

ПОЛУЧЕНИЕ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА ТЕЛЯТ И КОНТРОЛЬ ЕЕ КАЧЕСТВА**Медведев А.П., Корочкин Р.Б., Зайцева А.В., Меньшикова В.М., Морозов Д.Д.**УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины,
г. Витебск, Республика Беларусь

В статье изложен процесс получения вакцины по экспериментальной схеме и результаты контроля препарата на стерильность, безвредность и активность. Показана возможность получения качественного препарата по разработанной схеме и высокая достоверность контроля иммуногенности его на белых мышах.

The article states the process of manufacturing the vaccine based on an experimental scheme and results for control of its sterility, safety and activity. The vaccine manufacturing has been proved and its immunogenicity control on mice demonstrated.

Ключевые слова: штаммы, питательная среда, сальмонеллы, вакцина, стерильность, безвредность, активность, морские свинки, мыши.

Keywords: strains, media, salmonellae, vaccine, sterility, safety, activity, guinepig, pigeons, mice.

Введение. Производственная схема получения вакцины против сальмонеллеза телят предусматривает проверку производственных штаммов сальмонелл на их соответствие паспортным данным, приготовление питательных сред из говяжьего мяса, получение матровой раскладки бактерий, глубинное культивирование микроорганизмов в реакторе, инактивацию выращенных культур, добавление к ним определенных ингредиентов, расфасовку, укупорку, этикетировку и контроль качества препарата. Мы решили приготовить упомянутую вакцину по разработанной нами экспериментальной схеме, которая отличается от производственной тщательным отбором S-форм колоний бактерий и использованием их для получения матровой раскладки, применением ее в логарифмической фазе роста с достаточной концентрацией бактерий для засева среды в реакторе, приготовлением питательных сред из непищевого сырья, оптимизированным процессом глубинного культивирования сальмонелл, сокращенным сроком инактивации бактерий и их токсинов.

Кроме этого, приготовленную вакцину необходимо было испытать на стерильность, безвредность и активность, чтобы судить о пригодности экспериментальной схемы при получении препарата.

Материалы и методы исследований. В экспериментальной работе использовали питательные среды из непищевого сырья (мясо волов-продукторов гипериммунных сывороток), O - и H -агглютинирующие сальмонеллезные сыворотки, производственные штаммы сальмонелл: S. dublin 373, S. typhimurium 371, биореактор для культивирования бактерий, лабораторных животных: морских свинок, белых мышей.

Эксперименты провели с помощью общеизвестных в микробиологической практике микроскопических, бактериологических и серологических методов исследования.

Результаты исследований. Вакцина против сальмонеллеза телят представляет собой смесь культур производственных штаммов S. dublin 373, S. typhimurium 371, выращенных в бульоне Хоттингера реакторным способом, инактивированных формалином.

Вакцину против сальмонеллеза телят готовили по нижеприведенной экспериментальной схеме.

Работу по приготовлению вакцины начали с проверки производственных штаммов S. dublin 373 и S. typhimurium 371, хранившихся при 4°C в полужидком агаре в запаянных пипетках. Бактерии высевали в две пробирки с МПБ и культивировали при 37°C в течение 4 часов, затем делали пересев в две пробирки с МПБ и выращивали микроорганизмы в течение 5 часов. По окончании выращивания одну пробирку с культурой использовали для проверки тинкториально-морфологических, биохимических, культуральных, антигенных и других свойств бактерий, а культуру из другой - высевали на плотную питательную среду по Дригальскому с целью получения отдельных колоний. Чашки со средой помещали в термостат и спустя 18-20 часов вели просмотр выросшей культуры и тщательный отбор колоний S- типа. Из 7-8 отобранных колоний производили посев в 200-и граммовые флаконы, наполовину наполненные МПБ, и выращивали бактерии в течение 12 часов. Затем культуры из флаконов пересевали в 16-ти литровые баллоны, наполовину наполненные бульоном Хоттингера, и выращивали бактерии в течение 12 часов.

Одновременно с работой по подготовке матровой раскладки, определяли биологические свойства производственных штаммов сальмонелл и, убедившись в их соответствии паспортным данным, проводили засев питательной среды в реакторе.

Перед засевом питательной среды в реакторе определяли чистоту культуры матровой раскладки, концентрацию микробных клеток в 1 см³ и вносили необходимое количество литров ее в реактор из расчета 100 млн. м.к. на 1см³ среды. При этом культура матровой раскладки находилась в фазе логарифмического роста, что было определено чашечным методом Коха.

Глубинное культивирование сальмонелл вели с учетом данных, полученных в предыдущих опытах, т.е. при подаче воздуха в реактор из расчета 2 литра на 1 литр среды и скорости вращения мешалки 120-180 оборотов в минуту.

В процессе культивирования проверяли чистоту растущей культуры, корректировали значение pH и определяли концентрацию микробных клеток в 1см³.

Нам удалось в течение 8 часов получить культуру S. dublin с концентрацией 32 млрд. м. к. / см³, S. typhimurium с концентрацией 34 млрд. м. к. / см³.

Из полученных культур были приготовлены препараты-мазки, окрашены по Граму и подвергнуты микроскопии. В поле зрения микроскопа наблюдали палочковидные, грамтрицательные бактерии, располагающиеся одиночно, парно, небольшими скоплениями.

В РА на стекле выращенные бактерии агглютинировались типоспецифическими сальмонеллезными агглютинирующими О- и Н- сыворотками, что являлось свидетельством их принадлежности к роду Salmonella.

Концентрацию выращенной бакмассы определяли путем добавления к 1 см^3 ее физиологического раствора до получения 1 млрд. концентрации по стандарту мутности, а затем расчет производили по формуле (1):

$$C = V + 1, \quad (1)$$

где

C - концентрация микробных клеток в 1 см^3 культуры;

V - объем физраствора, который добавили для разведения культуры до концентрации 1 млрд. м.к. / см^3 .

Выращенную бакмассу разводили стерильным физраствором до концентрации 4 млрд. м.к. / см^3 , руководствуясь формулой (2):

$$V = \left(\frac{C}{4} - 1 \right) \cdot \Pi, \quad (2)$$

где

V - объем физиологического раствора в литрах, необходимый для разведения культуры до концентрации 4 млрд.м.к. в 1 см^3 ;

Π - количество культуры в реакторе в литрах;

C - концентрация микробных клеток в 1 см^3 культуры в реакторе.

Инактивацию разведенных культур и их токсинов проводили путем добавления 0,1 % димерэтиленмина, последующего перемешивания и выдерживания при 37°C в течение 5 часов.

Полноту инактивации бактерий определяли высевом на питательные среды, а их токсинов - путем введения культур белым мышам.

После инактивации культуры сальмонелл вносили в отдельный реактор в соотношении 1:1 и тщательно перемешивали. Эта смесь и представляла собой вакцину против сальмонеллеза телят. Путем посева вакцины на питательные среды определяли ее стерильность и расфасовывали в 200-и граммовые флаконы, закрывали резиновыми пробками, обкатывали металлическими колпачками, этикетировали. Расфасованную вакцину проверяли на стерильность, безвредность и активность.

Для определения стерильности из 5-ти флаконов с вакциной делали высевы ее по 0,1-0,2 см^3 в 2-е пробирки с МПА, МПБ, средой Сабуро, Китт-Тароцци и по 12 см^3 во флаконы с МПБ, средой Китт-Тароцци (по 50 см^3 среды во флаконе). Высевы помещали в термостат и через двое суток делали пересевы на МПА, в МПБ и МППБ. Первичные посевы выдерживали в термостате 10 суток, пересевы - 8 суток. При отсутствии роста в питательных средах вакцину считали стерильной.

Безвредность вакцины определяли на 5 белых мышах и 3 морских свинках. Мышам массой 16- 18 г вакцину вводили подкожно в области спины в дозе 0,5 см^3 . Морским свинкам массой 350-400 г вакцину инъецировали подкожно в области паха в дозе 5 см^3 . Препарат считали безвредным, если все животные оставались клинически здоровыми в течение 10 суток наблюдения за ними. Приготовленная по экспериментальной схеме вакцина оказалась стерильной и безвредной.

В производственных условиях активность вакцины определяют в отношении каждого серотипа сальмонелл, входящих в состав препарата. Активность в отношении S. dublin и S. typhimurium проверяют на морских свинках. Для этого на каждый серовар используют по 6 морских свинок, которых иммунизируют проверяемым препаратом. Затем, через 16-20 дней вакцинированных животных и одновременно по 3 интактных свинок к каждому серовару (контроль) заражают 2 ЛД₅₀ соответствующего сероварианта сальмонелл. Препарат считают активным при выживании не менее 4-х вакцинированных свинок и гибели не менее 2-х контрольных животных. Вакцинированные животные должны оставаться живыми в течение 7 дней после падежа последней свинки в контроле.

Описанный метод контроля активности препарата имеет определенные недостатки. Морские свинки являются весьма устойчивыми к сальмонеллам. Для морских свинок массой 350-400 г смертельная доза S. dublin колеблется в пределах 3,5-4 млрд. м.к., а S. typhimurium – 2-4 млрд. м.к. К тому же, в опытах по определению активности препаратов используют небольшое количество животных. Поэтому применяемый способ контроля активности препаратов позволяет лишь приближенно судить об их истинной иммуногенности, т.е. с достоверностью 50-70%.

Учитывая отмеченное, мы сочли целесообразным разработать способ контроля активности вакцины против сальмонеллеза телят на белых мышах. Мыши высокочувствительны к сальмонеллам и их воспроизводство и содержание менее затратно и трудоемко, чем других видов лабораторных животных. Они не являются остродефицитными для лабораторий и предприятий страны.

Работа была начата с подбора минимальной иммунизирующей дозы вакцины против сальмонеллеза телят, обеспечивающей выживание не менее 8 мышей из 10 вакцинированных, при гибели не менее 8 из 10 контрольных, т.е. не вакцинированных.

С целью предложения более объективного метода контроля активности вакцины против сальмонеллеза телят мы поставили опыт, схему проведения которого и его результаты отражает материал таблицы 1.

Таблица 1 - Выживаемость и гибель мышей, вакцинированных разными дозами препарата

Доза вакцины (см^3)	Количество мышей на дозу	Выживаемость и падеж мышей в отношении			
		S. dublin		S. typhimurium	
		выжило	пало	выжило	пало
0,01	10	1	9	2	8
0,1	10	6	4	7	3

0,2	10	7	3	8	2
0,3	10	9	1	10	0
0,4	10	9	1	9	1
0,5	10	9	1	10	0
контроль	10	1	9	0	10

Материал таблицы 1 позволяет утверждать, что доза препарата 0,3 см³ при подкожном введении мышам является минимальной и предохраняет от падежа 90 – 100% мышей при падеже 90 – 100% их в контроле.

Разрабатываемый метод контроля активности апробировали при определении иммуногенности препаратов, полученных по экспериментальной и производственной схемам, а также 3-х проб опытной серии вакцины, фальсифицированной путем разведения ее стерильным физраствором на 30% (проба 1), 50% (проба 2) и 70% (проба 3). Данные опыта представлены в таблице 2.

Таблица 2 - Иммуногенность производственной и экспериментальной вакцин и фальсифицированных проб препарата

Вакцины, пробы препарата	Доза (см ³)	Количество животных на дозу	Выживаемость и гибель животных в отношении			
			S. dublin		S. typhimurium	
			выжило	пало	выжило	пало
Опытная	0,3	10	10	0	9	1
Производственная	0,3	10	9	1	8	2
Проба 1	0,3	10	2	8	4	6
Проба 2	0,3	10	2	8	1	9
Проба 3	0,3	10	2	8	1	9
Контроль		10	0	10	1	9

Данные таблицы 2 свидетельствуют, что у вакцинированных опытной и производственной вакцинами мышей формируется довольно стойкий иммунитет, т.е. заражение животных спустя 16 суток после вакцинации предохраняет от гибели 80 – 100% опытных животных, при гибели 90-100% контрольных особей. Фальсифицированная физраствором опытная вакцина (проба 1) защищает от падежа 20-40% опытных животных, в то время как пробы 2 и 3 предохраняют падеж лишь 10-20 % особей.

Заключение. По экспериментальной схеме получена стерильная, безвредная, активная вакцина против сальмонеллеза телят. Разработан метод контроля активности вакцины на белых мышах, позволяющий оценивать ее иммуногенность с достоверностью 80 – 90%.

Литература. 1. Мурадова, Е.О. Микробиология / Е.О. Мурадова, К.В. Ткаченко. - ЭКСМО, 2009. - 336 с. 2. Справочник по применению вакцин, зарегистрированных в Республике Беларусь, против инфекционных болезней крупного рогатого скота, лошадей, плотоядных и животных разных видов / В.В. Максимович [и др.] – Минск: Техноперспектива, 2006. - 166 с. 3. Ходр Мунзер Мухаммад. Получение препаратов на основе антигенов сальмонелл и контроль их активности. Автореферат-дис. на соиск. уч. ст. канд. вет. наук. – Витебск: УО ВГАВМ, 2014. – 21 с.

Статья передана в печать 10.03.2015 г.

УДК 619:616.98:578.842.1 (476)

МЕЖДУНАРОДНЫЙ ПОДХОД К ПРОБЛЕМЕ АФРИКАНСКОЙ ЧУМЫ СВИНЕЙ

Морозов Д.Д.

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

В статье отражены современные взгляды международных экспертов на африканскую чуму свиней и приведены подходы к профилактике и ликвидации заболевания, согласно международным стандартам. Представлены сведения о проекте международной технической помощи ФАО Республике Беларусь по борьбе АЧС.

In the article the up to date international experts' opinions on ASF and approaches for prevention and eradication of ASF in compliance with the international standards have been presented. The data on FAO international technical assistance to the Republic of Belarus to eradicate ASF outbreaks have been stated.

Ключевые слова: ФАО, МЭБ, африканская чума свиней, профилактика, ликвидация биобезопасность, дикие свиньи.

Keywords: FAO, OIE, African swine fever, prevention, eradication, biosecurity, wild boars.

За последнее время количество стран и масштабы территорий, где были зарегистрированы вспышки африканской чумы свиней, значительно расширились. Все прогнозы, ранее составляемые ветеринарными