

Из таблицы 3 видно, что контроль активности иммуноглобулина в отношении одной серогруппы сальмонелл проводили на 25 мышах. В опытах использовали мышей массой 18-20 г. Иммуноглобулин вводили подкожно в дозах: 0,1; 0,02; 0,004; 0,0008; 0,00016 см³. Через 2-3 часа после введения препарата мышей заражали 3 ЛД₅₀ сальмонелл соответствующего серотипа. В качестве контроля служили 10 не получивших иммуноглобулин мышей, которых заражали одновременно с иммунизированными. Данная таблица свидетельствует, что контрольные животные погибли на 3-8 сутки; на 5-8 сутки отмечали гибель мышей, получивших 0,00016 см³ препарата. В более поздние сроки прослеживается отход мышей, получивших большие дозы иммуноглобулина. Спустя 5-7 суток после падежа не менее 8 контрольных животных вели окончательный учет результатов опыта.

Данные таблицы показывают, что между выживаемостью мышей и введенной им дозы иммуноглобулина имеется прямая зависимость. Действительно, препарат в дозе 0,1 см³ предохраняет от сальмонеллеза всех зараженных мышей, но по мере уменьшения дозы его соответственно снижается уровень защиты животных от болезни. Так, например, при испытании активности иммуноглобулина в отношении *S. typhimurium* из 5 мышей, получивших препарат в дозе 0,1 см³, ни одна мышка не пала. Иммуноглобулин в дозе 0,02 см³ предохраняет от гибели четырех мышей, в дозе 0,004 см³ - не более трех, в дозе 0,0008 см³ - двух, а в дозе 0,00016 см³ - не более одной особи. Такая же закономерность отмечается при проверке активности иммуноглобулина в отношении остальных сальмонелл.

Оценку активности иммуноглобулина и исходной сыворотки, взятой для его получения, определяли по величине ИД₅₀ в параллельных опытах на голубях и белых мышах. Результаты этих опытов представлены в таблице №4.

Таблица 4 - Активность иммуноглобулинов и сыворотки для голубей и мышей

Сальмонеллы	Вид животных	ИД ₅₀ (см ³)	
		иммуноглобулина	сыворотки
<i>S. choleraesuis</i>	голуби	0,006±0,001	0,021±0,002
<i>S. dublin</i>	мыши	0,007±0,001	0,023±0,001
<i>S. typhimurium</i>	мыши	0,007±0,002	0,024±0,002
<i>S. abortusovis</i>	мыши	0,010±0,002	0,032±0,001

Материал таблицы 4 свидетельствует, что иммуноглобулин по превентивной активности превосходит сыворотку из которой получен, примерно в три раза. Например, величина ИД₅₀ иммуноглобулина для голубей против *S. choleraesuis* составила 0,006±0,001 см³, а сыворотки - 0,021±0,002 см³.

То же самое можно отметить и в отношении других сероваров сальмонелл.

Заключение. Опытная работа по получению противосальмонеллезного иммуноглобулина позволила предложить технологическую схему производства названного препарата.

В ходе эксперимента были найдены оптимальные физико-химические условия фракционирования сыворотки, разработаны методы консервации, стерилизации и контроля качества специфического иммуноглобулина.

Литература. 1. Противобактериальные лечебно-профилактические сыворотки. /Медведев А.П./ Монография.- Витебск.-2007.- 294 с.

Статья поступила 24.02.2010 г.

УДК 619:615.373

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПАСТЕРЕЛЛ РАЗЛИЧНЫМИ СПОСОБАМИ И ИХ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Медведев А.П., Кошнерова Л.А., Гвоздев С.Н.

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

В статье представлены результаты культивирования пастерелл различными способами и их биологические свойства. Установлено, что уже через 7 часов культивирования в среде с использованием шуттель-аппарата и добавлением в нее (бульон Хоттингера) глюкозы можно получить наибольшее количество жизнеспособных пастерелл с высокой степенью вирулентности. Данную культуру на основании полученных результатов мы предлагаем использовать для приготовления пастереллезного антигена.

The article deals with the result of the cultivation of pasteurelles the different methods and their biological properties. It was established that already in seven hours cultivation in environ with used shuttell-apparatus and addition of glucose in her (broth of Hettinger) may receive most quality viable of pasteurelles with most of virulence. Present culture we propose to use for preparation to antigen of pasterellosis on the basis of receipted results.

Введение. Пастереллез – контагиозная инфекционная болезнь домашних и диких животных, характеризующаяся при остром течении признаками септицемии, крупозным воспалением легких, плевритом, а при хроническом течении – крупозной, гнойно-некротической, фибринозной пневмонией, плевритом, отеками, реже – менингоэнцефалитом, артритом, маститом, керато-конъюнктивитом, эндокардитом, эндометритом и абортами, иногда энтеритом [5,6].

Из шестнадцати видов пастерелл, относящихся к семейству Pasteurellaceae, роду Pasteurella, только два вида (*P. multocida* и *P. haemolytica*) вызывают инфекционную патологию у сельскохозяйственных и диких животных, отдельно или в ассоциации. Причиной возникновения пастереллеза среди поголовья крупного рогатого скота является *P. multocida* и в редких случаях *P. haemolytica*. При пастереллезе свиней ведущая

этиологическая роль отводится *P. multocida*, в то время как, *P. haemolytica* выделяется только в нескольких процентах из всех случаев выделения возбудителя от больных пастереллезом животных.

Впервые выделил *Pasteurella multocida* из патологического материала погибших кур в 1880 году Луи Пастер [5]. *Pasteurella haemolytica* была выделена в 1921 году F. S. Jones от крупного рогатого скота при патологии органов дыхания [7].

Заболевание характеризуется значительным экономическим ущербом вследствие гибели и вынужденного убоя больных животных, потери их племенных качеств, снижения продуктивности, затрат на проведение противозооэпизоотических мероприятий [6].

Бактерии рода *Pasteurella* потенциально опасны для здоровья человека [2,4]. Однако заболевания человека пастереллезом проходят как правило под другими диагнозами, этому нередко способствует стертая форма пастереллеза. По классификации Всемирной организации здравоохранения пастереллезы относят к III и IV группам риска для человека. Заболевания у человека характеризуются полиморфизмом клинических проявлений.

Одним из первых упоминаний о распространенности пастереллеза на территории Беларуси явилась публикация Н.И. Эккерта и В.В. Федерса, которыми в 1912 году была отмечена вспышка пастереллеза среди диких кабанов и домашнего скота в районе Беловежской пущи. Официально пастереллез в Беларуси был зарегистрирован в 1945 году [4].

По широте распространения и частоте регистрации в хозяйствах республики пастереллез занимает третье место после колибактериоза и сальмонеллеза [1,3].

В системе мероприятий по профилактике и ликвидации пастереллеза ведущую роль отводят применению специфических средств защиты.

Биологическая промышленность нашей страны, представленная Витебской биофабрикой, производит для активной профилактики болезни вакцину полужидкую гидроокисьалюминиевую против пастереллеза крупного рогатого скота, вакцину ассоциированную поливалентную против сальмонеллеза, пастереллеза и стрептококкоза свиней, а для пассивной профилактики заболевания и лечения животных – сыворотку против пастереллеза крупного рогатого скота, овец и свиней.

В связи с разработкой нами нового биопрепарата – ассоциированной гипериммунной сыворотки против сальмонеллеза и пастереллеза крупного рогатого скота, возникла необходимость изучения биологических свойств пастерелл в процессе культивирования их в жидких и на плотных питательных средах.

Известно, что антигенные и иммуногенные свойства пастерелл в значительной степени обуславливаются формированием у бактерий капсул. Капсульный антиген играет также существенную роль в типовой принадлежности пастерелл [8].

Честь открытия этого антигена принадлежит Картеру, который разделил *P. multocida* на четыре сероварианта: А, В, С, D, различающихся между собой именно капсульным антигеном. Он состоит из белка и полисахаридов и присущ пастереллам, образующим на мясо-пептонном агаре колонии S-типа. Потеря пастереллами капсул не вызывает заметного изменения их жизнедеятельности, но сопровождается снижением патогенности и иммуногенности бактерий. Капсульный антиген, легко экстрагируемый физиологическим раствором при 56°C в течение 30 мин, состоит из белка и полисахаридов. Очищенный капсульный антиген является полисахаридом. Позднее выявлен вариант Е, к которому отнесены культуры, изолированные в Африке [2]. Доказано, что вакцинные препараты, содержащие капсульный антиген, создают у животных напряженный иммунитет. Учитывая, что капсульный антиген относится к протективным и играет важную роль в формировании иммунитета, мы попытались изучить влияние процесса культивирования пастерелл в бульоне Хоттингера и МПБ на капсулообразование у этих бактерий.

Материалы и методы. В опытах использовали производственные штаммы бактерий *P. multocida* №№ 796, 5264. Культивирование пастерелл проводили в бульоне Хоттингера во флаконах при 37°C в течение 24 часов. Выращивание бактерий вели без перемешивания растущей культуры и с перемешиванием, которое осуществляли с помощью шуттель – аппарата. Перемешиваемую культуру выращивали с добавлением глюкозы и без нее. Концентрацию пастерелл в среде определяли по стандарту мутности Тарасевича. Морфологию бактерий изучали путем световой микроскопии препаратов – мазков, окрашенных по Граму. Наличие капсул у пастерелл выявляли по методу Ольта, то есть на приготовленный препарат наносили 2%-ный раствор сафранина на 5 – 7 минут, затем промывали водой, высушивали и микроскопировали. Культуральные свойства изучали по характеру роста бактерий в жидких питательных средах и на поверхности агара. Количество живых пастерелл в растущей культуре определяли методом титрования на кровяном агаре. Для изучения выраженности капсулообразования у пастерелл их культивировали не только в бульоне Хоттингера, но и в мясо-пептонном бульоне. Биохимические свойства бактерий определяли по их способности ферментировать сахара, выделять индол и сероводород. Вирулентность микробных культур устанавливали для белых мышей по величине ЛД₅₀. Подвижность пастерелл определяли методом посева их уколом в полужидкий агар.

Результаты исследований. В препаратах-мазках из бульонных и агаровых культур, окрашенных по Граму, в поле зрения микроскопа пастереллы имели вид мелких грамтрицательных палочек, которые располагались одиночно, парами, скоплениями неопределенной формы.

В начале стационарной фазы роста при окраске по Ольту препаратов-мазков, приготовленных из мясо-пептонного бульона, была обнаружена у отдельных бактерий капсула, окрашенная в желто-оранжевый цвет. Обнаружить капсулу в более поздние сроки культивирования бактерий в МПБ не представилось возможным. При культивировании пастерелл в бульоне Хоттингера, независимо от фазы роста культуры, капсулообразование нами не выявлено.

В жидких питательных средах (бульон Хоттингера, МПБ) наблюдали равномерное помутнение их с образованием незначительного осадка. Более интенсивное помутнение визуально определялось у культур, выращиваемых в бульоне Хоттингера с добавлением глюкозы и перемешиванием.

На агаре пастереллы формировали мелкие выпуклые прозрачные колонии, которые слегка флюоресцировали в косопроходящем свете. В полужидком агаре наблюдали рост бактерий в виде серо-белого стержня по уколу, то есть пастереллы не обладали подвижностью.

В стационарной фазе роста накопление пастерелл в бульоне Хоттингера без глюкозы по оптическому стандарту мутности составило 3,6 – 4,4 млрд.м.к./см³. При статическом культивировании бактерий концентрация их в бульоне Хоттингера и в МПБ практически была одинаковой и равнялась 1,1 – 1,4 млрд.м.к./см³.

Нами установлено, что при статическом культивировании через 8 – 10 часов концентрация жизнеспособных клеток достигает максимального значения, которое сохраняется до окончания выращивания. Между общей концентрацией микробных клеток и количеством жизнеспособных бактерий наблюдается прямая зависимость.

Шуттелирование и добавление в среду глюкозы интенсифицирует рост пастерелл, то есть наибольшее количество жизнеспособных клеток было обнаружено в культуре 7 – часового роста (3,5 – 4,2 млрд.м.к./см³). В среде без глюкозы количество жизнеспособных клеток составило 2,9 – 3,1 млрд.м.к./см³. Необходимо отметить, что в среде с глюкозой фаза отмирания клеток наступает раньше, и к концу культивирования жизнеспособных бактерий насчитывалось в 2 раза меньше, чем в культуре 7-часового роста.

На среде Гисса пастереллы ферментировали с образованием кислоты глюкозу, сахарозу, галактозу, расщепляли маннит, сорбит, не ферментировали лактозу, арабинозу, мальтозу, образовывали индол и сероводород, на кровяном агаре не вызывали гемолиза, давали положительную реакцию на каталазу.

Определение вирулентности культур пастерелл в разные сроки их выращивания показало, что при шуттелировании культура 7-часового роста является наиболее вирулентной (ЛД₅₀ = 7 – 12 клеток). При дальнейшем культивировании вирулентность бактерий снижается. Так, для 10-часовой культуры ЛД₅₀ пастерелл для белых мышей составила 15 – 25 клеток, а для 24-часовой – 30 – 60 клеток. В процессе статического культивирования вирулентность культур оставалась примерно на одном уровне и ЛД₅₀ для мышей составляла в среднем 12 – 20 микробных клеток.

Заключение. Культивирование *P. multocida* в бульоне Хоттингера с перемешиванием позволяет в течение 7 часов получить 3,6 – 4,4 млрд.м.к./см³, а с добавлением глюкозы – 4,5 – 5,5 млрд.м.к./см³, что в 3 – 3,6 раза больше, чем при статическом культивировании. При этом обнаружено, что количество жизнеспособных клеток в среде без глюкозы достигает 2,9 – 3,1 млрд.м.к./см³, а с глюкозой 3,5 – 4,2 млрд.м.к./см³. Однако в среде с глюкозой фаза отмирания бактерий наступает раньше и к концу культивирования количество жизнеспособных клеток снижается в 2 раза.

При статическом культивировании концентрация жизнеспособных клеток достигает максимума через 8 – 10 часов и составляет от 2,9 до 3,1 млрд.м.к./см³, до окончания периода выращивания.

В процессе культивирования в течение 7 – 10 часов в бульоне Хоттингера с добавлением глюкозы и без нее, с использованием шуттелирования и без его применения, а также в МПБ, на обычном и кровяном агарах бактерии по своим морфологическим, культуральным, биохимическим свойствам были типичными для рода *Pasteurella*. По мере удлинения срока выращивания в культурах обнаружено значительное количество морфологически измененных клеток: больших шарообразных и палочковидных, а также очень мелких кокковидных бактерий.

Капсулообразование у производственных штаммов пастерелл обнаружено нами лишь в начале стационарной фазы роста бактерий в МПБ, но по мере старения культуры способность бактерий образовывать капсулу утрачивается. При росте пастерелл в бульоне Хоттингера капсулообразование не установлено. Следовательно, образование капсулы зависит от состава питательной среды и возраста культуры. Поэтому для приготовления вакцин и лечебно-профилактических сывороток целесообразно использовать культуру в фазе замедления роста.

Наиболее вирулентными являются культуры пастерелл, выращенные в течение 7-ми часов при активном шуттелировании, менее вирулентными – культуры, полученные при статическом способе выращивания. Известно, что иммуногенность микроорганизмов находится в прямой зависимости от их вирулентности. Исходя из этого положения и полученных нами данных по определению вирулентности пастерелл, полагаем целесообразным использовать для приготовления пастереллезного антигена культуры бактерий 7-ми часового роста.

Литература. 1. Барашков, А.Н. Эффективность ассоциированного применения антигенов при получении гипериммунной сыворотки против пастереллеза / А.Н. Барашков // Ученые записки: сборник научных трудов по материалам международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы диагностики и профилактики болезней, селекции, кормления и воспроизводства животных» / УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины». – Витебск, 2003. – Т. 39, ч. 1. – С. 22 – 24. 2. Душук, Р.В. Эпизоотологическая и клинико-морфологическая характеристика пастереллеза пушных зверей / Р.В. Душук, Л.И. Нецепляева // Проблемы патологии и экологической взаимосвязи болезней диких теплокровных и с.-х. животных: тез. докл. I Всесоюз. конф. – Москва, 1988. – С. 39 – 41. 3. Ленева, С.В. Профилактика и диагностика сальмонеллеза сельскохозяйственных животных / С.В. Ленева, Ю.А. Малахов, В.В. Шорохов // Сборник научных трудов ВГНКИ. – Москва, 2001. – Т. 62. – С. 52 – 57. 4. Лях, Ю.Г. Специфическая профилактика в комплексе мер борьбы с пастереллезом крупного рогатого скота / Ю.Г. Лях, Н.Н. Андросик, И.С. Шляхто // Ветеринарная наука – производству: сб. науч. тр. – Минск: Хата, 1999. – Вып. 34. – С.136 – 141. 5. Максимов, Н.А. Пастереллез животных: лекция / Н.А. Максимов // МГАВМ и Б им. Скрябина. – Москва, 1995. – 228с. 6. Панин, А.Н. Состояние и перспективы совершенствования специфической профилактики пастереллеза животных / А.Н. Панин, Р.В. Душук // Сборник научных трудов / Всероссийский государственный научно-исследовательский институт контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов – Центр качества вет. препаратов и кормов. – Москва, 2001. – Т. 62. – С. 27–38. 7. Ряснова, А.В. Патогенность культуры *P. haemolytica* для различных видов лабораторных животных / А.В. Ряснова // Бюллетень ВНИИЭВ им. Я.Р. Коваленко. – Москва, 1985. – Вып.59. –С.46–48. 8. Разработка средств специфической профилактики инфекционных болезней животных / В.В. Максимович [и др.] // Ученые записки: сборник научных трудов по материалам международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины и зоотехнии», посвященной 80-летию основания учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины, г. Витебск, 4 – 5 ноября 2004 года / УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины». – Витебск, 2004. – Т. 40, ч. 1. – С. 245 – 246.

Статья поступила 24.02.2010 г.