

этот показатель снижался по сравнению с начальными данными и к концу опыта составлял 1,39.

Тимоловая проба в начале эксперимента выявляла превышение нормативных показателей, и на протяжении всего исследования у самок опытных групп показатели уменьшились, войдя в нормативные границы, а у зверей контрольной группы выраженных изменений не отмечено.

Таким образом, применение гомеопатического препарата Лиарсин нормам в период первой половины беременности увеличивало уровень гемоглобина, содержание глюкозы и общего белка, а также снижало

концентрацию билирубина, холестерина, мочевины, активность ЩФ и АлАТ, причём в большей степени у молодых самок. Следовательно, введение Лиарсина большим гепатозом самкам норок в период беременности оказало положительное регулирующее влияние на морфологические и биохимические показатели крови зверей в этот напряженный этап эмбриогенеза и оказало существенное влияние на метаболические процессы в организме, содействовало нормализации гемопоэза, снятию гепатодепрессивного и цитолитического синдромов.

РЕЗЮМЕ

Введение Лиарсина большим гепатозом самкам норок в период первой половины беременности оказало положительное регулирующее влияние на клиническое состояние, морфологические и биохимические показатели крови зверей в этот напряженный этап эмбриогенеза и оказало существенное влияние на метаболические процессы в организме, содействовало нормализации гемопоэза, снятию гепатодепрессивного и цитолитического синдромов.

SUMMARY

Introduction Liarsin being ill hepatose female minks at the period of the first half to pregnancy have rendered positive adjusting influence upon clinical condition, morphological and biochemical factors shelters beasts on this tense embryonic stage and has rendered the essential influence upon metabolic processes in the organism, assisted the normalization hemopoies, removing hepatodepressed and citolitic syndrome.

Литература

1. Адаптация сельскохозяйственных животных и птицы Под ред. Б.П. Мохова. Ульяновск. ГСХА, 2004. 160 с.
2. Багаева О.С., Беспалов И.М., Иванова В.А. Модернизация рационального производства препаратов // Защита и карантин растений. 2000. № 8.
3. Владимир Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972.
4. Воейкова А.В. Ветеринарная гомеопатия для мелких домашних животных. М.: Изд-во ООО «Хелвет», 2005. 81 с.
5. Дашукаева К.Г. Применение дипромония и дипроанемина для коррекции обмена веществ и воспроизводительной способности норок // Матер. междунар. науч.-практ. конф. «Проблемы акушерско-гинекологической патологии и воспроизводства сельскохозяйственных животных» посвященная 100-летию А.П. Студенцова: Ч. 1. Казань, 2003. С. 114-117.

Koch H. Leberschutz Therapeutica // Pharmazie in unserer Zeit, 9 Jahrg., 1980, № 3. P. 45-48.

УДК 619:578.825.1:573.6.086.83:57.083.3

М.А. Волкова, Г.В. Батченко, М.И. Шульпин, Н.С. Мудрак, Л.О. Щербакова, В.В. Дрыгин, Ш.К. Куляшбекова

ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных», г. Владимир

ПОЛУЧЕНИЕ ПРЕПАРАТОВ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИГЕНОВ И СЫВОРОТОК ПРОТИВ ВИРУСА БОЛЕЗНИ МАРЕКА И ИХ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ В ИММУНОФЕРМЕНТНОМ АНАЛИЗЕ

Вирус болезни Марека – высоко патогенный клеточно-ассоциированный альфа герпесвирус, который является этиологическим агентом болезни Марека (БМ) – высоко контагиозного заболевания цыплят, сопровождающегося образованием Т-лимфом, изменением периферических не-

рвов и иммуносупрессией (5). Основным способом борьбы с этим заболеванием является вакцинопрофилактика. Для этой цели используются вакцины, приготовленные из трёх серотипов вирусов: аттенуированного ВБМ серотипа 1, естественно непатогенного ВБМ серотипа 2 и ВБМ серо-

типа 3, или вируса герпеса индеек, также естественно непатогенного штамма. Вакцинация против БМ сопровождается выработкой как клеточного, так и гуморально-го иммунитета, который сохраняется в течение всей жизни птицы (9, 10, 13). Заболевание, вызываемое патогенным вирусом болезни Марека, также сопровождается выработкой антител, которые обнаруживаются через 1-2 недели после начала инфекции. Для выявления антител к ВБМ используют реакцию диффузионной преципитации, непрямой иммунофлуоресцентный метод и иммуноферментный анализ (3, 9, 14, 15). Целью наших исследований было получить активные специфические препараты антигенов вирусов болезни Марека 1, 2 и 3 серотипов и вирусспецифических поликлональных сывороток против этих антигенов и изучить возможность их использования в непрямом варианте иммуноферментного анализа для выявления антител к вирусам болезни Марека.

Материалы и методы

Культивирование вируса болезни Марека.

В работе были использованы три серотипа вируса: штамм «3004» ВБМ, штамм СВ-1 ВГК и штамм FC-126 ВГИ.

Для культивирования вирусов использовали первично-трипсинизированные клетки куриных фибробластов 10-12 сутокных СПФ эмбрионов кур фирмы «Ломан Тирцухт ГмбХ» (Германия). Трипсинизацию тканей эмбрионов и приготовление клеточных культур проводили по методикам, разработанным в ФГУ «ВНИИЗЖ». Лабораторное культивирование клеток и вируса проводили в роллерных бутылках объёмом 3 дм³, диаметром 100 см. Для вращения использовали аппарат стеллажно-ярусного типа на 12 бутылей. Использовался принцип плавного вращения ротовой поверхности сосудов со скоростью вращения 8-12 об/час. Посевная концентрация клеток составляла от 0,7 до 1,5 млн./см³ в зависимости от цели исследования. Основной средой для культивирования вирусов БМ и клеток куриных фибробластов (КФ) была смесь равных объемов сред: 199, Игла и 0,5% гидролизата лактальбумина на солевом растворе Эрла (ГЛАЭ).

Питательные ростовые среды содержали 10%-ную инактивированную сыворотку крупного рогатого скота (КРС). К поддерживающей питательной среде добавляли 2-5% сыворотки крови КРС. Величина рН ростовой и поддерживающей сред была соответственно 6,9 и 7,2.

Температуру инкубации нормальных и зараженных клеточных культур поддерживали от 37,5°С до 38,5°С. Сроки культивирования зависели от целей работ и посевной концентрации и составляли от 24 до 120 часов.

Антигены. Для получения антигенов ВБМ инфицированную первичную культуру клеток куриных фибробластов подвергали 3-х кратному замораживанию-оттаиванию. Осаждение клеток проводили центрифугированием при 17000g в течение 25 минут. Полученный осадок клеток подвергали дополнительному замораживанию-оттаиванию для обеспечения максимального выхода вируса из клеток. Очистку и концентрирование вирусосодержащей культуральной жидкости проводили путём двукратного ультрацентрифугирования через слой 30% сахарозы при 70000g в течение 90 минут. Кратность концентрирования составляла 25-30 раз. Наличие вируса подтверждали в ПЦР, электрофорезом в 12,5% ДСН-ПААГ и иммуноблоттингом с вирусспецифической сывороткой. Полученные очищенные концентрированные препараты антигенов ВБМ были использованы для иммунизации цыплят и сенсбилизации планшетов для ИФА.

ПЦР. В работе использован мультиплексный вариант полимеразной цепной реакции (ПЦР), позволяющий выявлять одновременно все три серотипа ВБМ по методу, описанному ранее (1). Выделение суммарной ДНК проводили с помощью коммерческого набора «GENEPAK» (Биоком, Москва), согласно прилагаемой инструкции. Для амплификации использовали праймеры, комплементарные последовательности гликопротеина D. В реакции применяли как праймеры универсальные для всех серотипов (MGD2 и MGD2a), так и специфичные к определённому серотипу.

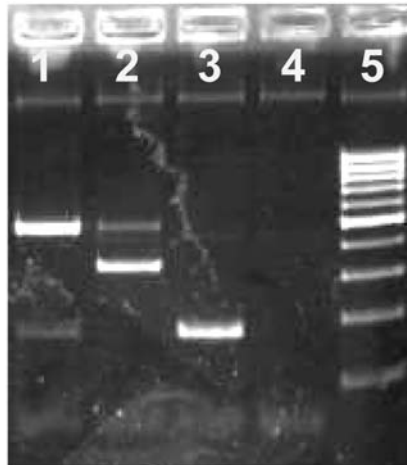
Реакционная смесь для амплификации включала в себя буфер для ПЦР, 5nM MgCl₂, 0,8mM dNTP, праймеры 10 nM MGD2 (5'-ttg-gat-ggg-acg-tag-ata-tga-tg-3'), 5 nM MGD2a (5'-ggg-aag-gcg-caa-ata-tga-tgc-3'), 10 nM MGD3 (5'-cgc-gag-aaa-tga-aac-tgg-ttg-aga-3'), 5 nM MGD4 (5'-gtc-gtc-gat-tgg-gcc-ttt-gag-3') и 2,5 nM MGD5 (5'-aga-tgt-ttc-gac-gac-gat-tgg-tag-at-3'), 5 ед. акт. Taq-ДНК-полимеразы и 5 мкл раствора суммарной ДНК. Температурный режим цикла составляет 94° С – 30 с, 60° С – 30 с и 72° С – 40 с. Останавливали реакцию после 40 цикла. Результат реакции оценивали с помощью электрофореза в 2% агароз-

ном геле с добавлением бромистого этидия. Если на электрофореграмме наблюдается полоса величиной в 200 п. н., то в исследуемой пробе присутствует ВБМ серотипа 3, если полоса величиной 300 п.н., то в пробе присутствует ВБМ серотипа 2 и если 450 п.н., то ВБМ серотипа 1.

Электрофорез в полиакриламидном геле и иммуноблоттинг. Электрофорез белков проводили в 12,5% ПААГе в течение 1 часа, как описано (8), при постоянном напряжении 200 в. Вирусные белки, разделённые в 12,5% ПААГе, переносили на нитроцеллюлозную мембрану 0,45 мкм в течение 1 часа при напряжении 100 в с использованием аппарата для иммуноблоттинга (Mini Trans-Blot Electrophoretic transfer cell, BioRad, США), согласно руководству. Мембрану инкубировали в 1% растворе бычьего сывороточного альбумина в буферном растворе ТБР с рН 7,4 (0,02М трис-НСl, 0,15М NaCl, 0,1% твин-20) (БСА-ТБР)) 1 час, затем обрабатывали в течение часа сывороткой крови кур против ВБМ, разведённой 1:50 в буфере ТБР. После инкубирования с раствором антикуриного иммуно-пероксидазного конъюгата (KPL, США) в течение 1 часа мембрану окрашивали субстратной смесью, включающей 4-cloγο-1-naphthol и 0,04% перекиси водорода. Каждый этап заканчивался отмыванием мембраны 3-4 раза в буфере ТБР.

Эксперимент на цыплятах. Для получения вирусспецифических сывороток против ВБМ были использованы безлейкозные цыплята, полученные из инкубационного яйца Щелковской биофабрики. Цыплята были разделены на 4 группы: 3 группы по 18 голов (опытные) и одна -5 голов (контрольная). Опытные цыплята были иммунизированы в 7 суточном возрасте 1, 2 и 3 серотипами ВБМ, контрольные - культуральной жидкостью не инфицированной первичной культуры клеток куриных фибробластов. Иммунизацию цыплят проводили внутримышечно, в дозе 0,2 мл/гол., с интервалом в 14 дней. В качестве адьюванта использовали неполный адьювант Фрейнда (первая иммунизация) и ИЗА-70, в соотношении 1:1 (объём/ объём).

Непрямой вариант ИФА. ИФА проводили по общепринятой схеме с небольшими модификациями. 0,5-1,0 мкг на лунку вирусного антигена в карбонатно-бикарбонатном буфере (рН 9,6) вносили в лунки 96-луночного пластикового планшета (Nunc, Immunoplate, Дания), инкубировали в течение ночи при 4° С, блокировали 10% раствором лошадиной сыворотки в трис-НСl буферном растворе с 0,1% твин-20 (ТБР-Т) рН 7,4 в течение 1 часа при комнатной температуре и затем отмывали трёхкратно ТБР-Т. Исследуемые и контрольные сыворотки разводили в ТБР-Т,



Линия 1 – культуральная жидкость, содержащая 1 серотип ВБМ
 Линия 2 – культуральная жидкость, содержащая 2 серотип ВБМ
 Линия 3 – культуральная жидкость, содержащая 3 серотип ВБМ
 Линия 4 – Отрицательный контроль
 Линия 5 – Маркер «Gene Ruler 100 bp» (Fermentas, Латвия)

Рис.1 . Электрофореграмма продуктов реакции амплификации фрагмента гена, кодирующего gD ВБМ.

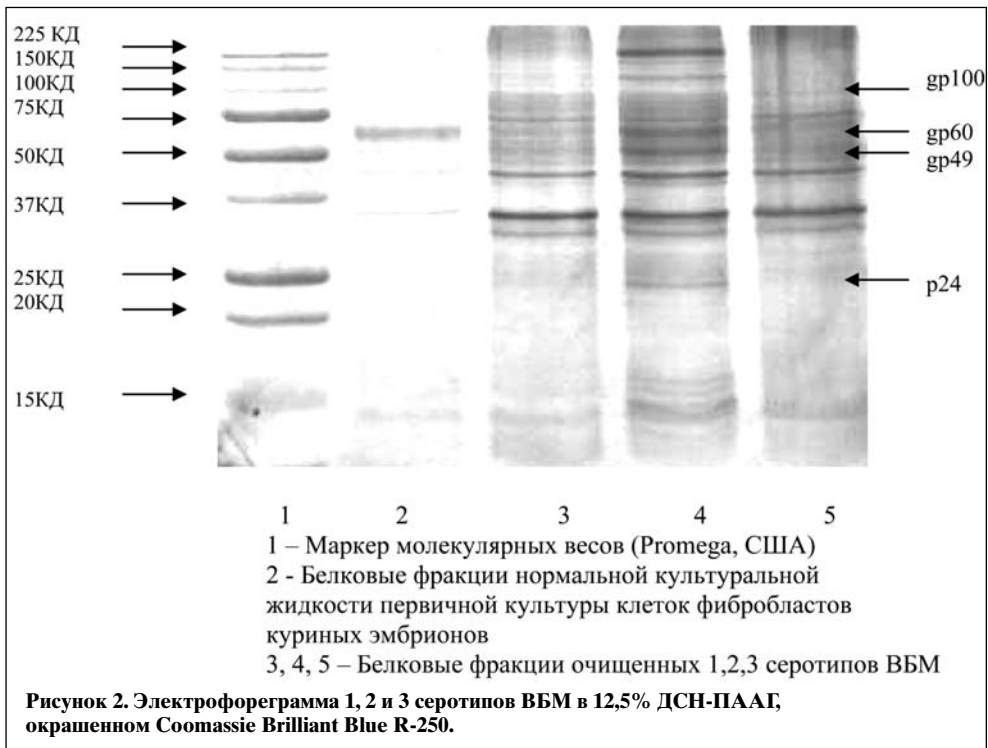


Таблица 1

Результаты определения в ИФА титров антител к ВБМ (IgG) в сыворотках крови иммунизированных цыплят

Антиген	Титр антител в ИФА*	Время после иммунизации (сутки)			
		14	28	42	56
1 серотип	Средний	825	15570 (100%)		
	Минимальный	200	400		
	Максимальный	1600	51200		
2 серотип	Средний	50	418	10763	
	Минимальный	50	100	1600	
	Максимальный	50	800	25600	
3 серотип	Средний	50	700	1308	5000
	Минимальный	50	100	200	800
	Максимальный	50	1600	3200	12800
Культура клеток	Средний	125	560		
	Минимальный	100	100		
	Максимальный	200	1600		

Примечание: * – титр-величина, обратная разведению,

** – процент положительных проб, положительным считали титр антител 400 и выше

вносили в лунки планшета с антигеном и инкубировали 30 минут при 37° С, для всех реагентов и сывороток использовали объём 100 мкл на лунку. Связавшиеся антитела определяли добавлением иммунопероксидазных препаратов анти-куриных антител против IgG (НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (Москва)), или против IgA и IgM (фирма Serotec Ltd, Англия) в рабочем разведении и планшеты инкубировали при 37° С 30

минут. После удаления не связавшегося конъюгата добавляли субстрат АБТС (40 мМ 2,2 - азино- ди(Зетил)бензтиазолинсульфоновая кислота) с 4 мМ перекиси водорода в 100 мМ цитратном буфере (рН 4,5). Через 10 минут реакцию останавливали добавлением 1% додецилсульфата натрия и измеряли значение оптической плотности при 405 нм на спектрофотометре-ридере (SLT-Spectra, Австрия).

Титр антител в пробах сывороток определяли по конечной точке методом двукратных серийных разведений, начиная с разведения 1:25 для IgA и 1:50 для IgM и IgG (отношение оптической плотности пробы к среднему значению отрицательного контроля больше или равное 2 считали положительным).

Результаты и обсуждение

Антигены вируса болезни Марека.

Очищенные и концентрированные препараты культуральной жидкости тестировали методом мультиплексной ПЦР для выявления ВБМ. В результате исследований было показано, что в пробах присутствуют соответствующие серотипы ВБМ (рис.1). Однако в первой и второй пробах реакция показала присутствие двух серотипов ВБМ. Слабые полосы специфической длины указывают на то, что в пробе 1 (культуральная жидкость, содержащая первый серотип ВБМ) наряду со штаммом «3004» присутствует вирус герпеса индеек (серотип 3 ВБМ), а в пробе 2 (культуральная жидкость, содержащая второй серотип ВБМ) вместе со штаммом SB1 присутствует ВБМ серотипа 1. Возможно, это результат контаминации препаратов, произошедший в процессе культивирования, очистки или концентрирования. Слабая интенсивность полос в пробе 1 и 2 указывает на то, что контаминант находится в пробе в низкой концентрации и при инактивации не окажет влияния на чистоту эксперимента. Также появление слабых полос может быть связано с тем, что высокая концентрация вируса в пробе приводит к перекрестному связыванию специфических праймеров, и в результате происходит амплификация с низким уровнем эффективности.

Наличие вируса в полученных препаратах подтверждали также электрофорезом вирусных белков в 12,5% ДСН-ПААГ (рис.2). Расположение полипептидов после электрофореза в 12,5% ДСН-ПААГ соответствовало данным, полученным другими авторами (6, 7, 10, 14).

Специфичность полученных препаратов антигенов ВБМ была проверена в ИФА с гетерологичными сыворотками (специфические сыворотки к вирусам инфекционного бронхита кур, инфекционной бурсальной болезни, инфекционного ларинготрахеита, инфекционного энцефаломиеелита, гриппа птиц, ньюкаслской болезни, инфекционной анемии цыплят, реовируса, микоплазматом птиц и пастереллёза птиц). Активность антигенов всех трёх серотипов ВБМ не превышала

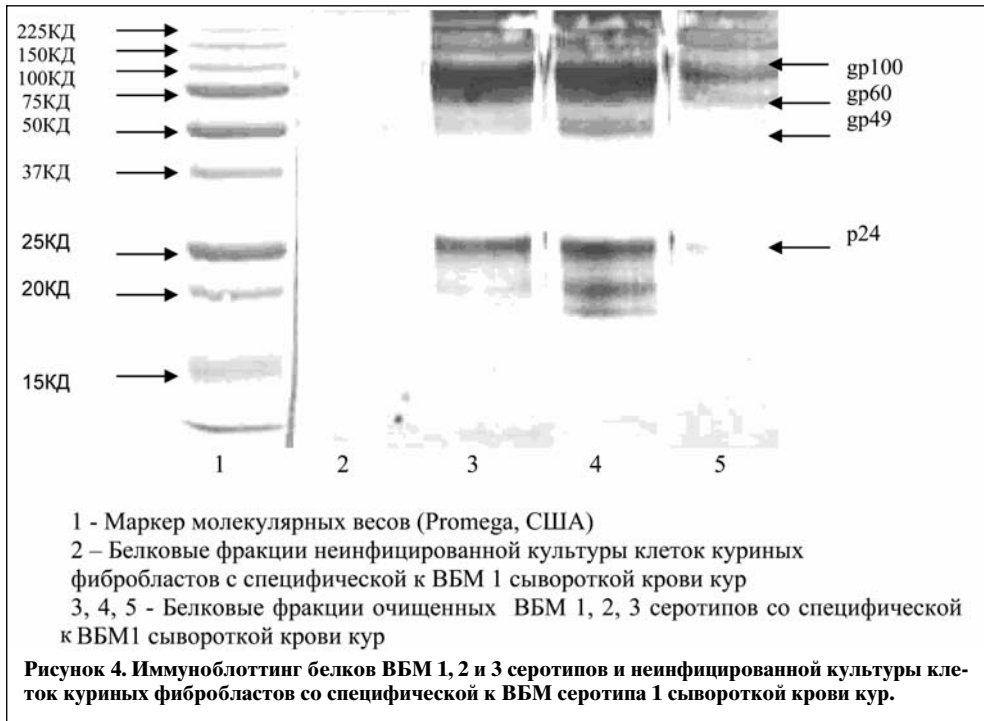
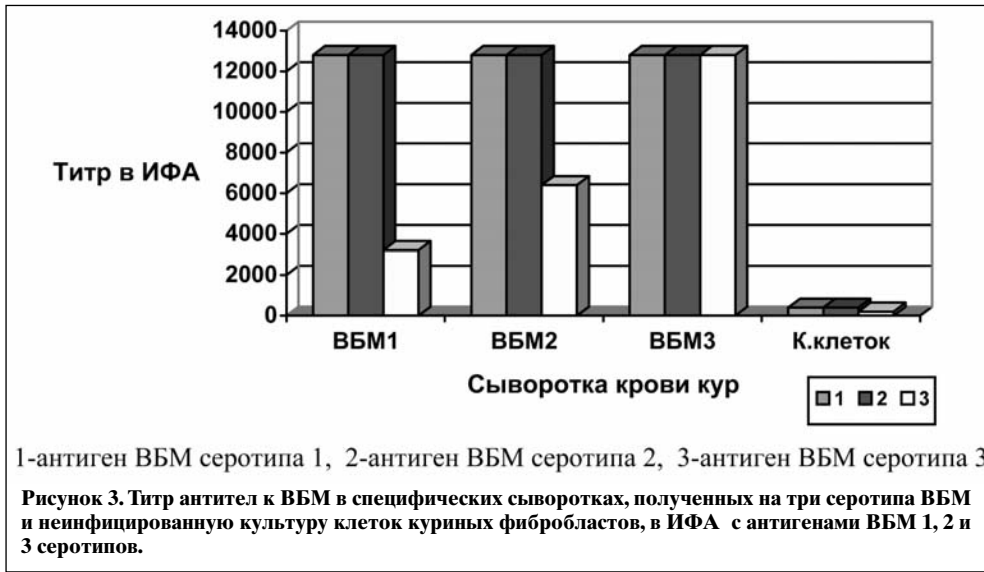
фоновый уровень (реакция с неиммунной сывороткой).

Получение вирусспецифических сывороток против ВБМ. Для получения гипериммунных сывороток против ВБМ была проведена двукратная иммунизация 1 серотипом, трёхкратная иммунизация 2 серотипом и четырёхкратная иммунизация 3 серотипом ВБМ, контрольная группа была иммунизирована двукратно культуральной жидкостью не инфицированной культуры клеток куриных фибробластов. Пробы крови отбирали после каждой иммунизации и исследовали в ИФА с гомологичным антигеном. Полученные результаты представлены в таблице 1. Выборочное исследование сывороток крови перед иммунизацией на наличие антител к ВБМ показало отрицательный результат. Как видно из таблицы 1, наиболее быстрый и сильный иммунный ответ был получен на введение антигена ВБМ 1, а самый слабый – на ВБМ 3. При исследовании сыворотки крови против штамма «Конкур», полученной из ВГНКИ, титр антител составил 1:800 на антигене 1 серотипа и 1:400, при использовании антигенов 2 и 3 серотипов.

Было проведено также исследование всех сывороток крови на наличие специфических к вирусу болезни Марека IgM и IgA. В сыворотке крови цыплят после последней иммунизации были выявлены специфические IgA: в 70% проб от цыплят, иммунизированных 1 серотипом ВБМ (ср. титр 1:100), в 60% проб при иммунизации вторым серотипом – (ср. титр – 1:150) и при иммунизации 3 серотипом – в 20% проб (ср. титр – 1:65). В сыворотке крови цыплят, иммунизированных нормальной культурой клеток, титр антител составлял 1:25-1:50 на всех антигенах. Наличие IgM после последней иммунизации было обнаружено в 80% проб сывороток крови цыплят, иммунизированных ВБМ 2 (ср. титр – 1:920), в 15% проб сывороток цыплят, иммунизированных ВБМ 1 (ср. титр 1:304) и 27% - иммунизированных ВБМ 3 (ср. титр – 1:287). Титр антител в сыворотке крови цыплят, иммунизированных нормальной культурой клеток, составлял 1:50-1:100.

Таким образом, если после последней иммунизации IgG были обнаружены в сыворотках крови всех иммунизированных цыплят, то наличие IgA и IgM установлено не во всех пробах крови, причём IgA больше выявили у цыплят, иммунизированных 1 и 2 серотипом ВБМ, а IgM - 2 серотипом.

Исследование антигенного перекрёста между тремя серотипами ВБМ. Исследо-



вания, проведённые рядом авторов, показали, что три серотипа ВБМ имеют много общих антигенных детерминант. Сыворотки, полученные на один серотип, реагировали с антигенами других серотипов, хотя и не так сильно, как с гомологичным, поэтому для определения серотипа вируса, как правило, используют типоспецифические моноклональные антитела (2, 3, 9, 11, 12).

С целью выявления антигенного перекрёста между тремя серотипами ВБМ, сы-

воротки, полученные на каждый серотип ВБМ и неинфицированную культуру клеток куриных фибробластов, были протестированы в ИФА со всеми тремя серотипами ВБМ (рис.3). При этом сыворотка крови, полученная на антиген ВБМ 3, показала одинаковое значение титра антител во всех антигенах. Сыворотки, полученные при иммунизации цыплят 1 и 2 серотипами ВБМ, имели одинаковый титр антител при исследовании на обоих этих антигенах, но в

4 и 2 раза ниже, соответственно, при тестировании с антигеном 3 серотипа.

Данные ряда исследователей показали, что в гуморальном иммунном ответе против вируса болезни Марека участвуют антигены А, В и рр38. Основным интерес представляет структурный антиген В, который состоит из комплекса трёх гликопротеинов с молекулярным весом 100, 60 и 49 кД (gp100, gp60, gp49). Этот антиген присутствует на поверхности клеток и в цитоплазме инфицированных клеток, он может вызывать нейтрализацию специфических антител. Антитела к этому антигену нейтрализуют как клеточно-свободный, так и клеточно-связанный вирус. Была отмечена разница в структуре антигена В трёх серотипов ВБМ (4, 10). Антиген А (gp57/65) был идентифицирован в надосадочной жидкости инфицированных клеточных культур, он присутствует на поверхности клеток и в цитоплазме инфицированных клеток (14). Антиген рр38 – это комплекс вирусспецифического фосфорилированного белка, который содержит полипептиды с молекулярной массой 36-39 кД и 24 кД, он идентифицирован в клетках лимфомы при болезни Марека, и его гомологи обнаружены также для ВБМ 2 и вируса герпеса индеек (6,7).

При иммуноблоттинге белков ВБМ 1, 2 и 3 серотипов и неинфицированной культуры клеток куриных фибробластов со

РЕЗЮМЕ

Получены очищенные концентрированные препараты антигенов вируса болезни Марека (ВБМ) 1, 2 и 3 серотипов. Наличие вируса подтверждено в ПЦР, электрофорезом в 12,5% ПААГЭе и иммуноблоттингом с вирусспецифической сывороткой. Получены вирусспецифические сыворотки крови кур к трём серотипам ВБМ. Изучена возможность использования антигенов и сывороток в ИФА для исследования гуморальных антител.

SUMMARY

Purify concentrated MDV antigens of 1, 2 and 3 subtypes were obtained. The presence of virus was confirmed by PSR, SDS-PAGE and Western immunoblot analysis. Specific sera against 3 MDV subtypes were obtained. Using of the antigens and sera in indirect ELISA for research of humoral antibodies was analyzed.

Литература

1. Шульпин, М.И. Выявление вируса болезни Марека трёх серотипов с помощью мультиплексной полимеразной цепной реакции/М.И. Шульпин, Е.Н. Чернышова, И.А. Чвала, В.П. Мельников и др.// 1-й Междунар. вет. конгр. по птицеводству. М., 2005. С.161-163.
2. Ярыгина, Е.И. Получение антигенов вируса болезни Марека, различающихся по перекрёстной серотипической активности/Е.И. Ярыгина, В.А. Лукина, Б.В. Соловьёв и др.//Вестник Российской академии с/х наук. 2001. №5. С.67-70.
3. Ярыгина, Е.И. Разнообразие поликлональных антител к серотипам вируса болезни Марека – один из критериев поствакцинального ответа/Е.И. Ярыгина// Доклады Российской Академии с/х наук. 2005. №5. С. 57-59.
4. Barrow, D.A. Infection of macrophages by a lymphotropic herpesvirus: a new tropism for Marek's disease virus/A.D. Barrow, S.C. Burgess, S.J. Baigent at all// Journal of General Virology. 2003. V.84. P.2635-2645.
5. Calnek, B.W. Pathogenesis of Marek's disease virus infection. Current Topics in Microbiology and Immunology. 2001. V.255. P.25-55.
6. Chen, X. Identification of a unique Marek's disease virus gene which encodes a 38-kilodalton phosphoprotein and is expressed in both lytically infected cells and latently infected lymphoblastoid tumor cells/X. Chen, P.J.A. Sondermeijer, L.F. Velicer// Journal of Virology. 1992. V.66. P.85-94.
7. Gimeno, I.M. The pp38 gene of Marek's disease virus (MDV) is necessary for cytolytic infection of B cells and maintenance of the transformed state but not for cytolytic infection of the feather follicle epithelium and horizontal spread of MDV/ I.M. Gimeno, R.L. Witter, H.D. Hunt at all// Journal of Virology. 2005. V.79. P. 4545-4549.
8. Laemmli U.K. Cleavage of structural proteins dur-

- ing the assembly of the head of the bacteriophage T4 // Nature. 1970. V. 227. P. 680-685.
9. Lee, L.F. Humoral immune responses to inactivated oil-emulsified Marek's disease vaccine/ L.F. Lee, R.L. Witter// Avian diseases. 1991. V.35. P.452-459.
 10. Nazerian, K. Protection against Marek's disease by a fowlpox virus recombinant expressing the glycoprotein B of Marek's disease virus/ K.Nazerian, L.F. Lee, N. Yanagida, R. Ogava// Journal of Virology. 1992. V.66. P.1409-1413.
 11. Schat, K.A. Immune responses to Marek's disease virus infection/K.A. Schat, C.J. Markowski-Grimsrud// Curr Top Microbiol. Immunol. 2001. V.255. P. 91-120.
 12. Silva, R.F. Monoclonal antibody-mediated immunoprecipitation of proteins from cells infected with Marek's disease virus and turkey herpesvirus. R.F. Silva, L.F. Lee //Virology. 1984. V.136. P.307-320.
 13. Tischer, B.K. DNA vaccine containing an infectious Marek's disease virus genome can confer protection against tumorigenic Marek's disease in chickens/ B.K. Tischer, D. Schumacher, M. Beer at al.//Journal of General Virology. 2002. V.22. P.2367-2376.
 14. Tischer, B.K. High-level expression of Marek's disease virus glycoprotein C is detrimental to virus growth in vitro/ B.K. Tischer, D. Schumacher, D. Chabanne-Vautherot at all.// Journal of Virology. 2005. V. 79. P.5889-5899.
 15. Zelnik, V. An Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of Marek's disease virus-specific antibodies and its application in an experimental vaccine trial/ V.Zelnik, O. Harlin, F.Fehler at al.//Journal of Veterinary Medicine Series B. 2004. V.51. P.61-67.

УДК 576.8:616-002.5

З.Г. Воробьева, М.А. Кульчицкая, К.Н. Слинниа, А.Л. Лазовская
*ГНУ Научно-исследовательский ветеринарный институт – НИВИ,
г. Нижний Новгород*

АНТАГОНИСТИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПРОБИОТИКОВ ПО ОТНОШЕНИЮ К МИКОБАКТЕРИЯМ ТУБЕРКУЛЕЗА

Широко известна эффективность применения различных пробиотиков для профилактики и коррекции дисбиозов у людей и животных, вызванных многими патогенными и условно-патогенными микроорганизмами. В процессе жизнедеятельности бактерии-пробионты вырабатывают комплекс биологически активных соединений, избирательно воздействующих на болезнетворные бактерии. Например, лизоцим резко снижает способность грамотрицательных бактерий к делению и размножению, молочная кислота замедляет их рост, перекись водорода разрушает их клеточную стенку. Бактериоцины обладают бактериостатическим действием на грамотрицательную и грамположительную флору. По силе воздействия на негативную кишечную микрофлору, а также на микрофлору влагалища препараты из живых бактерий могут быть альтернативой антибиотикам. Дополнительным механизмом, усиливающим защитные свойства пробиотиков, является обмен сигнальными молекулами с иммунокомпетентными клетками слизистых оболочек, стимулирующий продукцию секреторного иммуноглобулина А, комплемента, лизоцима и блокирующий прикрепление патогенных бактерий к поверхности слизистой (1,3,4).

В ветеринарии назрела необходимость применения пробиотиков с антагонистическими свойствами против микобактерий туберкулеза в связи с тем, что молодняк скота обычно заражается туберкулезом алиментарным путем в первые дни жизни.

В литературе хорошо освещены различные методы изучения антагонистического действия пробиотиков на различные бактериальные патогены. Чаще всего культуры засевают на чашки Петри с питательным агаром перпендикулярными штрихами или перекрещивающимися каплями. Существенно отличаются и критерии оценки полученных результатов, но чаще всего о степени антагонистической активности бактерий судят по величине зоны задержки роста индикаторных микробов. Значительно реже оценивается количество индикаторных бактерий (КОЕ), на которое представители пробиотиков оказывают ингибирующее действие. Поэтому данные, получаемые различными авторами при изучении микробного антагонизма не всегда однозначны (2).

Трудность изучения антагонизма пробиотиков и патогенных микобактерий заключается в особенностях биологии этих видов: очень медленный рост и особые требования к средам затрудняют их одновременное выращивание.