и их коктейлей [1, 3, 4].

Вместе с тем, с точки зрения создания новых технологий получения более специфичных туберкулинов, интерес представляют исследования по групповому фракционированию антигенов МБТ. Впервые, R. Moulton, T. Ditz, S. Marcus (1972) при фракционировании PPD-S на сефадексе G-200 установили, что основная часть туберкулиноактивных веществ, дающих перекрёстные реакции у морских свинок, сенсibilизированных *M. kansasii*, элюируются в I пике с массой молекул более 200 кDa [9]. Если для фракционирования использовали сефадекс G-150, специфичность высокомолекулярного пика была несколько выше за счет присутствия в нем молекул меньшего размера [3, 12]. Таким образом, удалением высокомолекулярной фракции удавалось достоверно повысить специфичность целевого продукта, хотя получить строго специфичный препарат было проблематично, даже при использовании дополнительных этапов и методов очистки [4, 5].

Масштабное использование гель-фильтрации в технологии получения туберкулина оказалось не возможным из-за малого объема очищаемого материала и длительности процесса. Только развитие техники ультрафильтрации, позволяющей разделять большие объемы биологических жидкостей, сделало перспективным процесс фракционирования по размерам молекул технологичным приемом [5].

Адсорбция протоплазматического экстракта *M. tuberculosis* антителами к *M. kansasii* на 55% снижает его туберкулиновую активность. При этом он теряет способность вызывать аллергическую реакцию у морских свинок, сенсibilизированных *M. kansasii* [4]. А.П. Лысенко (1994), при использовании этого принцип, получила высокоспецифичный аллерген для крупного рогатого скота с видовой специфичностью 95-98% [4, 5]. Однако отсутствие технологичных методов разделения макромолекул, не позволило организовать массовое производство препарата.

Таким образом, перспективным направлением является изучение специфической активности ППД туберкулина и автоклавированного культурального фильтрата *Mycobacterium bovis* в ИФА и в кожной аллергической пробе на морских свинках

Цель исследований - изучение специфической активности ППД туберкулина и автоклавированного культурального фильтрата *Mycobacterium bovis* в ИФА и в кожной аллергической пробе на морских свинках, что позволит повысить видоспецифичность туберкулина очищенного для млекопитающих на ГП "Витебская биофабрика".

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».

Использовали штаммы *M. bovis* № 8, *M. bovis* Vallee, полученные в 1971г. из ВГНКИ депонированные в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», штамм *M. bovis* БЦЖ-1 246 пассажа Государственного научно-контрольного института им. Тарасевича (Москва), а также штаммы *M. bovis* БЦЖ и *M. bovis* СП₂. Штаммы выращивали на среде Гельберга, для получения первичных посевных серий использовали рассев единичной типичной колонии с последующим пересевом на среды Павловского и Сотона, после чего изучали их биологические свойства.

Специфическую активность ППД туберкулина и автоклавированного фильтрата *M. bovis* 8 изучили в непрямом ИФА с бычьими антисыворотками к *M. bovis* и к смеси антигенов НТМБ, а также в кожной аллергической пробе на 96 морских свинок.

Для ИФА иммунологические панели сенсibilизировали ППД туберкулином и автоклавированными культуральными фильтратами *M. bovis* 8 в концентрации 10 мкг/мл по белку на лунку.

Каждый препарат одновременно исследовали с бычьими нормальной отрицательной сывороткой, антисыворотками к *M. bovis* и к смеси антигенов НТМБ в разведении 1:100-1:12800.

Учитывая, что интерес представляло сравнение видовой специфичности для каждого препарата, рассчитывали индекс специфической активности (ИСА) по формуле: ОП аг с а.с. *M. bovis* : ОП аг с норм. сыв., ОП аг с а.с. НТМБ : ОП аг с норм. сыв.

В автоклавированных культуральных фильтратах определяли содержание белка и делали разведения так, чтобы они были эквивалентны по белку ППД туберкулину в разведениях 125 МЕ, 100 МЕ, 25 МЕ, 10 МЕ и 5 МЕ в 0,1 мл.

Препараты вводили внутрикожно, реакцию учитывали путём измерения диаметра папул через 24 ч.

Результаты исследований. Результаты исследований представлены в таблице 1. Установлено, что ИСА у ППД туберкулина был несколько выше (1,76), чем у культуральных фильтратов (1,4-1,6). То

есть, как это было установлено и другими методами, автоклавированные культуральные фильтраты содержали больше перекрестно реагирующих антигенов (примерно, на 11- 22%).

В кожной пробе на морских свинках, сенсibilизированных *M. bovis* и смесью культур *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. fortuitum* сравнили активность и видовую специфичность ППД туберкулина и трёх серий автоклавированного фильтрата *M. bovis* 8 (1-96, 2-96, 1-98).

Таблица 61.

Индекс специфической активности ППД туберкулина и автоклавированных фильтратов *M. bovis* 8 в ИФА с антисыворотками к *M. bovis* и к смеси антигенов НТМБ

Разведение антисывороток к <i>M. bovis</i> и к НТМБ	ППД туберкулин	Автоклавированный культуральный фильтрат <i>M. bovis</i> 8 серии 1-96	Автоклавированный культуральный фильтрат <i>M. bovis</i> 8 серии 2-96	Автоклавированный культуральный фильтрат <i>M. bovis</i> 8 серии 1-98
1:100	1.1	1.1	1.1	1.1
1:200	1.3	1.1	1.2	1.3
1:400	1.4	1.2	1.2	1.3
1:800	1.7	1.3	1.4	1.5
1:1600	1.4	2.0	1.9	2.1
1:3200	2.4	1.5	1.7	1.8
1:6400	2.5	1.5	1.7	1.8
1:12800	2.3	1.7	1.8	1.8
M=	1.76	1.4	1.5	1.6

Результаты определения активности суммированы в таблицах 62 - 64 и на рис. 1 - 3. Установлено, что аллергическая активность автоклавированного культурального фильтрата серии 1-96 *M. bovis* 8 (табл. 2) была несколько ниже, чем у ППД туберкулина.

Таблица 62

Активность ППД туберкулина и автоклавированного культурального фильтрата серии 1-96 *M. bovis* 8 у морских свинок, сенсibilизированных *M. bovis* BCG

Количество м. свинок	Диаметр папул, в мм					
	ППД туберкулин			Культуральный фильтрат с. 1-96		
	125 ME	25 ME	5 ME	1 разв.	2 разв.	3 разв.
n=8	11,8	8,5	7,5	11,3	8,8	6,5

На рис.1 показана зависимость диаметра эритемы от логарифма дозы препаратов. Расстояние между линиями активности сравниваемых препаратов составило 0,11 логарифма. Следовательно, их активность различалась на $\text{antilog } 0,11 = 1,29$, что означает, что она была на 29% ниже у культурального фильтрата.

Аллергическая активность автоклавированного культурального фильтрата *M. bovis* 8 серии 2-96 была также несколько ниже, чем у ППД туберкулина (табл. 3). Как видно на рис. 2, расстояние между линиями активности сравниваемых препаратов составило 0,1 логарифма. Следовательно, их активность различалась на $\text{antilog } 0,1 = 1,26$ или на 26% она была ниже, у культурального фильтрата.

При сравнении активности автоклавированного культурального фильтрата серии 1-98 и ППД туберкулина (табл. 5), линии активности (рис.3), практически, сливались. Следовательно, активность сравниваемых препаратов была одинаковой.

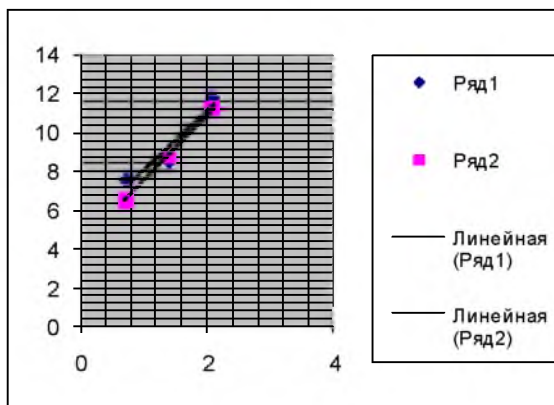


Рис.39. Зависимость диаметра папулы от логарифма дозы при введении морским свинкам, сенсibilизированным *M. bovis* BCG, ППД туберкулина (верхняя линия) и культурального фильтрата *M. bovis* серии 1-96. По оси абсцисс логарифмы дозы. По оси ординат – диаметры папул.

Таблица 63.

Активность ППД туберкулина и автоклавированного культурального фильтрата M. bovis 8 серии 2-96 у морских свинок, сенсibilизированных M. Bovis.

Количество м. свинок	Диаметр папул, в мм					
	ППД туберкулин			Культуральный фильтрат серии 2-96		
	125 МЕ	25 МЕ	5 МЕ	1 разв.	2 разв.	3 разв.
n=8	13,1	9,4	5,8	11,6	8,4	6,4

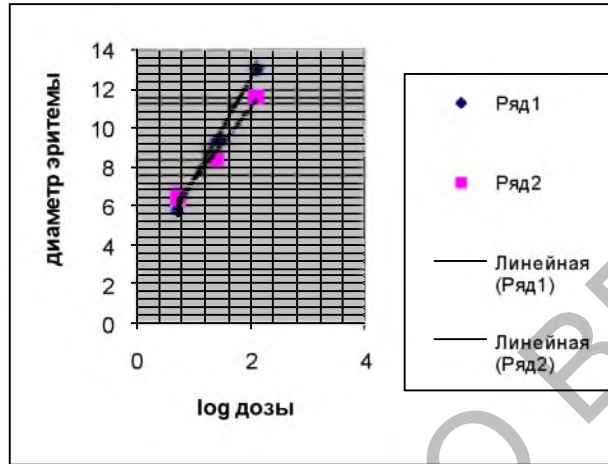


Рис.40. Зависимость диаметра папулы от логарифма дозы при введении морским свинкам, сенсibilизированным M. bovis BCG ППД туберкулина и культурального фильтрата M. bovis серии 2-96. По оси абсцисс логарифмы дозы. По оси ординат – диаметры папул.

Таблица 64.

Активность ППД туберкулина и автоклавированного культурального фильтрата серии 1-98 у морских свинок, сенсibilизированных M. bovis BCG.

Количество морских свинок	Диаметр эритем, в мм			
	ППД туберкулин		Культуральный фильтрат серия 1-98	
	125 МЕ	25 МЕ	1 разв.	2 разв.
n=8	15	9,5	14,9	9,5

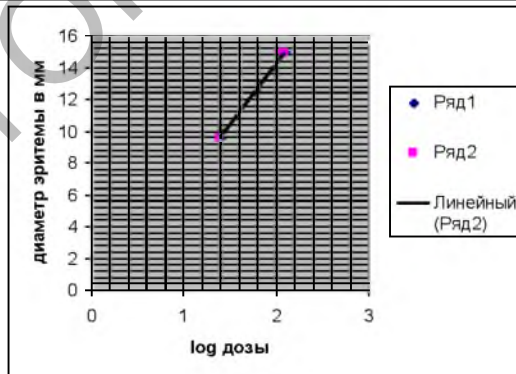


Рис.41. Зависимость диаметра папулы от логарифма дозы при введении морским свинкам, сенсibilизированным M. bovis BCG ППД туберкулина и культурального фильтрата M. bovis серии 1-98. По оси абсцисс логарифмы дозы. По оси ординат – диаметры папул.

Как видно из представленных выше данных, эквивалентные по содержанию белка растворы культуральных фильтратов, вызывали у морских свинок, сенсibilизированных M. bovis, близкие по интенсивности реакции с ППД туберкулином. То есть, химическая очистка существенно не повышала аллергическую активность туберкулопротеинов.

Результаты изучения видовой специфичности автоклавированных культуральных фильтратов в сравнении с ППД туберкулином, представлены в таблице 5. Как видно из таблицы, культуральные фильтраты вызывали у животных, инфицированных M. bovis реакции, сопоставимые по интенсивности с ППД туберкулином и менее интенсивные перекрестные реакции у морских свинок, инфицированных НТМБ, хотя различия были не достоверными (P больше 5%).

Таким образом, исследования показали, что, несмотря на то, что в неочищенных автоклавированных культуральных фильтратах M. bovis 8 по данным ИФА содержится больше общеродовых антигенов (примерно, на 11-22%), их перекрестная активность в кожной аллергической пробе достоверно не отличалась от ППД туберкулина. Вероятно, это связано с тем, что в ИФА

перекрестные реакции проявляются за счет участия полисахаридных компонентов, которых в ППД туберкулине меньше.

Таблица 65.

Аллергические реакции у морских свинок, зараженных *M. bovis* и НТМБ на эквивалентные по белку дозы автоклавированных культуральных фильтратов *M. bovis* 8 и ППД туберкулина

Сравниваемые аллергены	Средние диаметры папул (мм)		
	<i>M. bovis</i>	НТМБ.	Контроль
ППД туберкулин серии 15 (125 МЕ) Культуральный фильтрат с. 1-96	11,8 ± 0,92 11,3 ± 0,75	7,4 ± 0,64 6,6 ± 1,52	менее 5 мм менее 5 мм
ППД туберкулин серии 15 (125 МЕ) Культуральный фильтрат с. 2-96 ^x	10,0 ± 0,83 7,0 ± 0,72	4,8 ± 0,39 3,4 ± 0,2	менее 5 мм менее 5 мм
ППД туберкулин серии 15 (125 МЕ) Культуральный фильтрат с. 2-96 ^{xx}	13,2 ± 0,93 15,3 ± 0,83	7,1 ± 0,7 6,1 ± 0,64	менее 5 мм менее 5 мм
ППД туберкулин серии 29 (125 МЕ) Культуральный фильтрат с. 1-98	14,3 ± 1,2 14,3 ± 0,63	7,2 ± 0,75 5,3 ± 0,54	менее 5 мм менее 5 мм

^x - через 25 дней после заражения;

^{xx} - через 50 дней после заражения

Заключение. Автоклавированные культуральные фильтраты *M. bovis* 8 содержат на 11 - 22% больше перекрестно реагирующих компонентов, чем ППД туберкулин, их перекрестная активность в кожной аллергической пробе не отличается от ППД туберкулина. Наиболее перспективным является повышение специфичности туберкулина за счет группового фракционирования и удаления высокомолекулярной фракции, а также биоспецифический метод удаления общеродовых антигенов. Специфическая активность ППД туберкулина и автоклавированного культурального фильтрата *Mycobacterium bovis* в ИФА и в кожной аллергической пробе на морских свинках не отличаются между собой.

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 ; ВАСХНИЛ. – Москва, 1990. – 27 с. 2. Болезни сельскохозяйственных животных / Науч.ред. П.А. Красочко [и др.]. – Мн.: Бизнесофсет, 2005. – 800 с. 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. 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. 5. 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. 6. Сравнительное испытание отечественных и зарубежных туберкулинов для млекопитающих / Н.П. Овдиенко, [и др.] // Ветеринария. – 1989. – № 10. – С. 21 – 24. 7. Юсковец, М.К. Туберкулез сельскохозяйственных животных и птиц / М.К. Юсковец. – Минск : Ураджай, 1963. – 448 с. 8. Isolation and partial characterisation of major protein antigens in the culture fluid of *M. tuberculosis* / S. Nagai [et al.] // J.Clin.Microbiol. – 1991. – 59.1 – P. 372-382. 9. Isolation of specific and nonspecific components from purified proteins derivative / R. Moulton [et al.] // Am. Rev. Resp. Dis. – 1972. – B. 106. – P. 213-216. 10. Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals, 5th edition, 2004. 11. MRB 59, a widely cross-reactive protein of *Mycobacterium bovis* BCG / H. Wiker // Intern. Archives of Allergy and Applied Immunology. – 1986. – Vol 81. – P. 307-314. 12. Soluble *M. bovis* protein antigens: studies on their purification and immunological evaluation / T. Fiffis [et al.] // Vet. Microbiol. – 1994. – Vol.40 (1-2). – P. – 65-81. 13. The antigens of *Mycobacterium bovis*, strain BCG, studies crossed immunoelectrophoresis a Referens System / O. Closs [et al.] // Scand. J. Immunol. – 1980. – Vol. 12. – P. 249-263. 14. 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.

Статья передана в печать 12.09.2012 г.

УДК619:616-091:636.2.053

**ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА БОЛЕЗНЕЙ ТЕЛЯТ
ПРИ АССОЦИАТИВНОМ ТЕЧЕНИИ**

Прудников В.С., Казючиц М.В., Прудников А.В.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»

г. Витебск, Республика Беларусь, 210026

При интенсивном ведении животноводства на промышленной основе на ограниченной территории содержится большое количество поголовья, что способствует быстрому распространению заразных болезней. В последние годы в инфекционной патологии все большую роль играют ассоциированные вирусные инфекции, нередко с наложением условно-патогенных болезней бактериальной этиологии. Патоморфологическая диагностика позволяет своевременно поставить диагноз и разработать лечебно-профилактические мероприятия.