

В результате ПЦР-анализа ДНК линии Vero образуется 10 паттернов с молекулярным весом 264, 390, 425, 475, 535, 615, 682, 760, 900 и 1083 пары нуклеотидов.

Наличие продуктов амплификации с молекулярным весом в 255, 278, 384, 404, 521, 567, 623, 708, 1084, 1175 и 1508 пар нуклеотидов, полученных в результате ПЦР с ДНК неидентифицированной культуры, служит маркером того, что исследуемая клеточная линия является перевиваемой линией MDBK и, наряду с кариотипированием, подтверждает данное заключение.

По данным вирусологического исследования немаркированная культура оказалась нечувствительной к реовирусу. При внесении в клеточный монослой вируса ИРТ на 48–96-й час после заражения отмечалось его цитопатическое действие, проявляющееся зернистостью, округлением клеток с последующим формированием сферических синцитиев, содержащих по 10–20 ядер.

По характеру роста клеток в монослой и результатам кариологического анализа нами было установлено сходство неидентифицированной линии клеток с перевиваемой линией MDBK. Неточное соответствие модального числа хромосом MDBK (42) и исследуемой культуры (36–40) может быть связано с высокой наследственной изменчивостью перевиваемых линий клеток, которая наблюдается при длительном их культивировании под действием меняющихся условий внешней среды: питательные среды, pH, сыворотка, биологически активные добавки [7].

Результаты электрофореза продуктов амплификации ДНК исследуемой культуры (контрольных линий) показывают идентичность неизвестной культуры и перевиваемой культуры клеток MDBK, в то же время показаны значительные различия между исследуемой культурой и линией Vero.

По результатам анализа данных электрофореза с помощью программы Quantity One 1-D Analysis Software (версия 4.6.3) построена дендрограмма, дающая четкое определение сходства ДНК-профилей перевиваемой культуры клеток MDBK и немаркированной культуры. Степень совпадения составляет 97 %, что фактически означает идентичность линий.

Выводы. Комплексный кариологический и молекулярно-генетический анализ позволяет определять видовую принадлежность перевиваемых культур клеточных линий, что подтверждается результатами вирусологических исследований. Данный подход может быть реализован для определения видовой идентификации, сертификации и паспортизации перевиваемых клеточных линий.

Список литературы

1. *Адамс, Р.* Методы культуры клеток для биохимиков [Текст] / *Р. Адамс.* – М.: Мир, 1983. – 264 с.
2. Клеточные культуры [Текст]: информ. бюл. / отв. ред. М.С. Богданова. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2010. – Вып. 26. – 61 с.
3. *Куляшов, К.В.* Определение видовой принадлежности культур клеток методами молекулярно-генетического анализа [Текст]: дис. ... канд. биол. наук / *К.В. Куляшов.* – Щелково, 2009. – 150 с.
4. *Moorhead, P.S.* Chromosome preparations of leucocytes cultured from human peripheral blood [Text] / *P.S. Moorhead, P.S. Nowell, W.I. Mellman* // *Exper. Cell Res.* – 1960. – Vol. 20. – P. 613–616.
5. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование [Текст] / *Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук*: пер. с англ. – М.: Мир, 1984. – 480 с.
6. Специализированная коллекция перевиваемых соматических клеточных культур сельскохозяйственных промысловых животных РККК (П), (СХЖ РАСХН) [Текст]: каталог / *Л.П. Дьяконов* [и др.]. – М., 2006. – 115 с.
7. Методы культивирования клеток [Текст] / под ред. Г.П. Пинаева, М.С. Богдановой. – СПб.: Изд-во Политехн. ун-та, 2008. – 278 с.

APPLICATION OF CYTOGENETIC METHODS FOR VARIETY IDENTIFICATION OF ANIMAL CELLS LINES

Plotnikova E.M., Zakirova E.Yu., Ivanov A.V., Faizov T.Kh.

The Federal Center of Toxicological, Radiation and Biological Safety, Kazan, Russia

This article shows the necessity of an integrated cytogenetic and molecular-genetic analysis in specific identification of a non-identified cell line for certification of cell cultures on the example of a non-tagged monolayer line growing in standard conditions (Eagle's MEM with cattle serum). MDBK and Vero cell lines were used for comparison. As a result of karyological analysis, modal chromosome number and variability interval were determined. Karyological research and PCR analysis showed that the non-tagged cell culture belongs to the finite MDBK cell line.

УДК 619:616.98:579.873.21-07

СТАНДАРТИЗАЦИЯ ОЧИЩЕННОГО СПЕЦИФИЧЕСКОГО АЛЛЕРГЕНА (ОСА) ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Притыченко А.Н.

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

Лысенко А.П.

РНИУП «ИЭВ им. С.Н. Вышелесского НАНБ», г. Минск, Республика Беларусь

С введением в практику аллергической диагностики туберкулеза у крупного рогатого скота считалось, что туберкулин – строго специфичный диагностикум [1, 4, 5]. По мере ликвидации туберкулеза обозначилась проблема реагирующих на туберкулин коров, не имевших на секции изменений, свойственных туберкулезу [1, 4]. Установлено, что наряду с латентной туберкулезной инфекцией, причиной реакций на туберкулин могут быть нетуберкулезные микобактерии (НТМБ) [8]. С помощью референс-системы антигенов *M. bovis* БЦЖ и перекрестного иммуноэлектрофореза установлено, что до 90 % антигенов *M. bovis*, могут встречаться у НТМБ, а также у *Nocardia asteroides* и *Corynebacterium pyogenes* [3].

В процессе получения ППД туберкулина и его очистки происходит лишь количественное снижение концентрации общеродовых полисахаридных антигенов, а набор антигенов исходного культурального фильтрата сохраняется в целевом продукте [2].

Исследование видовой специфичности ППД туберкулина на крупном рогатом скоте показало, что она не превышает 30 % [9]. Парааллергические реакции на туберкулин наносят значительный экономический ущерб из-за убоя фактически здоровых животных.

Предприняты многочисленные попытки повышения видовой специфичности туберкулина и выделения видоспецифических антигенов *M. bovis* [5, 8, 9]. По данным Closs et al. [9] лишь антигены №2, 3, 5, 21, 46, 63, 70, 81, 84 из спектра более чем 100 антигенов, были специфичны для *M. bovis* [9]. Вместе с тем, углубленное изучение видовой специфичности выявило, что их число ограничивается несколькими антигенами, в первую очередь МРВ 70 с молекулярной массой 22–24 кДа, в зависимости от степени

гликозилювання [8]. Его содержание в культуральной жидкости *M. bovis* может достигать 10 %. В меньших количествах он присутствует у *M. tuberculosis* и возможно у *Nocardia asteroides* [5].

Актуальной задачей стала разработка масштабных методов повышения специфичности туберкулинов. Установлено, что основная масса перекрестно-реагирующих антигенов *M. bovis* имеет молекулярную массу более 100 кДа [9]. С возникновением мембранной ультрафильтрации появилась возможность масштабного фракционирования исходного культурального фильтрата *M. bovis* для повышения специфичности туберкулина. Однако получаемый целевой продукт не обладал строгой видовой специфичностью [1]. Представляет интерес сочетание биоспецифической очистки и ультрафильтрации, позволяющей одновременно удалять часть общеродовых антигенов, их комплексы с антителами и избыток антител.

Цель работы – разработка и стандартизация аллергена с высокой видовой специфичностью для массовой диагностики туберкулеза крупного рогатого скота.

Материалы и методы исследований. Работа выполнена на кафедре микробиологии и вирусологии УО ВГАВМ, ОАО «БелВитунифарм», в отделе зоонозов и разработки диагностических препаратов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышесского».

В работе использовали штаммы *M. avium* 1603, *M. terrae* 15722 ATCC, *M. fortuitum* 342, *M. phlei* 1889, *M. tuberculosis* H₃₇R_v, *M. bovis* 8. Среды: Гельберга, Павловского и Сотона. Ультразвуковой дезинтегратор Bandelin.

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

Полученные варианты аллергена проверили в каждой пробе на морских свинках, зараженных *M. bovis* и *M. fortuitum* в различных разведениях.

Результаты исследований. При оценке аллергенов получены следующие результаты (таблица 1).

Таблица 1 – Размеры папул в мм через 24 ч после введения морским свинкам ОСА (без ультрафильтрации), ультрафильтрата ОСА 100 кДа и контрольного туберкулина

Номера животных	№1 ТО 74 1:100 100 МЕ	№2 ОСА 1:40	№3 ОСА 1:80	№4 ОСА 100 кДа 1:20	№5 ОСА 100 кДа 1:40	№6 100 кДа 1:80
<i>M. bovis</i>						
1	15	13,5	10,5	13,5	13	12
2	18,5	16,8	19	19	16	15
3	19	18	15	18	16,5	14,5
4	16,5	14	13,5	15,5	12,5	7
5	22	20	14	15	11	9
6	16,5	16,5	15,5	14	13	12
7	17	16	11	15	13	8
8	17	15,5	13,5	16,5	11,5	7,5
9	16,5	18	18	19	16,5	16,5
10	17	20,5	20	16,5	15,5	14,5
M±m	17,5	16,8	15,0	16,2	13,9	11,6
SD	1,93	2,31	3,20	1,96	2,08	3,50
t-test		0,31	0,05	0,16	0,01	0,004
<i>M. fortuitum</i>						
1	15	15	6,5	7	2	2
2	15	12,5	9	12,5	10,5	6
3	9	2	1	1	1	1
4	3	1	1	1	1	1
5	12,5	1	1	1	1	1
M±m	10,9	6,3	3,7	4,5	3,1	2,2
SD	5,05	6,87	3,80	5,17	4,16	2,17
t-test		0,09	0,01	0,02	0,02	0,01

Как видно из таблицы 1, все разведения и варианты ОСА вызвали положительные реакции у морских свинок, зараженных *M. bovis*, причем при разведениях 1:20 и 1:40 они достоверно не отличались по интенсивности от аллергических реакций на контрольный ТО.

У морских свинок, зараженных *M. fortuitum*, контрольный ТО вызывал достаточно интенсивные реакции (10,9 мм). Реакции на ОСА были достоверно меньше, причем аллерген дополнительно очищенный ультрафильтрацией, обладал меньшей перекрестной активностью, что указывает на необходимость такой очистки на мембранах с пределом задержания 100 кДа. Вместе с тем, ультрафильтрация ОСА снижала его общую активность. На рисунке 1 представлена логарифмическая зависимость интенсивности реакций от разведения аллергенов. Как видно, расстояние между линиями активности составляет 0,3 log. Antilog 0,3=1,99, что указывает на то, что ультрафильтрация во столько раз снижает активность ОСА.

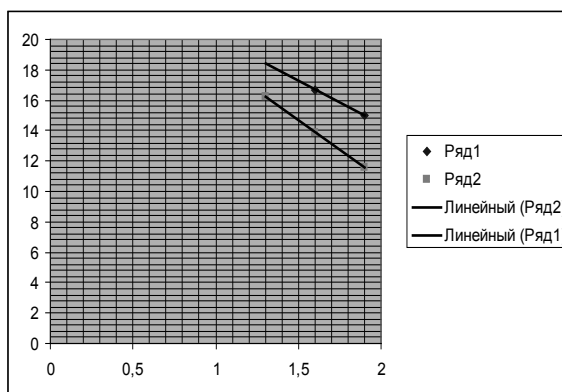


Рис. 1. Логарифмическая зависимость интенсивности аллергических реакций у морских свинок группы *M. bovis*, от разведения ОСА и ОСА 100 кДа. По оси абсцисс – lg разведений, по оси ординат – диаметр папул в мм

Для очистки всей серии ОСА ультрафильтрацией, 400 мл ОСА центрифугировали 20 мин при 3000 об/мин для осветления. Ультрафильтрацию провели на ячейке Biomax 100 kDa со скоростью потока 40.

Ультрафильтрат ОСА 100 кДа проверили в каждой пробе на морских свинках, зараженных *M. bovis* БЦЖ и *M. fortuitum*. Для проверки подготовили соответствующие разведения аллергенов и контрольного туберкулина очищенного (ТО).

Результаты исследования представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Активность и специфичность ОСА, очищенного ультрафильтрацией на мембране Biomax 100 kDa (диаметр папул у морских свинок в мм через 24 ч после введения)

Номера животных	№1 ТО 74 1:80 125 ME	№2 ТО 74 1:160 62,5 ME	ОСА 100 1:4, 1:80	ОСА 100 1:4, 1:160	ОСА 100 1:6, 1:80	ОСА 100 1:6, 1:160
<i>M. bovis</i>						
1	16	15	12	11	13	10
2	17	15	14	7	9	4
3	17	9	7	4	6	3
4	18	12	10	7	9	4
5	20	16	11	8	12	5
6	15	12	10	7	6	4
7	20	17	15	9	15	5
8	19	15	14	11	10,5	10,5
9	14	11	9	4	4	4
10	16,5	8	13,5	7	14	6
M±m	17,3	13,0	11,6	7,5	9,9	5,6
<i>M. fortuitum</i>						
1	7	4	2	1	1	1
2	6	2	2	1	2	1
3	7	6	1	1	1	1
4	5	3	1	2	1	1
M±m	6,3	3,8	1,5	1,3	1,3	1

Как видно из таблицы 2, ОСА 100 кДа, в отличие от ТО не вызвал перекрестных реакций у морских свинок группы *M. fortuitum*.

Титрация ОСА параллельно с ТО позволила определить активность целевого продукта. Как видно на рисунке 2 antilog расстояния между линиями их активности составляет 2,51, что указывает на то, что активность 0,2 мл ОСА 100 кДа составляет 10000 ME: 2,51=3984 ME (при факторе разведения 1:4).

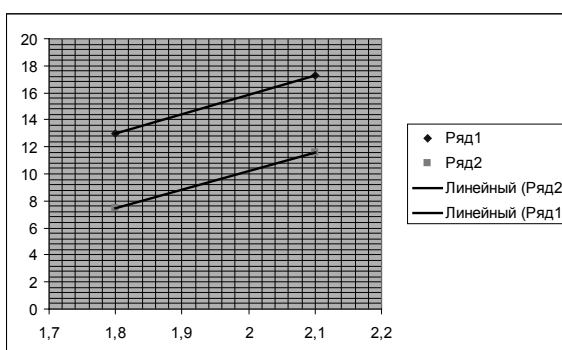


Рис. 2. Логарифмическая зависимость интенсивности аллергических реакций у морских свинок группы *M. bovis*, от разведения ТО и ОСА 100 кДа. По оси абсцисс – lg разведений, по оси ординат – диаметр папул в мм

Выводы и перспективы дальнейших исследований. Получена опытно-промышленная серия ОСА 2-12 ИПУФ объемом 10715 доз. Для стандартизации ОСА необходимо применять метод титрации концентрата препарата на морских свинках, зараженных *M. bovis* и нетуберкулезными микобактериями в сравнении с разведениями туберкулина известной активности. Критерием выбора оптимального разведения ОСА является сохранение сопоставимой с туберкулином активности у животных, инфицированных возбудителем туберкулеза (диаметр папул не менее 10 мм) и отсутствие перекрестных реакций у морских свинок, зараженных нетуберкулезными микобактериями (диаметр папул не более 5 мм).

Список литературы

1. Козлов, В.Е. Аллергены для диагностики туберкулеза : совершенствование производства и стандартизация [Текст] : автореф. дис. ... д-ра биол. наук : 16.00.03 ; 03.00.23 / В.Е. Козлов ; ФГУ «Всерос. гос. Центр качества и стандартизации лекарств. средств для животных и кормов». – М., 2007. – 43 с.
2. Лысенко, А.П. Антигенный состав ППД туберкулина для млекопитающих [Текст] / А.П. Лысенко // Ветеринария. – 1989. – № 5. – С. 30–32.
3. Лысенко, А.П. Антигены *M. bovis* и атипичных микобактерий, изучение и применение для дифференциальной диагностики туберкулеза крупного рогатого скота [Текст] : автореф. дис. ... д-ра вет. наук : 16.00.03 / А.П. Лысенко ; БелНИИ эксперим. ветеринарии им. С.Н. Вышелеского. – Минск, 1994. – 35 с.
4. Туберкулез животных и меры борьбы с ним [Текст] / Ю.Я. Кассич [и др.]. – К. : Урожай, 1990. – 304 с.
5. Юсовец, М.К. Туберкулез сельскохозяйственных животных и птиц [Текст] / М.К. Юсовец. – Минск : Ураджай, 1963. – 448 с.
6. Fifis, J. Soluble *Mycobacterium bovis* protein antigens: studies on their purification and immunological evaluation [Text] / J. Fifis, J.S. Rothel, P.R. Wood // Microbiol. – 1994. – Vol. 40. – P. 65–81.
7. Griffith, A. The serological classification of mammalian and avian tubercule bacilli [Text] / A. Griffith // Tubercule. – 1925. – Vol. 6. – P. 417–423.
8. Harboe, M. MPB 70, a unique antigen of *M. bovis* BCG [Text] / M. Harboe, S. Nagai // Am. Rev. Resp. Dis. – 1984. – Vol. 129. – P. 444–452.
9. The antigens of *M. bovis* strains BCG. Studied by dosed immunoelectrophoresis a reference system [Text] / O. Closs [et al.] // Scand. J. Immunol. – 1980. – № 12. – P. 249–263.

STANDARDIZING OF THE PURIFIED SPECIFIC ALLERGEN (PSA) FOR DIAGNOSIS OF BOVINE TUBERCULOSIS

Pritychenko A.N.

Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

Lysenko A.P.

The Institute of Experimental Veterinary, Minsk, Republic of Belarus

The PSA is to be standardized on guinea pigs infected with non-tuberculosis mycobacteria based on serial dilutions of tuberculin of established activity.

УДК 619:615.37.02

**ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ РАЗВИТИЯ ПРОМЫШЛЕННОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ
ПРОИЗВОДСТВА ВЕТЕРИНАРНЫХ ПРЕПАРАТОВ**

Самуйленко А.Я.

*ГНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности»
Россельхозакадемии, г. Щелково, Российская Федерация*

В настоящее время биотехнология, наряду с информационными и нанотехнологиями, становится одним из ключевых приоритетов государственной политики. Известно, что продукция, получаемая с помощью промышленной биотехнологии, имеет выход практически во все отрасли народного хозяйства: сельское хозяйство, медицину, ветеринарию, пищевую промышленность, химическое производство, энергетику и экологию.

Значение развития биотехнологии повышается в связи с глобальными изменениями на земле, связанными с ухудшением экологии, гиперболическим приростом народонаселения и давлением его жизнедеятельности на биосферу, сокращением природных ресурсов и другими факторами [1].

В Концепции долгосрочного социально-экономического развития Российской Федерации биотехнология включена в основные приоритеты. Из 34 критических технологий 16 являются ответственными за биотехнологию [2].

С целью выработки долгосрочной государственной стратегии в сфере биотехнологий в последнее время был принят ряд важных решений. Правительством РФ утверждены Комплексная программа развития биотехнологии до 2020 года и Государственная программа развития сельского хозяйства и регулирования рынков сельскохозяйственной продукции, сырья и продовольствия на 2013–2020 годы. Биотехнологическая тематика активно поддерживается Российским фондом фундаментальных исследований и научными программами государственных академий – РАН, РАМН, РАСХН. Разрабатываются региональные программы развития биотехнологий.

На данном этапе в научно-исследовательских институтах биотехнологическими методами созданы десятки новых лекарственных средств для защиты животных, растений, средств воспроизводства плодородия почв и других средств, обеспечивающих повышение эффективности функционирования АПК. Однако эти препараты выпускаются малыми партиями, производятся, в основном, на лабораторном оборудовании.

Отсутствует система масштабирования разработанных технологических процессов от лабораторных исследований до промышленного производства. Связь между научными организациями, занимающимися биотехнологическими разработками и биопредприятиями, которые должны внедрять эти разработки, очень слаба. Таким образом, сложился разрыв между результатами научной работы и промышленным производством. Поэтому многочисленные новые высокоэффективные биопрепараты, созданные научными учреждениями страны, еще не нашли широкого применения в производстве и в ветеринарной практике.

Исходя из анализа состояния биотехнологии в мире и России, в государственных программах обозначены первоочередные задачи по выведению научных исследований и промышленного производства на глобальный уровень конкурентоспособности [3, 4].

К приоритетам развития биотехнологической отрасли, в том числе в сельском хозяйстве относятся: