

500 млн/см³. Приготовленный антиген использовали для иммунизации волов-продуцентов в течение 10 дней при условии хранения при температуре (6±2)°С.

Гипериммунизация волов-продуцентов. Рожистый антиген волам-продуцентам вводят подкожно в область шеи, а при гипериммунизации при больших дозировках антиген вводят внутримышечно в разные места верхней части туловища, но не ближе заднего края лопатки. Повышение доз антигена, так же как в интервал между инъекциями, может колебаться в зависимости от общей и местной реакции у животных в течение от 4 до 5 дней. Каждую последующую инъекцию антигена проводят после снижения температуры у животного-донора до нормальной.

Гипериммунизация волов-продуцентов живой массы до 500 кг проводят возрастающими дозами антигена, начиная с 10 см³ и заканчивая к 10-ой инъекции 250 см³ с интервалом 4–5 дней [14]. В случае получения недостаточной активности сыворотки, полученной после десяти инъекций, дополнительно проводят 2 инъекции по 300 см³ антигена. Животных, давших активную сыворотку после 10 или 12 инъекций, допускают к эксплуатации. Контроль опытных образцов гипериммунной сыворотки, приведенный по существующей методике, показал ее пригодность в ветеринарии при лечении рожистых заболеваний у свиней.

Заключение

Таким образом, проведенные исследования позволяют заключить, что при использовании волов в качестве продуцентов, возможно получить высокоактивную противорожистую сыворотку.

Анализ полученных результатов позволил предложить схему гипериммунизации, которая в отличие от существующей более проста в использовании и менее трудоемка:

- 1) Сокращено количество инъекций с 25 до 10–12;
- 2) Сокращена длительность цикла гипериммунизации на 40–50 дней;
- 3) Антиген вводится в малых объемах, 20 мл вместо 400–500 мл;
- 4) Исключены внутривенные инъекции антигена, которые нередко являются причиной аллергических реакций у продуцентов.

Предложенная схема апробирована в производственных условиях на Армавирской биофабрике.

Список литературы

1. Активность сыворотки волов, гипериммунизированных комплексными антигенами эшерихий // Тр. ВГНКИ - М. 1987. - Т. 27-с. 74-80.

2. Шабейкин, А.А. Эпизоотологические геоинформационные системы. Возможности и перспективы // Ветеринария. - 2016. - №7. - С. 21-24.

3. Кадыров С.О. Технология получения моноспецифических антисывороток к иммуноглобулинам животных. // Труды Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко. 1988. Т. 66. С. 41-46.

4. Лощинин М.Н. Вакцина против сальмонеллеза свиней, способ изготовления, способ профилактики сальмонеллеза свиней. // патент на изобретение RUS 2470663 19.09.2011

5. Медведев А.П. Противобактериальные лечебно-профилактические сыворотки. - Витебск: УО ВГАВМ, 2007. - 295с.

6. Панин А.Н., Душук Р.В., Состояние и перспективы профилактики рожистой инфекции: Состояние проблемы и перспективы развития ветеринарных наук в России. - М. 1999, Т. 1.

7. Рубан Е.А. Промышленная технология производства противобактериальных препаратов /Е.А.Рубан, Н.В. Мельник, Е.А. Непоклонов и др.: под ред. А.Я. Самуйленко. - М.: ИКЦ "Академкнига", 2006 - 267с.

8. Русанов В.М., Левин И.В. Лечебные препараты крови. - М.: ИД "Медпрактика", - 2004. - 284с.

9. Самуйленко А.Я., Рубан Е.А. Основы биотехнологии производства биологических препаратов. - 2000. - 376с.

10. Телишевская Л.Я. Белковые гидролизаты. Получение, состав, применение. - М.: 2000. - 295с.

11. Третьякова И.В. Оценка иммуномодулирующей активности вакцин против рожи свиней (ВР-2) в процессе иммуногенеза // Тр. ВИЭВ. - 2003. - Т. 73. - С. 200-204.

12. Федоров Ю.Н., Лихотина Н.А. Иммуитет у подсвинок после введения иммунной сыворотки против рожи: Сб. науч. Тр. ВИЭВ. - 1977. Т. 45. - С. 78-81.

13. Школьников Е.Э., Коломина П.Ф. и др. Антиген для иммунизации животных-продуцентов при производстве сыворотки против рожи свиней: тез. Докл. Всерос. Науч. Конф. "Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов". - Щёлково, 2000. - С. 181-183.

14. Школьников Е.Э., Коломина П.Ф. и др. Разработка схемы гипериммунизации волов-продуцентов для изготовления сыворотки против рожи свиней: тез. Докл. Всерос. Науч. Конф. "Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов". - Щёлково, 2000. - С. 184-185.

15. Школьников Е.Э., Самуйленко А.Я., Еремец В.И. Усовершенствование питательной среды и условий культивирования бактерий рожи свиней. Междунар. науч.-практич. конф. - Покров, 2000. - с. 251-252.

УДК 619:616-002.5:616.9-092.9:577.112.083

Функционирование и серологическая активность экстракта клеток и продуктов экспрессии *Mycobacterium bovis*

Шуралев Э.А., Хаертынов К.С., Валеева А.Р., Александрова Н.М., Мукминов М.Н.

Казанская государственная медицинская академия – филиал ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, г. Казань;

ФГАОУ ВО "Казанский (Приволжский) федеральный университет,

г. Казань;

ФГБНУ "Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности", г. Казань

Аннотация. Целью данной работы было определение серологической активности различных антигенных фракций, полученных из штамма *M.bovis* Bovinus-8 методом иммуноблота. Исследованию подвергали экстракт клеток микобактерий и выделенные продукты экспрессии из супернатанта жидкой питательной среды после 3-х месячно-

го культивирования. Серологическую активность антигенов изучали в реакции иммуноблот с гипериммунной сывороткой крови кроликов.

Получены антигены из экстракта клеток с широким спектром структурных компонентов, распределяющимся в диапазоне молекулярных масс от 200 до 6,5 кДа, и продукты экспрессии культивируемых микобактерий *M.bovis* с диапазоном от 200 до 16,1 кДа. В результате поведенных исследований выявлено, что антигенные препараты как из экстракта клеток *M.bovis* Bovinus-8, так и их секреторные продукты, охватывают широкий спектр диагностически значимых антигенов, что в свою очередь не допускает проявления ложных отрицательных результатов при оценке специфического гуморального противотуберкулезного иммунитета. По результатам иммуноблота серологическую активность с гипериммунной сывороткой крови проявили фракции антигена, полученные из жидкой культуральной среды после культивирования *M.bovis* Bovinus-8 (продукты экспрессии), с молекулярными массами 50,5, 29,4, 22,4 и 20,6 кДа, а также фракции антигена из экстракта клеток в диапазоне от 82,3 до 6,5 кДа.

Ключевые слова: туберкулез, антигены, электрофорез, иммуноблот.

Fractionation and serological activity of *Mycobacterium bovis* cell extract and secondary metabolites

Shuralev E.A., Khaertynov K.S., Valeeva A.R., Aleksandrova N.M., Mukminov M.N.

The aim of this work was to determine the serological activity of various fractions of the strain *M. bovis* Bovinus-8 using the method of immunoblot. The extract of mycobacteria cells and their expression products isolated from the supernatant were used as antigens for serological studies. Serological activity of the antigen was studied in the reaction of immunoblotting with rabbit hyperimmune serum.

Antigens from the cell extracts with a wide range of structural components that span a range of molecular masses from 200 to 6.5 kDa, and expression products of mycobacteria *M. bovis* ranges from 200 to 16.1 kDa were isolated. It was found that the range of preparations obtained from cell extracts of *M. bovis* Bovinus-8 and their expression products covers the range of diagnostically relevant antigens, which prevents obtaining false-negative results in the evaluation of specific humoral immunity at the tuberculosis pathogenesis. The fractions of the antigens obtained from expression products of *M. bovis* Bovinus-8, with a molecular mass of 50.5, 29.4, 22.4 and 20.6 kDa, and antigenic material from the cell extracts which were active in the range from 82.3 to 6.5 kDa interacted with the positive hyperimmune serum.

Key words: tuberculosis, antigens, electrophoresis, immunoblot.

Иммунологические методы в диагностике инфекционных заболеваний требуют использования биомаркеров с высокой чувствительностью и специфичностью. Проведение научных исследований в области протеомики и иммуномики туберкулеза создает предпосылки создания эффективных средств диагностики этого заболевания [1–3], а посредством мультиантигенного подхода усиливается их чувствительность и специфичность [4,5]. Динамика антителобразования имеет свои особенности, что проявляется в синтезе специфических антител к определенным микобактериальным антигенам в зависимости от стадии развития туберкулезного инфекционного процесса [6–8]. В связи с этим особое внимание уделяется к получению и синтезу антигенов, наличие которых максимально отражает все стадии развития заболевания [9–11].

Целью данной работы было определение серологической активности различных фракций штамма *M. bovis* Bovinus-8 методом иммуноблота.

Материалы и методы

Суспензию клеток *M. bovis* Bovinus-8 смешивали с неполным адьювантом Фрейнда из расчета: 0,5 мл концентрированной суспензии клеток микобактерий, содержащей

10 ЕД микробных тел/мл, 1 мл стерильного физиологического раствора и 1,5 мл адьюванта. Для получения активных, специфичных и высокоаффинных сывороток кроликов массой 2,5–3 кг, которых иммунизировали внутрикожно многократно вдоль спины (по 5 точек с каждой стороны). В каждую точку вводили по 0,1 мл подготовленного антигенного материала (суспензия клеток *M. bovis* Bovinus-8). Через 8–10 недель после первого цикла проводили бустер инъекцию путем подкожного введения суспензии клеток в нижнюю треть шеи с обеих сторон по 0,5 мл. На 10 сут после повторного введения суспензии клеток осуществляли тотальный забор крови с последующим отделением гипериммунной сыворотки.

Исследованию подвергали экстракт клеток микобактерий и выделенные из жидкости культуральной среды продукты экспрессии (секреторные антигены). Отмытые клетки от остатков питательной среды разрушали на приборе Fast Prep-24 (MP Biomedicals) с использованием пробирок Blue Lising Matrix (Tube 2,0 мл) (MP Biomedicals). Белковый спектр возбудителя изучали методом электрофореза в 12,5% полиакриламидном геле (ПААГ) с последующим окрашиванием кумасси ярко-синим и азотнокислым серебром.

Серологическую активность указанных фракций антигенного материала определяли методом иммуноблота [12]. С этой целью проводили перенос материала, полученного в результате фракционирования в полиакриламидном геле, на нитроцеллюлозную мембрану (Supported nitrocellulose membrane 0,45 μm). Результаты электрофореза и иммуноблота обрабатывали и визуализировали на приборе GelDoc XR+ Sistem (BioRad), с последующей их обработкой с использованием программы Image Lab версия 5.1.

Результаты и обсуждение

Активность иммунных сывороток оказывает существенное влияние на результат серологических реакций. Уровень специфических антител зависит от множества факторов: качества и количества вводимого антигена, способа и кратности введения, применения вспомогательных веществ. Подбор адекватной схемы иммунизации позволяет в короткие сроки получить сыворотки с высоким титром антител. Иммунный ответ на каждый индивидуальный антиген специфичен. При этом прослеживается зависимость антителогенеза от дозы вводимого антигена, кратности и способа введения.

У кроликов, подвергнутых гипериммунизации, в местах введения суспензии культуры *M. bovis* Bovinus-8 наблюдали воспалительную реакцию. При внутрикожной иммунизации в местах введения образовывался инфильтрат, отек, гиперемия с центральной зоной ишемии, далее переходящей в некроз. Через 7 недель отмечалась нормализация процесса. При подкожном введении наблюдалось увеличение регионарных лимфатических узлов.

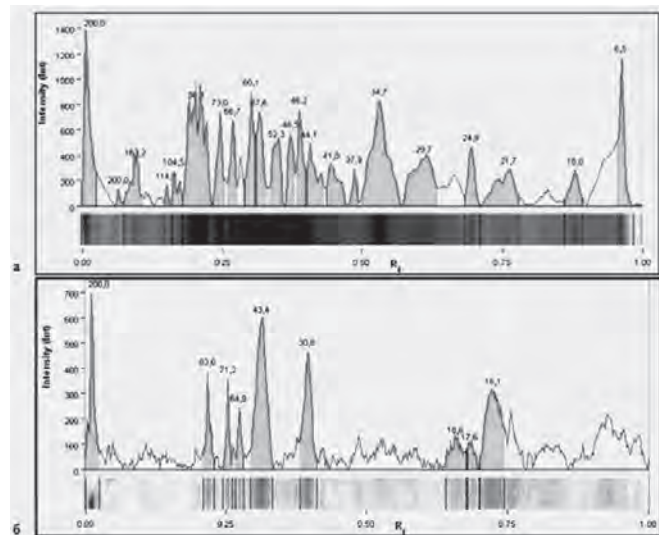


Рис. 1. Денситограмма электрофореза антигенного материала в 12,5%-ном полиакриламидном геле: а – экстракт клеток *M. bovis* Bovinus-8; б – продукты экспрессии культивируемых клеток *M. bovis* Bovinus-8.

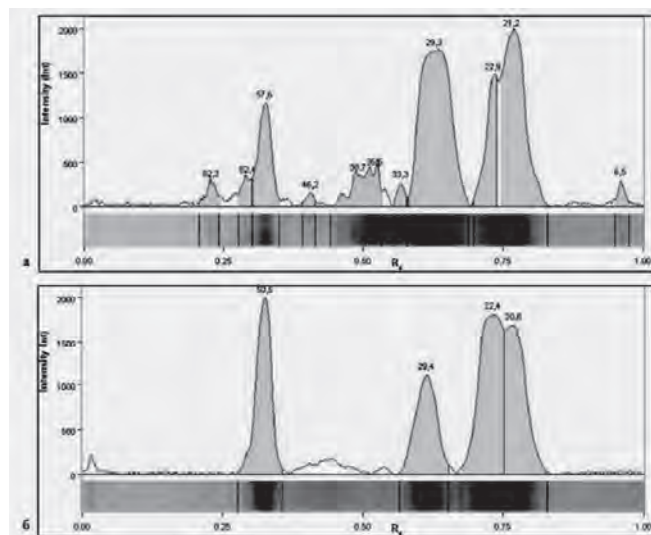


Рис. 2. Денситограмма иммуноблота с гипериммунной кроличьей сывороткой крови против *M. bovis*: а – экстракт клеток *M. bovis* Bovinus-8; б – продукты экспрессии культивируемых клеток *M. bovis* Bovinus-8.

В ходе проведения фракционирования методом электрофореза был выявлен широкий спектр структурных компонентов *M. bovis* Bovinus-8, который распределялся в диапазоне с молекулярной массой от 200 до 6,5 кДа для экстракта клеток и от 200 до 16,1 кДа для продуктов экспрессии (рис. 1). Полученные результаты указывают на широкий спектр выявленных потенциальных антигенов как клеточной стенки, так и секретируемых *M. bovis* Bovinus-8 продуктов.

При анализе серологической активности полученных фракций в иммуноблоте выявили несовпадение с результатами аналитического электрофореза. С гипериммунной сывороткой реагировали положительно не все фракции. Так, фракции антигенов из экстракта клеток проявляли активность в зоне от 82,3 до 6,5 кДа, а фракции, полученные из жидкой культуральной среды (продукты экспрессии), имели молекулярную массу 50,5, 29,4, 22,4 и 20,6 кДа (рис. 2).

Полученные результаты позволяют предположить, что, вероятнее всего, антигенной активностью обладают липидные структуры, а не белковые. В этом заключается особенность строения микобактериальной клеточной стенки. Однако спектр полученных препаратов охватывает комплекс диагностически значимых антигенов, что исключает получение ложноотрицательных результатов при использовании этих антигенов для оценки специфического гуморального иммунитета при туберкулезе.

Заключение

Получены антигены из экстракта клеток с широким спектром структурных компонентов, распределяющимся в диапазоне с молекулярной массой от 200 до 6,5 кДа, и продукты экспрессии микобактерий *M. bovis* – от 200 до 16,1 кДа. Проведенными исследованиями выявлено, что антигенные препараты как из экстракта клеток *M. bovis* Bovinus-8, так и их секреторных компонентов, охватывает широкий спектр диагностически значимых антигенов, что в свою очередь не допускает проявления ложных отрицательных результатов при оценке специфического гуморального туберкулезного иммунитета. Серологическую активность с гипериммунной сывороткой крови, полученной против *M. bovis* Bovinus-8, проявили фракции антигена, полученного из жидкой питательной среды (продукты экспрессии) в течение 3 месячного культивирования *M. bovis* Bovinus-8 с молекулярными массами в диапазоне убывания 50,5, 29,4, 22,4 и 20,6 кДа, а также антигенный материал из экстракта клеток, который проявил активность в диапазоне от 82,3 до 6,5 кДа.

Список литературы

1. Гулюкин А.М., Хисматуллина Н.А., Хаертынов К.С. и др. Использование антигенов микобактерий *M. bovis* BCG-1, *M. bovis*-8 и *M. bovis* Valee-88 для иммуноферментного анализа сывороток крови крупного рогатого скота // Труды

Всероссийского НИИ экспериментальной ветеринарии им. Я.П. Коваленко. - 2013. - Т. 77. - С. 200-203.

2. Цибульский А.П., Хаертынова И.М., Уразов Н.Г., Хаертынов К.С. Скрининг диагностического потенциала нативных белковых фракций *Mycobacterium tuberculosis* методом иммуноблоттинга // Клиническая лабораторная диагностика. - 2016. - Т. 61, № 2. - С. 90-102.

3. Сотников Д.В., Жердев А.В., Авдиенко В.Г., Дзантиев Б.Б. Иммунохроматографическая серодиагностика туберкулеза с использованием конъюгата коллоидное золото-антиген // Биотехнология. - 2015. - № 2. - С. 76-81.

4. Шуралев Э.А. Сравнительный анализ тест-систем для диагностики туберкулеза у альпак // Ветеринарный врач. - 2012. - № 5. - С. 30-33.

5. Шуралев Э.А., Ндаишимийе Э.В., Мукминов М.Н. К вопросу серологической диагностики туберкулеза крупного рогатого скота // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. - 2012. - Т. 211. - С. 202-206.

6. Шуралев Э.А., Мукминов М.Н., Велан К., Кларк Д. Выявление специфических антител у вапиту при туберкулезе // Ветеринария. - 2013. - № 8. - С. 54-57.

7. Шуралев Э.А. Образование антител у северного оленя, инфицированного *Mycobacterium bovis* // Ветеринария. - 2016. - № 9. - С. 18-20.

8. Валиев Р.Ш., Валиев Н.Р., Хаертынова И.М., Хаертынов К.С. Анти-ТБ антитела класса IgG в сыворотке крови больных туберкулезом, ВИЧ-инфекцией и при их сочетании // Туберкулез и болезни легких. - 2014. - Т. 91, № 9. - С. 14-15.

9. Хисматуллина Н.А., Хаертынов К.С., Шуралев Э.А., Гулюкин А.М., Ахмадеев Р.М., Найманов А.Х. Получение антигенов микобактерий *M. bovis* BCG-1, *M. bovis*-8 и *M. bovis* Valee для дифференциации поствакцинальных и постинфекционных антител // Ветеринарна медицина. - 2013. - № 97. - С. 558-560.

10. Шуралев Э.А. Микобактериальные антигены: синтетические пептиды и рекомбинантные белки // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. - 2013. - Т. 216. - С. 403-407.

11. Дятлова В.И., Богун А.Г., Бикетов С.Ф. Оценка серодиагностического потенциала рекомбинантных антигенов *Mycobacterium tuberculosis*, полученных в разных экспрессионных системах // Биотехнология. - 2014. - № 1. - С. 72-78.

12. Алфредо Э., Вершинина В.И., Хаертынов К.С., Герасимова С.В., Уразов Н.Г., Хаертынова И.М. Способ получения антигена с молекулярной массой 45 кДа из *Mycobacterium tuberculosis* // Фундаментальные исследования. - 2013. - № 1-1. - С. 18-22.

**ЖУРНАЛ «ВЕТЕРИНАРИЯ И КОРМЛЕНИЕ»
ОКАЗЫВАЕТ НАУЧНЫМ, ГОСУДАРСТВЕННЫМ
И КОММЕРЧЕСКИМ ПРЕДПРИЯТИЯМ УСЛУГИ
ПО ДОПЕЧАТНОЙ ПОДГОТОВКЕ И ИЗГОТОВЛЕНИЮ**

- ◆ КНИГ,
- ◆ МЕТОДИЧЕК,
- ◆ БРОШЮР,
- ◆ ЛИСТОВОК,
- ◆ БУКЛЕТОВ,
- ◆ КАЛЕНДАРЕЙ

◆ И ДРУГОЙ ПОЛИГРАФИЧЕСКОЙ ПРОДУКЦИИ.

**БЮДЖЕТНЫЕ ЦЕНЫ, ВЫСОКОЕ КАЧЕСТВО, ОТВЕТСТВЕННОЕ ИСПОЛНЕНИЕ
ДОСТАВКА ВО ВСЕ РЕГИОНЫ РОССИИ.**



(8-916) 819-48-13
vetkorm@mail.ru