

УДК 619:616.98:579.861.2

ТАРАСОВ О.А. канд. вет. наук, e-mail: Pharmwork@ukr.net

САПЕЙКО В.П. канд. вет. наук, e-mail: Pharmwork@ukr.net

БАБКІНА М.М., e-mail: Pharmwork@ukr.net

Інститут ветеринарної медицини НААН

ПІНЧУК Н.Г. канд. вет. наук, e-mail: Pharmwork@ukr.net

Державний науково-контрольний інститут біотехнології і штамів мікроорганізмів

## ВИВЧЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ АНТИГЕНІВ ЗБУДНИКА БЕШИХИ СВИНЕЙ

В статті наведено інформацію щодо вивчення антигенів та специфічних сироваток на антигени з молекулярною вагою 300, 250, 65–67, 40–47, 25 та 12 кДа, а також на цільноклітинний антиген вакцинних штамів і патогенних польових ізолятів збудника бешихи свиней. Найвища активність сироваток, отриманих на вакцинні штами та комерційні вакцини проти бешихи свиней зафіксована при використанні лужних екстрактів антигенів у відношенні до 65–67 кДа та 40–47 кДа антигенів. В серологічних тестах підтверджена антигенна специфічність загальноклітинного білка збудника бешихи.

**Ключові слова:** *Erysipelothrix rhusiopathiae*, протеїн, імуноферментний аналіз, антиген.

**Вступ.** Бешиха свиней спричиняє значні збитки в Україні, країнах ЄС та інших країнах світу. Питання вивчення особливостей антигенного складу збудника бешихи, формування специфічного імунітету та його напруженості на сьогодні не втрачає актуальності, оскільки мінливість антигенного складу має прямий вплив на ефективність профілактичних щеплень [1–9, 12, 14, 15].

Вперше протективний білок *E. rhusiopathiae* масою 65–67 кДа був виділений та описаний Makino *et al.* у 1998 році [11]. Цей протеїн отримав назву «*surface protective antigen A*» (SPAA) після того, як численні дослідження на лабораторних тваринах підтвердили, що саме він є протективним та повністю захищає мишей при зараженні культурою патогенних штамів різних серологічних груп. За вивчення гена SPAA було встановлено можливість варіювання с-термінальної ділянки молекули відповідного білка, в той час як фрагмент розміром від 266 до 1294 н.п. був консервативним у всіх досліджених штамів та ізолятів (Shimoji *et al.*) [13]. Також цими дослідниками було встановлено, що найбільшу важливість з точки зору утворення протективних антитіл має N-термінальний регіон та його епітопи [11, 13].

Дослідження зарубіжних авторів [4, 6, 7, 9, 13, 16] із використанням рекомбінантного та нативного білків SPAA виявили значно більшу активність нативного білка, що пояснюється недосконалим рефолдингом та процесом очищення цільового продукту. Це може ускладнювати виробництво рекомбінантної вакцини, оскільки активність препарату може значно варіювати в залежності від якості очищення та повноти рефолдингу.

Останнім часом То Н. та Nagai S. доповіли [7] про результати досліджень генетичної та антигенної різноманітності серед штамів *E. rhusiopathiae* гену *SPAА*, що робить важливим дослідження нових ізолятів, які можуть мати значні відмінності в цьому гені і, відповідно, ефективність імунопрофілактики може бути недостатньою або незадовільною.

Таким чином, дослідження особливостей гену *SPAА* та антигенної варіабельності вакцинних штамів та патогенних польових ізолятів дозволить контролювати ефективність сучасних засобів специфічної профілактики бешихи свиней та прогнозувати зміни в популяції збудника бешихи для своєчасного удосконалення вакцинних препаратів.

**Мета роботи.** Вивчити активність сироваток, отриманих на вакцинні штами та комерційні вакцини проти бешихи свиней у відношенні до антигенів молекулярною вагою 300, 250, 65–67, 40–47, 25 та 12 кДа та у серологічних тестах дослідити специфічність основних білкових антигенів збудника бешихи.

**Матеріали та методи досліджень.** В роботі були використані штами бактерії *Erysipelothrix rhusiopathiae*, що зберігаються та підтримуються в Інституті ветеринарної медицини: штами М-2 ВК, ВР-2, 149, «К», два патогенні польові ізоляти.

Досліджувані мікроорганізми культивували у м'ясопептонному бульйоні Хоттінгера з вмістом (%): пептону – 0,5; натрію хлориду – 0,2; калію фосфорнокислого однозаміщеного – 0,3; натрію фосфорнокислого двозаміщеного – 2; детергенту Tween-80 – 0,05; сироватки крові великої рогатої худоби, коней або овець – 8–10; глюкози – 0,4; амінного азоту 180 – 200 мг %. Значення рН поживного середовища складало 7,4–7,6.

Для проведення досліджень та отримання специфічних сироваток використовувались комерційні вакцинні препарати, зареєстровані в Україні: «Erylisyn Single Shot» (Bioveta), «Емульсин-вакцина проти бешихи свиней інактивована» (ІВМ НААН). Препарати застосовували згідно листівки-вкладки.

Поверхневі антигени були отримані шляхом центрифугування добової культури за 4,000 x g протягом 5 хвилин для осадження клітин. Супернатант декантували, стерильно фільтрували через фільтр із діаметром пор 0,22 мкм. Клітини дворазово промивали стерильним буфером (рН 7.6), який містив 0,5% детергенту та інкубували при струшуванні протягом 60 хвилин за 37,2±0,3°C. Після чого зразки центрифугували за 5000 x g протягом 5 хвилин. Супернатант містив поверхневі антигени, які використовували в подальших дослідженнях.

Білковий склад отриманих антигенів визначали шляхом проведення електрофорезу в поліакриламідному гелі за методом U.K. Laemmli (1970) [10], специфічність – з позитивними і негативними сироватками крові тварин в РДП та ІФА за стандартною методикою.

Стандартний метод визначення білка за Бредфордом [5] був використаний для визначення загальної кількості протеїну в зразках. Аліквоти кожного зразка розводили до концентрації білка 3,0 г/л загальноклітинного білка.

Всі сироватки були підтитровані для визначення активності із застосуванням лізату цільноклітинного антигену, отриманого із музейних та вакцинних штамів збудника бешихи свиней. Антиген був підготовлений у вигляді бактерину та лужного екстракту антигену (із використанням 5% розчину натрію гідроокису). Для отримання екстрактів також застосовувались детергенти (ЕДТА). Використовували антиген, отриманий з культурального супернатанту всіх досліджуваних штамів та ізолятів. Протеїнові фракції були розділені в білковому ПААГ електрофорезі за стандартним протоколом. Фракціоновані білки були використані для вивчення антигенної та протективної активності.

Для отримання гіперімунної сироватки крові мишей імунізували суспензією живих бактерій *E. rhusiopathiae*. Підшкірно, в ділянці спини, тваринам вводили суспензію, що містила  $2,5 \times 10^6$  мікробних клітин із додаванням ад'юванту Montanide ISA 25 (Seppic) до 20% від об'єму, в дозі  $0,5 \text{ см}^3$ . Повторну імунізацію проводили через 14 днів у тій же дозі. Через 21 добу після останнього щеплення тваринам вводили суспензію живих бактерій в кількості  $5 \times 10^6$  КУО в дозі  $1 \text{ см}^3$ .

Для отримання імунних сироваток використовували комерційні вакцини Porcilis Ery (MSD Animal Health), «Erylisyn Single Shot» (Bioveta), «Емульсин-вакцина проти бешихи свиней інактивована» (ІВМ НААН).

Сироватку отримували з крові з серця, яку відбирали на 20-ий день після останнього введення антигену.

**Результати досліджень та їх обговорення.** Для отримання ультразвукового гомогенату суміші антигенів культури вакцинних штамів та патогенних контрольних штамів, а також польових ізолятів нами був визначений оптимальний режим отримання гомогенату – 15 циклів по 10 секунд на лабораторному дезинтеграторі УЗДН-10.

Фракціоновані білки в хроматографічних фракціях розподілялись за порядком збільшення об'ємів елюції ( $V_e$ ) та зменшення молекулярної маси білків.

Основна маса білків була в першому та другому піках (17,4% і 16%), який представляв собою велико молекулярні фракції, із молекулярною масою 300 кДа і 250 кДа. До 15% білка з м. м. 65 кДа виходило в четвертому піку, 5% білка з м. м. 125 кДа виходило в третьому піку та 3% білка з м. м. 25 кДа виходило в п'ятому піку. В наступних дослідах УЗ-гомогенат був використаний для щеплення мишей та в якості антигену для постановки серологічних реакцій.

В результаті фракціонування лужного гідролізату було отримано два пика – один слабо виражений, елюював із колонки на об'ємі  $55 \pm 6 \text{ см}^3$ , складався з крупномолекулярних білків з м. м. 300 і 250 кДа. Другий, гострий та високий пик, що виходив з колонки в об'ємі  $105 \pm 2 \text{ см}^3$ , був представлений низькомолекулярним білком з м. м. 65–67 кДа. Відсотковий вихід білків в першому піку складав 7,2% від нанесеного в колонку препарату та 58% – у другому піку.

При порівняльному мікроскопічному дослідженні пофарбованих за Грамом препаратів з осаду культури, що підлягала лужному гідролізу та мазків з вихідної культури була встановлена ідентична картина: прямі грампозитивні палички, характерні для бешихи свиней.

Відсутність видимого порушення цілісності мікробних клітин, що були оброблені розчином луку є свідомством того, що при застосуванні даного методу можна отримати поверхневі білки, одним з яких є основний протективний антиген.

За лужного гідролізу крупномолекулярні білки екстрагуються в незначній кількості. В процесі гідролізу основна маса крупномолекулярних білків розкладається на низькомолекулярні і, саме головне, значну кількість елюату представляє білок з м.м. 65–67 кДа, який є основним протективним.

В результаті проведених досліджень встановлено, що запропоновані методи дозволяють отримати екстракти антигенів, які можуть бути фракціонованими з виділенням білкових антигенів з різною молекулярною вагою. Зведені дані представлені в таблицях 1 та 2.

Таблиця 1

**Результати вивчення залежності виходу білка (мг) на один млрд. КУО за різних методів отримання гідролізату (культура бактерій бешихи вакцинного штаму М-2 ВК)**

№ п/п	Метод дезінтеграції	Отриманий препарат	Конц. клітин (млрд/см <sup>3</sup> )	V (см <sup>3</sup> )	Вихід білка (мг/см <sup>3</sup> )	Вихід білка (мг на 1 млрд. клітин)
1	Фізико-механічний (ультразвуковий)	УЗ-гомогенат	4	30	2,4	0,6
2	Хімічний (лужний гідроліз)	Гідролізат	40	10	2,5	0,06

Аналіз результатів таблиці 3 свідчить про те, що білковий антиген з м.м. 250 кДа, розведений 1:1024 (до вмісту білка в пробі 1,17 мкг/мл) реагує з специфічними сироваткою з достовірним значенням одиниць оптичної густини – 0,832. Для білкового антигену з м.м. 65–67 кДа позитивний показник виявлено за ще більш високого розведення – 1:2048, в якому вміст білка складає всього 0,59 мкг/см<sup>3</sup>. З представленого матеріалу також можна зробити висновок, що з підвищенням ступеня чистоти сорбованого антигену в певних межах підвищується й ефективність аналізу.

Таким чином, підбір оптимальної сенсibiliзуючої дози на лунку мікропланшет дозволив встановити, що максимальна інтенсивність ІФА реєструвалась при застосуванні антигену в концентрації 5–10 мкг/см<sup>3</sup>, яка формувала високий рівень оптичної густини та достовірну різницю результатів між позитивними та негативними сироватками.

Таблиця 2

**Результати вивчення залежності отримання білків певної молекулярної маси від вихідного екстракту, що фракціонується гель-фільтрацією на хроматографічній колонці**

№	Препарат	Кількість білку (мг)	Вихід білку													
			300 кДа		250 кДа		64-67 кДа		25 кДа		12 кДа		<12 кДа		Загальний вихід білку	
			%	мг	%	мг	%	мг	%	мг	%	мг	%	мг	%	мг
1	УЗ-гомогенат	7,2	17,4	1,25	16	1,15	15	0,96	5	0,36	3	0,22	0	0	56,9	4,1
2	Гідролізат	7,5	7,2	0,54	0	0	58	4,35	0	0	0	0	0	0	65,2	4,89

Таблиця 3

**Вивчення серологічної активності в ІФА білків з м. м. 250 та 65–67 кДа в залежності від сенсibilізуючої дози, n=3**

Розведення антигена	Концентрація білка на твердій фазі (мкг/см <sup>3</sup> ) білка	Імунна сироватка		Негативний контроль
		250кДа	65-67 кДа	
		оптична густина при $\lambda=492$ нм, од.	оптична густина при $\lambda=492$ нм, од.	
1:128	9,40 $\pm$ 0,30	1,436 $\pm$ 0,115*	1,684 $\pm$ 0,240*	0,420 $\pm$ 0,010
1:256	4,70 $\pm$ 0,20	1,200 $\pm$ 0,180*	1,440 $\pm$ 0,120*	0,411 $\pm$ 0,030
1:512	2,34 $\pm$ 0,10	0,987 $\pm$ 0,110*	1,170 $\pm$ 0,098*	0,395 $\pm$ 0,025
1:1024	1,17 $\pm$ 0,11	0,832 $\pm$ 0,098*	0,984 $\pm$ 0,078*	0,358 $\pm$ 0,027
1:2048	0,59 $\pm$ 0,09	0,691 $\pm$ 0,079*	0,817 $\pm$ 0,110*	0,330 $\pm$ 0,048
1:4096	0,30 $\pm$ 0,08	0,563 $\pm$ 0,032*	0,686 $\pm$ 0,050*	0,210 $\pm$ 0,075

**Примітка:** В якості антигену використана сироватка в розведенні 1:100

\*-  $p < 0.05$  у відношенні до негативного контролю

Згідно даних, викладених в таблиці 4, нами було встановлено, що максимальну активність сироватка мишей, отримана на цільноклітинний антиген, проявляла у відношенні до білків з м. м. 300 кДа (титр  $8,3 \pm 0,3 \log_2$ ), 250 кДа (титри  $8,7 \pm 0,4 \log_2$ ), 65 кДа (титр  $8,7 \pm 0,3 \log_2$ ). Найменша активність

виявлена при реакції з білком з м. м. 12 кДа (титр  $6,7 \pm 0,2 \log_2$ ) та 25 кДа (титр  $5,0 \pm 0,2 \log_2$ ).

Таблиця 4

**Результати вивчення сироваток мишей, отриманих на білкові антигени будника бешихи свиней в ІФА,  $M \pm m$ ,  $n=3$**

Білковий антиген, м. м. (кДа)	Сироватка мишей, отримана на цільноклітинний антиген (зворотні титри $\log_2$ )	Сироватка отримана на білок з м. м., кДа (зворотні титри $\log_2$ )				
		300	250	65	25	12
300	$8,3 \pm 0,3$	$10,7 \pm 0,3$	$5,7 \pm 0,3$	0	0	0
250	$8,7 \pm 0,4$	$7,2 \pm 0,2$	$5,3 \pm 0,2$	0	0	0
65 - 67	$8,7 \pm 0,3$	0	0	$11,7 \pm 0,2$	0	0
25	$5,0 \pm 0,2$	0	0	0	$10,5 \pm 0,1$	0
12	$6,7 \pm 0,2$	0	0	0	0	$9,7 \pm 0,3$

Щодо сироваток, отриманих на білки з м. м. 300, 250, 65, 25 та 12 кДа, то вони активно реагували лише з гомологічними білками. Так, сироватка мишей, отримана на білок з м. м. 12 кДа, реагувала лише з білком м. м. 12 кДа у титрах  $9,7 \pm 0,3 \log_2$ , сироватка мишей до білку з м. м. 25 кДа реагувала лише з білком м. м. 25 кДа у титрах  $10,5 \pm 0,1 \log_2$ , а сироватка мишей до білка з м. м. 65 кДа реагувала лише з білком з м. м. 65 кДа у титрах  $11,7 \pm 0,2 \log_2$ .

На наступному етапі ми провели порівняння цифрових показників титрування сироватки, отриманої на штам М-2 ВК, якій є вакцинним, та сироватки мишей, отриманих на введення цільноклітинного антигену патогенних польових ізолятів і контрольних штамів. Результати представлені в табл. 5.

За отриманими результатами можна зробити заключення, що досліджені сироватки, отримані на виробничий штам М-2 ВК та патогенні контрольні штами 149 та К, а також патогенні польові ізоляти 1 та 2 реагували в РА, РДП та ІФА з одним та тим же набором антигенів, з високою активністю та специфічністю, що свідчить про збереженні імунологічних та протективних властивостей штаму М-2 ВК та ефективності в складі вакцини.

Таким чином, при імунізації мишей цільноклітинним антигеном збудника бешихи свиней, ультразвуковим гомогенатом та лужним гідролізатом, білками з м.м. 300, 250, 65, 25 та 12 кДа були отримані специфічні сироватки, які активно реагували в РДП та ІФА. Всі вказані білки індують утворення в організмі мишей специфічні антитіла, але максимальна їх концентрація спостерігається лише при введенні цільноклітинного антигену.

Таблиця 5

**Результати вивчення серологічної активності сироватки, отриманої на штаб М-2 ВК, якій є вакцинним та сироватки мишей, отриманих на введення цілюноклітинного антигену патогенних польових ізолятів і контрольних штабів,  $M \pm m$ ,  $n=3$**

Сироватка	Серологічні реакції з цілюноклітинним антигеном та окремими білками збудника бешихи свиней (зворотні титри, $\log_2$ )										
	РА з цілюноклітинним антигеном	РДП з білками м.м.					ІФА з білками м.м. (кДа)				
		300	250	50	25	12	300	250	50	25	12
штаб М-2 ВК	$13,3 \pm 0,2$	0	0	0	$5,2 \pm 0,2$	$5,0 \pm 0,3$	$10,3 \pm 0,2$	$13,7 \pm 0,3$	$9,6 \pm 0,2$	$7,3 \pm 0,3$	$4,5 \pm 0,1$
штаб 149	$10,9 \pm 0,6$	0	0	0	$6,3 \pm 0,2$	$4,5 \pm 0,2$	$11,7 \pm 0,3$	$10,4 \pm 0,2$	$7,4 \pm 0,5$	$6,8 \pm 0,1$	$6,5 \pm 0,5$
штаб К	$12,3 \pm 0,4$	0	0	0	$5,8 \pm 0,2$	$5,3 \pm 0,3$	$10,8 \pm 0,4$	$11,9 \pm 0,4$	$6,5 \pm 0,1$	$7,9 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,2$
ізолят 1	$11,0 \pm 0,32$	0	0	0	$7,2 \pm 0,2$	$5,1 \pm 0,3$	$9,4 \pm 0,1$	$13,1 \pm 0,3$	$9,3 \pm 0,2$	$8,3 \pm 0,3$	$6,9 \pm 0,3$
ізолят 2	$10,3 \pm 0,2$	0	0	0	$6,5 \pm 0,1$	$3,5 \pm 0,2$	$8,9 \pm 0,3$	$11,5 \pm 0,1$	$7,7 \pm 0,6$	$7,0 \pm 0,4$	$7,1 \pm 0,4$
Негативний контроль	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Також виявлено найвищу реактивність сироваток у відношенні до антигенів молекулярною вагою 65–67 кДа та значно нижчу активність у відношенні до антигенів вагою 200 кДа, 45–50 кДа та 25 кДа. При цьому найвища активність сироваток, отриманих на вакцинні штаби та комерційні вакцини проти бешихи свиней зафіксована при використанні лужних екстрактів антигенів. При застосуванні лужних екстрактів була зареєстрована висока активність сироваток у відношенні до 65–67 кДа та 45–50 кДа антигенів. Гіперімунні сироватки та сироватки від тварин, імунізованих вакцинними штабами та комерційними вакцинами, реагували з білками молекулярною вагою 94–92 кДа, 65–67 кДа, 39–40 кДа та 12–24 кДа.

#### **Висновки та перспективи подальших досліджень:**

1. За імунізації мишей цілюноклітинний антигеном збудника бешихи свиней, ультразвуковим гомогенатом та лужним гідролізатом, білками з м.м. 300, 250, 65, 25 та 12 кДа були отримані специфічні сироватки, які активно реагували в РДП та ІФА.

2. Встановлено, що сироватка мишей, отримана на цілюноклітинний антиген, проявляла максимальну активність у відношенні до білків з м. м. 300 кДа (титр  $8,3 \pm 0,3 \log_2$ ), 250 кДа (титри  $8,7 \pm 0,4 \log_2$ ) та 65–67 кДа

(титр  $8,7 \pm 0,3 \log_2$ ). Найменша активність виявлена при реакції з білком з м. м. 12 кДа (титр  $6,7 \pm 0,2 \log_2$ ) та 25 кДа (титр  $5,0 \pm 0,2 \log_2$ ).

3. Досліджені сироватки, отримані на вакцинний штам М-2 ВК та патогенні контрольні штами 149 та К, а також патогенні польові ізоляти, реагували в РДП та ІФА з одним та тим же набором антигенів, з високою активністю та специфічністю, що свідчить про збереження імунологічних та протективних властивостей штаму М-2 ВК в складі вакцини.

Проведені дослідження будуть використані для створення нових засобів специфічної профілактики захворювання свиней на бешиху та удосконалення існуючих.

### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Воронин Е.С. Рожа свиней: профилактика и меры борьбы / Е.С. Воронин, М.В. Романова. – М.: ННИИТЭагропром, 1987. – 44 с.
2. Ображей А.Ф. Аналіз поліморфізму гена білка SPAA *Erysipelothrix rhusiopathiae* / Ображей А.Ф., Дерябін О.М., Тарасов О.А. // Ветеринарна медицина, 2007. – № 88. – С. 161–166.
3. Ображей А.Ф. Вивчення антигенних властивостей *Erysipelothrix rhusiopathiae* різних штамів / Ображей А.Ф., Тарасов О.А., Дерябін О.М. // Наук. вісник ЛНАВМ імені С.З. Гжицького, Львів, 2007. – Том 9, № 1 (32). – С. 114–119.
4. Bender J.S. Characterization of *Erysipelotrix* Species Isolates from clinically affected pigs, environmental samples, and vaccine strains from six recent swine *Erysipelas* outbreaks in United States / Bender J.S., Shen H.G., Irwin C.K. // Clinical and vaccine immunology. – 2010. – Vol.17 – P. 1605–1611.
5. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding / Bradford M.M. // Analyt.biochemistry, 1976. – T.72 – P. 248–254.
6. Galan J.E. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae* / Galan J.E., Timoney J.F. // Infect. Immun., 1990. – Vol. 58, № 9. – P. 3116–3121.
7. Ho To. Genetic and Antigen Diversity of the Surface Protective Antigen Proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae* / Ho To, Hagai S. // Clinical and Vaccine Immunology, 2007. – Vol.14, № 7. – P. 813–820.
8. Imada Y. Truncated surface protective antigen (SPAA) of *Erysipelothrix rhusiopathiae* serotype 1a elicits protection against challenge with serotypes 1a and 2b in pigs / Imada Y., Goji N., Ishikawa H. // Infect. Immun., 1999. – Vol. 67, № 9. – P. 4376–4382.
9. Kitajima T. Quantitative diversity of 67 kDa protective antigen among serovar 2 strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae* and its implication in protective immune response / Kitajima T., Oishi E., Amimoto K. // J. Vet. Med. Sci., 2000. – Vol. 62, № 10. – P. 1073–1077.
10. Laemmli U.K. Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. / Laemmli U.K. // Nature, 1970. – V.227, N. 4 – P. 680.
11. Makino S.I. Surface antigen, SPAA, of *Erysipelothrix rhusiopathiae* binds to Gram-positive bacterial cell surfaces / Makino S.I., Yamamoto K., Asakura H. // FEMS Microbiol. Lett., 2000. – Vol. 186, № 2. – P. 313–317.
12. Sato H. Isolation and purification of a protective protein antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae* / Sato H., Miyazaki H., Sakakura H. // Zen. Fur Vet. Reihe B., 1999. – Vol. 46, № 2. – P. 73–84.
13. Shimoji Y. Immunological characterization of a protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: identification of the region responsible for protective immunity / Shimoji Y., Mori Y., Fischetti V.A. // Infect. Immun., 1999. – Vol. 67, № 4. – P. 1646–1651.
14. Umana E. *Erysipelothrix rhusiopathiae*: an unusual pathogen of infective endocarditis /



E. Umana // Int. J. Cardiol. – 2003. – Vol. 88. – № 2–3. – P. 297–299.

15. Wood R.L. Erysipelas / In Diseases of swine 8th ed. / Wood R.L., Straw S. D'Allaire W.L. // Iowa State University Press, Ames, 1999. – P. 419–430.

16. Yamazaki Y. Protective activity of the purified protein antigen of Erysipelothrix rhusiopathiae in pigs / Yamazaki Y., Sato H., Sakakura H. // Zen. fur Vet. Reihe B., 1999. – Vol. 46, № 1. – P. 47–55.

# **ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ АНТИГЕНОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ РОЖИ СВИНЕЙ / Тарасов А.А., Сапайко В.П., Бабкина М.М., Пинчук Н.Г.**

*В статье приведена информация по изучению антигенов и специфических сывороток на антигены с молекулярной массой 300, 250, 65–67, 40–45, 25 та 12 кДа, а также на цельноклеточный антиген вакцинных штаммов и патогенных изолятов возбудителя рожки свиней. Наивысшая активность сывороток, полученных на вакцинные штаммы и коммерческие вакцины против рожки свиней зафиксирована при использовании щелочных экстрактов антигенов в отношении к 65–67 кДа и 40–45 кДа антигенов. В серологических тестах подтверждена антигенная специфичность общеклеточного белка возбудителя рожки свиней.*

**Ключевые слова:** Erysipelothrix rhusiopathiae, протеин, иммуноферментный анализ, антиген

# **INVESTIGATION OF SWINE ERYSIPELAS CAUSATIVE AGENT ANTIGENIC PECULIARITIES / Tarasov O., Sapeiko V., Babkina M., Pinchuk N.**

**Introduction.** Swine erysipelas causes significant losses in Ukraine, the EU and other countries. The study of the antigenic characteristics of the causative agent of erysipelas, the formation of specific immunity and its intensity today does not lose relevance because of antigenic variability that has a direct impact on the effectiveness of preventive vaccination.

**Goal of study.** To investigate the activity of sera obtained using vaccine strains and the vaccine against swine erysipelas to the antigens of 300, 250, 65–67, 40–45, 25 and 12 kDa. To investigate the protein antigenic specificity of whole cell antigen of erysipelas causative agent using serological tests as well.

**Materials and methods of research.** Surface antigens were obtained by centrifugation of culture at 4,000 x g for 5 minutes to precipitate the cells. The supernatant was decanted, filtered aseptically through a filter with 0.22 microns diameter of pore. The cells were washed twice with sterile buffer (pH 7.6) containing 0.5% detergent and incubated with shaking for 60 minutes at 37.2±0.3°C. Then the samples were centrifuged at 5000 x g for 5 minutes. The supernatant containing the surface antigens was used in further studies.

The protein composition of antigens were determined by polyacrylamide gel electrophoresis using proposed by U.K. Laemmli (1970), specificity of antigen was confirmed by immunoblot with positive and negative sera by standard protocol.

The evaluation of protein quantities was performed using Bradford standard method.

Sera were obtained by standard protocols.

**Results of research and discussion.** The antigen specific serum with molecular weight of 300, 250, 65–67, 40–45, 25 and 12 kDa, as well as whole cell antigen of vaccine strains and field isolates of the E. rhusiopathiae was obtained. The highest activity of sera obtained using alkaline extract of antigens especially to the 65–67 kDa and 40–45 kDa antigens. In serological tests it was confirmed the antigenic specificity of whole cell antigen.

Established that the maximum activity of mice serum obtained to protein with molecular weight 250 kDa (8.7±0.4 log<sub>2</sub>), 65 kDa (8.7±0.3 log<sub>2</sub>), 300 kDa (8.3±0.3 log<sub>2</sub>). The lowest activity was detected using the protein with molecular weight 12 kDa (titer 6.7±0.2 log<sub>2</sub>) and 25 kDa (titer 5.0±0.2 log<sub>2</sub>).

For immunization of mice it was used the whole cell antigen of swine erysipelas causative agent prepared in the form of ultrasonic homogenate and alkaline hydrolysate. The proteins of 300, 250, 65–67, 25 and 12 kDa were the most active antigens in specific mice serum that actively respond to ELISA with whole cell antigen. All these proteins induce agglutinating antibodies production in mice.

The results of the study could be used for improving vaccines for swine erysipelas control.

**Conclusion.** It was investigate the activity of serum obtained with vaccine strains and the commercially available vaccines against swine erysipelas to the antigens of 300, 250, 65–67, 40-45, 25 and 12 kDa. The maximum activity of mice serum obtained to protein with molecular weight 250 kDa ( $8.7 \pm 0.4 \log_2$ ), 65 kDa ( $8.7 \pm 0.3 \log_2$ ), 300 kDa ( $8.3 \pm 0.3 \log_2$ ). The lowest activity was detected using the protein with molecular weight 12 kDa (titer  $6.7 \pm 0.2 \log_2$ ) and 25 kDa (titer  $5.0 \pm 0.2 \log_2$ ).

**Keywords:** *Erysipelothrix rhusiopathiae*, protein, ELISA, antigen

## REFERENCES

1. Voronin, E.C. & Romanova, M.V. (1987). Roga swiney. Profilaktika I meri borbi [Swine erysipelas. Prophylaxis and control]. Moskow: NNITAgroprom [in Russian].
2. Obrazhey, A.F., Deriabin O.M., & Tarasov, O.A. (2007). Analiz polomorfizmu gena bilka SpaA *Erysipelothrix rhusiopathiae* [Analysis of polymorphism of SpaA protein of *Erysipelothrix rhusiopathiae*]. *Veterynarna medycyna – Veterinary medicine*, 88, 161-166 [in Ukrainian].
3. Obrazhey, A.F., Deriabin, O.M., & Tarasov, O.A. (2007). Vivchennia antigennih vlastivostey *Erysipelothrix rhusiopathiae* riznih shtamiv [Investigation of antigenic properties of different strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae*]. *Naukovyj visnyk LNUVMBT imeni S.Z. G'zhyc'kogo – Scientific Bulletin of the LNUVMBT named after S.Z. Gzitskyi*, Vol 9, 1 (32), 114-119 [in Ukrainian].
4. Bender, J.S., Shen, H.G., & Irwin C.K. (2010). Characterization of *Erysipelotrix* Species Isolates from clinically affected pigs, environmental samples, and vaccine strains from six recent swine Erysipelas outbreaks in United States. *Clinical and vaccine immunology*, Vol.17, 1605–1611.
5. Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. biochemistry*, Vol.72, 248-254.
6. Galan, J.E., & Timoney, J.F. (1990). Cloning and expression in *Escherichia coli* of a protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Infect. Immun.*, Vol. 58, 9, 3116-3121.
7. Ho, To, & Hagai, S. (2007). Genetic and Antigen Diversity of the Surface Protective Antigen Proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Clinical and Vaccine Immunology*, Vol.14, 7, 813-820.
8. Imada, Y., Goji, N., & Ishikawa, H. (1999). Truncated surface protective antigen (SpaA) of *Erysipelothrix rhusiopathiae* serotype 1a elicits protection against challenge with serotypes 1a and 2b in pigs. *Infect. Immun.*, Vol. 67, 9, 4376–4382.
9. Kitajima, T., Oishi E., & Amimoto, K. (2000). Quantitative diversity of 67 kDa protective antigen among serovar 2 strains of *Erysipelothrix rhusiopathiae* and its implication in protective immune response, *J. Vet. Med. Sci*, Vol. 62, 10, 1073-1077.
10. Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of Structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, V. 227 (4), 680.
11. Makino, S.I., Yamamoto, K., & Asakura, H. (2000). Surface antigen SpaA of *Erysipelothrix rhusiopathiae* binds to Gram-positive bacterial cell surface. *FEMS Microbiol. Lett.*, Vol. 186, 2, 313-317.
12. Sato, H., Miyazaki, H., & Sakakura, H. (1999). Isolation and purification of a protective protein antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. *Zen. Fur Vet. Reihe B.*, Vol. 46, 2, 73-84.
13. Shimoji, Y., Mori, Y., & Fischetti, V.A. (1999). Immunological characterization of a protective antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*: identification of the region responsible for

protective immunity. *Infect. Immun.*, Vol. 67, 4, 1646-1651.

14. Umana, E. (2003). *Erysipelothrix rhusiopathiae*: an unusual pathogen of infective endocarditis. *Int. J. Cardiol.*, Vol. 88 (2-3), 297-299.

15. Wood, R.L., Straw, S., & D'Allaire, W.L (1990). *Erysipelas in Diseases of swine*. (8th ed.). Iowa State University Press: Ames, 419-430.

16. Yamazaky, Y., Sato, H., & Sakakura, H. (1999). Protective activity of the purified protein antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in pigs. *Zen. fur Vet. Reihe B.*, Vol. 46 (1), 47-55.

**УДК:636.5.084.1:615**

**ЦУП В. І.**, канд. с.-г. наук, ст. наук. сп., terdosvet@meta.ua

**ВАСИЛІВ А. П.**, канд. с.-г. наук, ст. наук. сп., e-mail: Andrii7@rambler.ru

**СТАСЮК В. П.**, e-mail: Andrii7@rambler.ru

Тернопільська дослідна станція ІВМ НААН

## **ЕФЕКТИВНІСТЬ ВИКОРИСТАННЯ СОРБЕНТА КАРБОЛАЙН ПРИ ВИРОЩУВАННІ ТЕЛЯТ**

У статті представлено результати дослідження ефективності згодовування телятам у якості кормової добавки сорбента "Карболайн". Вивчено вплив препарату і кратність його згодовування на енергію росту телят та зменшення їх захворюваності. Встановлено, що разове згодовування кормової добавки у дозі 5 г на голову в день протягом 10 днів з трьохденного віку забезпечує збільшення живої маси телят у шестимісячному віці на 8,4% ( $p < 0,001$ ) порівняно з контролем. Збільшення кратності згодовування добавки (два рази на добу по 0,25 г) суттєво не вплинуло на інтенсивність росту тварин. Використання сорбенту покращило показники неспецифічної резистентності та імунологічної реактивності організму телят, зменшило їх захворюваність.

**Ключові слова:** сорбент, телята, інтенсивність росту, жива маса, резистентність.

**Вступ.** Телята, у період становлення імунітету, через низьку резистентність організму вразливі до різних захворювань (шлунково-кишкових, респіраторних, інфекційних), що призводить до зменшення їх інтенсивності росту, а часто і до загибелі [1]. Біля 80 відсотків випадків відходу молодняку припадає саме на час від народження до шестимісячного віку [2]. Дефіцит в раціонах телят мікроелементів, характерний для західної геохімічної зони України, уповільнює темпи росту молодняку, сприяє поглибленню важкості перебігу захворювань [3]. Для підвищення резистентності організму телят та з лікувальною і профілактичною метою використовують комплекс лікувальних засобів, переважно на основі антибіотиків, при цьому досить часто спостерігається їх негативний вплив на становлення мікрофлори, що і зумовлює пошук більш безпечних методів.

Великих збитків тваринництву завдають захворювання спричинені токсичним впливом на організм продуктів життєдіяльності патогенної мікрофлори та токсичних речовин, які поступають в шлунково-кишковий тракт з кормами, з водою та з повітря. Профілактичні засоби та заходи, спрямовані на зниження інтоксикації тварин нині недостатньо вивчені і потребують