

куриных эмбрионов, кровяных сгустков, глобулина, казеина, фибрина. Нами же впервые доказана возможность культивирования производственных штаммов сальмонелл без изменения их биологических свойств на питательных средах, приготовленных на основе гидролизата из куриных голов.

Литература. 1. Вербицкий, А. А. Питательные среды и культивирование микроорганизмов / А. А. Вербицкий, А. П. Медведев ; Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск : ВГАВМ, 2008. – 236 с. 2. Заерко, В. И. Производство живых вакцин против сальмонеллеза животных на питательных средах из непищевого сырья : автореф. ... дис. канд. вет. наук : 16.00.03 / В. И. Заерко ; Всероссийский государственный НИИ контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов. – Москва, 1996. – 18 с. 3. Система культивирования микроорганизмов / В. И. Заерко [и др.] // Ветеринарная биотехнология : настоящее и будущее. – Щелково, 2004. – С. 110–113. 4. Телишевская, Л. Я. Разработка методов изготовления гидролизатов для питательных сред / Л. Я. Телишевская, С. П. Сергеева // Аграрная наука. – 2000. – № 10. – С. 22–23. 5. Ткаченко, Н. Н. Разработка и оценка качества новых питательных сред и стимуляторов роста микроорганизмов на основе активированных гидролизатов из молок рыб и вермикюльтуры : автореф. дис. ... канд. биол. наук : 03.00.07 / Н. Н. Ткаченко ; Ставропольский государственный университет. – Ставрополь, 2009. – 16 с.

Статья передана в печать 12.09.2017 г.

УДК 619:579.017.8:579.842.14

ПОЛУЧЕНИЕ САЛЬМОНЕЛЛЕЗНОГО АНТИГЕНА НА СРЕДАХ ИЗ НЕТРАДИЦИОННОГО СЫРЬЯ И ЕГО ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ГИПЕРИММУНИЗАЦИИ ПРОДУЦЕНТОВ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ СЫВОРОТКИ

*Медведев А.П., *Огурцова К.А., **Кулешов Д.Б.

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

**ОАО «БелВитунифарм», г. Витебск, Республика Беларусь

*В статье показана возможность получения сальмонеллезного антигена на средах из нетрадиционного сырья и применения его для гипериммунизации продуцентов лечебно-профилактической сыворотки против сальмонеллеза животных. **Ключевые слова:** сальмонеллез, штаммы, антиген, куриные головы, питательные среды, волю, гидролиз, сыворотка, активность.*

DEVELOPING AN ANTIGEN OF SALMONELLAE ON MEDIA FROM UNCONDITIONAL SUBSTANCES AND ITS USE FOR SPECIFIC SERUM CONSTRUCTION

*Medvedev A.P., *Ogurtsova K.A., **Kuleshov D.B.

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

**OJCM «BelVitinipharm», Vitebsk, Republic of Belarus

*The article presents possible developing a salmonella antigen from unconditional substances for manufacturing a hyperimmune serum. **Keywords:** salmonellae, strains, antigen, chicken heads, nutrient media, oxen, hydrolysis, serum, activity.*

Введение. Сальмонеллы – широко распространенная в природе группа микроорганизмов, среди которых имеются патогенные, условно-патогенные и сапрофиты. В настоящее время известно более 3000 серовариантов сальмонелл. Международный сальмонеллезный центр ежегодно регистрирует 15 – 20 новых серотипов. Патогенные и условно патогенные бактерии являются возбудителями инфекционной болезни под общим названием «сальмонеллез», которая наносит значительный экономический ущерб животноводческим хозяйствам страны.

В качестве специфических средств в борьбе с сальмонеллезом используют вакцины, лечебно-профилактические гипериммунные сыворотки, иммуноглобулины, бактериофаги. Наиболее востребованными препаратами являются вакцины и сыворотки. В Республике Беларусь их производство осуществляет ОАО «БелВитунифарм». Однако, для серийного приготовления этих биопрепаратов нужны качественные питательные среды. Кстати, они необходимы для получения антибиотиков, кислот, ферментов, витаминов и т.д., а также проведения различных научно-исследовательских работ.

В биологической промышленности для выращивания сальмонелл, предназначенных для приготовления антигена для гипериммунизации волов-продуцентов специфической сыворотки, используют бульон Хоттингера, потребность в котором исчисляется сотнями литров. Бульон традиционно готовят из говяжьего мяса, являющегося ценным пищевым продуктом высокой стоимости, что экономически невыгодно. Поэтому замена мяса дешевым белоксодержащим сырьем и приготовление из него питательных сред – важная научная задача, которая может быть решена путем проведения целенаправленных исследований.

В связи с отмеченным, целью нашей работы явилось получение сальмонеллезного антигена на средах из нетрадиционного сырья и использование его для гипериммунизации проду-

центров лечебно-профилактической сыворотки против сальмонеллеза животных.

Материалы и методы исследований. Материалом для исследований служили питательные среды из нетрадиционного сырья, предназначенные для приготовления сальмонеллезного антигена, используемого при гипериммунизации волов-производителей специфической сыворотки, аттенуированные штаммы сальмонелл, лабораторные животные – белые мыши, морские свинки, голуби.

Нетрадиционное сырье (куриные головы) пропускали через мясорубку и получали фарш. На 1 кг фарша добавляли 1,5 л водопроводной воды, подогретой до 40°C, и проводили гидролиз в течение 4–5 суток. Из гидролизата готовили мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), мясопептонный полужидкий агар (МПГЖА), которые использовали в опытной работе.

В экспериментах применяли микроскопический, бактериологический, биологический и серологический методы исследований.

Чистоту культур сальмонелл проверяли микроскопией препаратов-мазков, окрашенных по Граму. В случае обнаружения в поле зрения микроскопа на препаратах палочек с закругленными концами одинакового размера, окрашенных в малиново-розовый цвет, культуру признавали чистой.

Для изучения культуральных свойств сальмонелл их высевали в жидкие, полужидкие и на плотные питательные среды. После инкубации сред в термостате при 37–38°C в течение 18–20 часов, выросшие культуры просматривали и отмечали характер роста бактерий на питательных средах. При просмотре жидких сред выявляли интенсивность их помутнения, изменения цвета, наличие осадка, поверхностной пленки, пристеночного кольца и т.д.

Выросшие на плотной питательной среде колонии характеризовали по величине, форме, прозрачности, контуру края, рельефу, поверхности, цвету, структуре и консистенции.

Чистую культуру сальмонелл засеивали в полужидкий агар путем укола до дна пробирки. Посев, произведенный таким образом, позволял отметить не только характер изменения питательной среды, но и давал возможность определить подвижность бактерий.

Сахаролитические свойства сальмонелл определяли путем посева культур их в жидкие среды Гисса с индикатором Андресе.

Для определения антигенной структуры сальмонелл применяли набор специфических диагностических сывороток. Структуру микроорганизмов исследовали согласно прилагаемым к набору «Методическим указаниям по применению сальмонеллезных монорецепторных О- и агглютинирующих адсорбированных сывороток для идентификации сальмонелл в РА».

Для приготовления сальмонеллезного антигена штаммы сальмонелл засеивали на МПА и выращивали при температуре 37–38°C в течение 16–20 часов. Выросшую культуру смывали стерильным физраствором, устанавливали по оптическому стандарту мутности концентрацию 5 млрд м.к. в 1 см³. Смывы культур смешивали в равных пропорциях, т.е. получали поливалентный антиген, состоящий из бактерий *S. typhimurium*, *S. abortusovis*, *S. choleraesuis*, *S. dublin*, который использовали для гипериммунизации волов с целью получения от них лечебно-профилактической сыворотки. Антигеном из аттенуированных штаммов сальмонелл провели гипериммунизацию 10 волов, подобранных по принципу аналогов, массой 380–400 кг.

Антиген вводили внутримышечно в мышцы шеи и туловища. Всего сделали 20 инъекций с интервалом 4–5 суток в дозах: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18 см³ и 6 инъекций по 20 см³. В процессе гипериммунизации после 5, 7, 10, 12, 15 и 18-й инъекций из яремной вены брали кровь, получали сыворотку, изучали ее агглютинирующую и превентивную активность.

Реакцию агглютинации (РА) ставили по общепринятой методике пробирочным методом, начиная с разведения 1:25 и до титра.

Превентивную активность сыворотки по отношению к *S. choleraesuis* определяли на голубях, а к другим сальмонеллам – на морских свинках. Для этого морским свинкам подкожно, а голубям внутримышечно вводили сыворотку в дозах: 0,5; 0,1; 0,02; 0,004; 0,0008 см³, используя 5 животных на дозу. Через 24 часа иммунизированных и контрольных голубей и морских свинок (по 5 особей к каждому серотипу) заражали оттитрованной смертельной дозой вирулентных штаммов сальмонелл соответствующего серовара.

Результаты опытов учитывали по выживаемости животных, получивших сыворотку и гибели контрольных, не получивших ее. Наблюдение за животными вели в течение 10 суток, регистрируя павших и выживших.

Величину ИД₅₀ сыворотки для голубей и морских свинок рассчитывали по формуле Кербера в модификации Ашмарина.

Результаты исследований. Выполненная опытная работа позволила получить следующие результаты.

Приготовленный перевар из куриных голов характеризовался следующими биохимическими показателями:

- общего азота – 1300 мг %;
- аминного азота – 1100 мг %;
- триптофана – 300 мг %.

Эти показатели свидетельствуют о том, что приготовленный перевар по уровню содержания общего азота, аминного азота и триптофана является пригодным для получения общеупот-

ребительных питательных сред.

В средах из куриных голов были выращены аттенуированные штаммы сальмонелл, которые на препаратах-мазках в поле зрения микроскопа представляли собой грамтрицательные палочки с закругленными концами, располагающиеся одиночно, попарно, скоплениями неопределенной формы.

В жидкой среде (МПБ) рост сальмонелл проявлялся равномерным помутнением ее с образованием на дне пробирки серо-белого осадка.

На поверхности плотной питательной среды (МПА) бактерии формировали круглые, выпуклые, с ровными краями, голубоватые колонии размером от 2 до 4 мм в диаметре.

В полужидком агаре (МППЖА) при посеве уколом сальмонеллы интенсивно росли в виде серо-белого стержня по уколу и менее интенсивно по всей массе среды, что являлось свидетельством их подвижности.

Бактерии, выращенные на средах из куриных голов, ферментировали глюкозу, маннит, сорбит, арабинозу, дульцит, ксилозу и не расщепляли лактозу, сахарозу, салицин, адонит.

В реакции агглютинации на стекле бактерии агглютинировались следующими монорецепторными сыворотками: *S. choleraesuis* – 0-6; 7; H-c; 1,5; *S. dublin* – 0-1, 9, 12; H-g, p; *S. typhimurium* – 0-1, 4, H-i, 1, 2; *S. abortusovis* – 0-1, 4, H-b, e, n, x.

Полученные опытные данные позволяли заключить, что аттенуированные штаммы сальмонелл, выращенные на питательных средах из нетрадиционного сырья по тинкториально-морфологическим, культуральным, сахаролитическим и антигенным свойствам являются типичными для рода *Salmonella* и соответствующего серовара.

Учитывая, что выращивание сальмонелл на средах из куриных голов не изменяет их биологических свойств, мы приготовили из культур бактерий поливалентный антиген и провели им гипериммунизацию волов.

Было установлено, что в процессе гипериммунизации животных антигеном из аттенуированных сальмонелл агглютинирующая активность сыворотки нарастает до 10 инъекции, о чем свидетельствует цифровая материал таблицы 1.

Таблица 1 – Агглютинирующая активность сыворотки крови волов в процессе гипериммунизации поливалентным антигеном

Число инъекций	Доза антигена (см ³)	Титр антигенов в РА к сальмонеллам				M±m
		<i>S. choleraesuis</i>	<i>S. dublin</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. abortusovis</i>	
5	5	1:800	1:1600	1:1600	1:800	1200±230
7	7	1:1600	1:3200	1:3200	1:1600	2400±460
10	10	1:6400	1:6400	1:6400	1:3200	5200±600
12	14	1:6400	1:6400	1:3200	1:3200	5200±800
15	20	1:3200	1:3200	1:3200	1:3200	3200±0
18	20	1:3200	1:3200	1:3200	1:3200	3200±0

Из таблицы видно, что титр агглютининов после 5 инъекций антигена к *S. choleraesuis* составил 1:800, *S. dublin* – 1:1600, *S. typhimurium* – 1:1600, *S. abortusovis* – 1:800, после 7 – 1:1600, 1:3200, 1:3200, 1:1600, после 10 – 1:6400, 1:6400, 1:6400, 1:3200 соответственно.

Последующие инъекции после 10-го введения антигена не повышали уровня агглютинирующей активности сыворотки крови гипериммунизируемых волов. Результаты исследования превентивной активности сыворотки крови волов в процессе гипериммунизации отражают данные таблицы 2, из которой видно, что превентивная активность сыворотки в отношении *S. choleraesuis* для 5-й стадии гипериммунизации составляет 0,42 см³, 7-й – 0,1 см³, 10-й – 0,006 см³, дальнейшие инъекции антигена не интенсифицируют иммунный ответ организма и не повышают активности сыворотки крови животных. Такая же закономерность наблюдается в отношении других серотипов бактерий, т.е. *S. dublin*, *S. typhimurium*, *S. abortusovis*.

Таблица 2 – Превентивная активность сыворотки крови волов в процессе гипериммунизации аттенуированными сальмонеллами

Число инъекций	Доза антигена (см ³)	ИД ₅₀ сыворотки (в см ³) в отношении сальмонелл			
		<i>S. choleraesuis</i>	<i>S. dublin</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>S. abortusovis</i>
5	5	0,42	0,41	0,42	0,41
7	7	0,1	0,2	0,1	0,2
10	10	0,006	0,007	0,006	0,006
12	14	0,007	0,008	0,007	0,008
15	20	0,008	0,009	0,008	0,01
18	20	0,009	0,010	0,009	0,009

Данные исследования агглютинирующей и превентивной активности сыворотки крови волов на разных стадиях гипериммунизации позволяют судить об отсутствии видимой конкуренции между антигенным действием совместно вводимых в организм животного сероваров сальмонелл. Действительно величина ИД₅₀ сыворотки, полученной от одних и тех же стадий гипериммунизации, различается незначительно.

В отдельном опыте нами проведена сравнительная оценка активности сыворотки, полученной путем гипериммунизации волов аттенуированными сальмонеллами и биофабричным методом, который предусматривает инъекции инактивированного формалином антигена. Было установлено, что ИД₅₀ сыворотки, полученной в нашем опыте, составила в отношении *S. choleraesuis* 0,004 см³, *S. dublin* – 0,006 см³, *S. typhimurium* – 0,005 см³, *S. abortusovis* – 0,005 см³, а изготовленной биофабричным методом – 0,015; 0,012; 0,013; 0,014 см³ соответственно. Приведенные данные свидетельствуют, что сыворотка от волов, гипериммунизированных живыми сальмонеллами, активнее сыворотки, изготовленной путем гипериммунизации животных формолантигеном.

Необходимо заметить, что важным преимуществом гипериммунизации волов аттенуированными штаммами сальмонелл является ответная реакция организма на введение живых бактерий. Известно, что на инъекции инактивированного антигена животные реагируют резким повышением температуры тела (40,5–41°C) в первые часы после введения, полной потерей аппетита, угнетением. Введение живых сальмонелл вызывало несколько иную реакцию. Температура тела волов незначительно медленно повышалась, достигая максимума к исходу вторых суток, а затем к концу четвертых суток после инъекции антигена стабилизировалась в пределах физиологической нормы. Животные не теряли аппетита, не были угнетены до такой степени, как волы, получающие формолантиген. Местная реакция характеризовалась в первые часы после инъекции антигена образованием незначительных припухлостей, которые исчезали на 3–4-е сутки. У волов, гипериммунизированных формолантигеном, местная реакция проявлялась образованием горячих, болезненных припухлостей, которые постепенно исчезали к концу 4–5-х суток.

Заключение. Результаты выполненной опытной работы позволяют заключить, что на основе гидролизата из нетрадиционного сырья – продукции птицепредприятий – куриных голов получены питательные среды и показана возможность культивирования на этих средах аттенуированных штаммов сальмонелл без утраты их биологических свойств. Из биомассы бактерий, выращенных на этих средах, приготовлен поливалентный антиген, составленный из живых аттенуированных сальмонелл 4 сероваров: *S. choleraesuis*, *S. dublin*, *S. typhimurium*, *S. abortusovis*, который успешно использован для гипериммунизации волов-производителей специфической сыворотки. Установлено, что агглютинирующая и превентивная активность сыворотки крови волов нарастает до 10-й инъекции антигена, а последующие внутримышечные введения его не повышают уровня активности исследуемой сыворотки, что является основанием исключения их из схемы гипериммунизации животных.

Литература. 1. Вербицкий, А. А. Питательные среды и культивирование микроорганизмов / А. А. Вербицкий, А. П. Медведев ; Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск : ВГАВМ, 2008. – 236 с. 2. Заерко, В. И. Производство живых вакцин против сальмонеллеза животных на питательных средах из непищевого сырья : автореф. дис. ... канд. вет. наук : 16.00.03 / В. И. Заерко ; Всероссийский государственный НИИ контроля, стандартизации и сертификации ветеринарных препаратов. – Москва, 1996. – 18 с. 3. Медведев, А. П. Контроль сыворотки против сальмонеллеза животных / А. П. Медведев // Специфическая профилактика и диагностика инфекционных болезней животных : сборник научных трудов (Всероссийский государственный научно-контрольный институт ветеринарных препаратов. – Москва, 1986. – С. 74 – 78 4. Медведев, А. П. Основные методологические приемы и принципы получения лечебно-профилактических и диагностических сывороток / А. П. Медведев, А. А. Вербицкий // Ветеринарная медицина Беларуси. – 2001. – № 2. – с. 7 – 8. 5. Телишевская, Л. Я. Разработка методов изготовления гидролизатов для питательных сред / Л. Я. Телишевская, С. П. Сергеева // Аграрная наука. – 2000. – № 10. – С. 22-23 6. Телишевская, Л. Я. Белковые гидролизаты. Получение, состав, применение / Л. Я. Телишевская ; под ред. А. Н. Панина. – Москва, 2000. – 295 с. : табл.

Статья передана в печать 10.07.2017 г.

УДК 576.895.122.21

ВЕТЕРИНАРНО-САНИТАРНАЯ ОЦЕНКА РЫБЫ, ПОРАЖЕННОЙ ОПИСТОРХОЗОМ, И РЕЖИМЫ ОБЕЗЗАРАЖИВАНИЯ

Назаренко С.Н.

Сумский национальный аграрный университет, г. Сумы, Украина

В статье приведены результаты ветеринарно-санитарной оценки рыбы, пораженной описторхозом. Установлено, что из мяса рыбы с ИИ свыше 51 экз. выделена культура кишечной палочки серотипа O8, а также отмечено превышение КМАФАнМ, что превышает допустимую норму. Выделены условно-патогенные микроорганизмы из исследуемых проб рыб, пораженных описторхозом с ИИ более