

УДК 619:579.842

## ПРИГОТОВЛЕНИЕ САЛЬМОНЕЛЛЕЗНО - ПАСТЕРЕЛЛЕЗНОГО АНТИГЕНА ИЗ КУЛЬТУР, ВЫРАЩЕННЫХ В РАЗЛИЧНЫХ СРЕДАХ

**Медведев А.П., Даровских С.В., Кошнерова Л.А., Масейкова Я.С., Жаков В.М.**  
УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»  
г. Витебск, Республика Беларусь

*Показана возможность приготовления качественного сальмонеллезно-пастереллезного антигена из культур, выращенных в питательной среде из непищевого сырья и его пригодность для гипериммунизации волов-производителей специфической лечебно-профилактической сыворотки.*

*The possibility of making qualitative Salmonella-pasteurellosis antigen from cultures grown in a culture of non-food raw material and its suitability for hyperimmunization cattle-producing specific preventive and curative serum.*

**Введение.** Промышленное производство специфических диагностических и лечебно-профилактических ветеринарных препаратов диктует необходимость получения качественных питательных сред и создания оптимальных условий для культивирования микроорганизмов. Питательные среды, особенно жидкие, широко применяют в промышленной микробиологии с целью получения витаминов, ферментов, ростовых веществ, кислот и других продуктов, необходимых в практической деятельности человека.

Отечественная микробиологическая промышленность опирается на относительно узкий круг питательных сред. В основном, в биологической промышленности для культивирования большинства патогенных микроорганизмов бактериальной природы используют бульон Хоттингера, приготовленный из перевара Хоттингера.

Обычно перевар получают из говядины II категории, что экономически не выгодно. Поэтому замена мяса непищевым сырьем при получении питательных сред имеет существенное значение в снижении их себестоимости и, следовательно, выращиваемых культур бактерий и препаратов, приготавливаемых на основе биомассы этих культур.

В связи с проведением научно-исследовательской работы по приготовлению ассоциированной лечебно-профилактической сыворотки против сальмонеллеза и пастереллеза крупного рогатого скота появилась потребность получения сальмонеллезно-пастереллезного антигена для гипериммунизации волов-производителей упомянутой сыворотки. Для приготовления этого антигена необходимы культуры сальмонелл и пастерелл, получаемые путем выращивания бактерий в жидких питательных средах. Поэтому мы решили приготовить питательную среду (бульон Хоттингера) из говядины II категории и непищевого сырья – мяса вынуждено убитых животных, которое подлежало утилизации.

Поэтому целью работы явилось выращивание сальмонелл и пастерелл в средах, приготовленных из различного сырья, получение из выращенных культур ассоциированного антигена и определение его пригодности для гипериммунизации волов-производителей специфической лечебно-профилактической сыворотки.

**Материалы и методы.** Для культивирования сальмонелл и пастерелл готовили питательные среды из говядины II категории и мяса вынуждено убитых животных, подлежащее утилизации. Мясо освобождали от костей, жировой клетчатки, пропускали через мясорубку, получали фарш. На 1 кг фарша добавляли 1,5 литра дистиллированной воды, подогретой до 40-42°C, тщательно перемешивали и подщелачивали 10%-ным раствором едкого натрия гидроксида до pH 7,8-8,0. На 1 литр смеси добавляли 30 г. панкреатина, 80 см<sup>3</sup> химически чистого хлороформа и оставляли для переваривания при температуре 40-42°C, которое вели в течении 4-5 суток.

В процессе переваривания смесь ежедневно перемешивали, определяли pH и подщелачивали перевар до 7,8-8,0 10%-ным раствором NaOH. По истечении срока переваривания фарш превращался в рыхлый сероватый осадок над которым верхний слой жидкости имел соломенно-желтый цвет. Этот слой жидкости представлял собой перевар Хоттингера из которого готовили бульон Хоттингера по общепринятой в микробиологической практике методике.

Нами был приготовлен бульон Хоттингера из пищевого (мясо говядины II категории) и непищевого сырья (мясо подлежащее утилизации).

Для получения сальмонеллезных бульонных культур были взяты штаммы сальмонелл S. dublin 373, S. typhimurium 371, а для получения пастереллезных культур - P. multocida за № 656, 798, 877, 5264.

Прежде, чем нарастить необходимое количество биомассы сальмонелл и пастерелл для составления сальмонеллезно-пастереллезного антигена, мы определили морфологические, тинкториальные, культуральные, ферментативные и антигенные свойства бактерий на их соответствие паспортным данным.

Морфологические и тинкториальные свойства бактерий определяли путем микроскопии препаратов-мазков, окрашенных по Граму.

Штаммы сальмонелл и пастерелл высевали на питательные среды и по характеру их роста судили о культуральных свойствах бактерий.

Биохимические свойства микробов определяли по их способности ферментировать моно-, полисахариды и многоатомные спирты.

Антигенную структуру сальмонелл устанавливали с помощью набора O- и H-агглютинирующих сывороток в РА на стекле в соответствии с наставлением по их применению.

Убедившись в соответствии производственных штаммов сальмонелл и пастерелл паспортным данным, их высевали на питательные среды, приготовленные из качественной говядины и мяса, подлежащего утилизации.

Перед засевом бактерий определяли pH питательных сред, корректируя значение этого показателя в пределах 7,2-7,4 10%-ным раствором NaOH.

Культивирование бактерий вели в течение 20-24 часов, постоянно перемешивая растущие культуры.

Выращенные культуры сальмонелл и пастерелл инактивировали формалином в течение 35 суток при 37°C.

Для составления ассоциированного антигена инактивированные культуры смешивали в соотношении: 2 части культур сальмонелл и 3 части культур пастерелл.

Из культур, выращенных в бульоне Хоттингера, приготовленном из говядины II категории была составлена серия антигена №1, а из культур, выращенных в бульоне, полученном из непищевого сырья – серия №2.

Антиген опытных серий проверили на стерильность, безвредность и активность.

Проверку на стерильность проводили путем высева антигена на питательные среды (МПА, МПБ, МППБ под вазелиновым маслом, среда Сабуро) с последующим выдерживанием их в термостате при 37-38°C в течение 10 суток. Среду Сабуро выдерживали в термостате, поддерживающем температуру 20-22°C. При отсутствии видимого роста бактерий антиген считали стерильным.

Безвредность приготовленных антигенов определяли на мышах и морских свинках. Белым мышам, массой 16-18 г. антиген вводили подкожно в области спины в дозе 0,5 см<sup>3</sup>, а морским свинкам массой 350г. – подкожно в области живота в дозе 3 см<sup>3</sup>. На каждую серию антигена использовали по 5 животных каждого вида. За животными вели наблюдение в течение 10 дней. Если в течение этого срока мышки и морские свинки оставались здоровыми, антиген признавали безвредным.

В качестве тест-модели при определении активности антигенов использовали белых мышей, т.к. мышки весьма чувствительны к сальмонеллам и пастереллам.

Антиген каждой серии вводили мышам внутривентриально, однократно, в дозах: 0,1; 0,2 и 0,3 см<sup>3</sup>, используя на каждую дозу по 10 животных, через 14 суток после введения мышек заражали заранее подтитрованной смертельной дозой сальмонелл и пастерелл. Одновременно с иммунизированными мышками заражали 10 интактных мышек, которые служили контролем. Активность антигенов проверяли в отношении *S. dublin* 373, *S. typhimurium* 371 и *P. multocida* 877. За опытными животными наблюдали в течение 10 суток, отмечая павших и выживших.

**Результаты исследований.** В результате проведенной опытной работы было установлено следующее. В поле зрения микроскопа сальмонеллы представляли собой грамтрицательные палочки с закругленными концами, располагающиеся одиночно, попарно, небольшими кучками неопределенной формы. При росте в бульоне Хоттингера вызывали его помутнение с образованием значительного осадка. На поверхности мясо-пептонного агара бактерии образовывали круглые с ровными краями колонии серо-белого цвета размером от 2 до 3 мм в диаметре. На поверхности висмут-сульфитного агара колонии были такого же размера, но черного цвета. В средах Гисса с углеводами и спиртами сальмонеллы ферментировали с образованием кислоты и газа глюкозу, манит, дульцит и не изменяли лактозу, сахарозу, раффинозу. Бактерии не свертывали молоко, не образовывали индол.

Антигенная структура каждого сероварианта бактерий выражалась следующими антигенными формулами: *S. dublin* – 0-1,2,9,12; H-g, p; *S. typhimurium* – 0-1,4,12; H-i и 1,2.

Пастереллы в препаратах-мазках представляли собой короткие, мелкие, овоидные грамтрицательные палочки, располагающиеся одиночно, парами, скоплениями и в виде коротких цепочек.

В бульоне Хоттингера бактерии в процессе роста и размножения вызывали помутнение среды, выпадение незначительного осадка, который при встряхивании пробирки поднимался в виде «косички».

На поверхности МПА пастереллы формировали круглые, выпуклые, серо-белого цвета колонии, напоминающие капельки росы.

Пастереллы при посеве в среды Гисса ферментировали с образованием кислоты глюкозу, сахарозу, манит, сорбит и не расщепляли лактозу, дульцит, адонит. Бактерии не разжижали желатин, не вызывали гемолиза на кровяном агаре, давали положительную пробу на каталазу, не свертывали молоко, не восстанавливали нитраты в нитриты.

Нами установлено, что концентрация сальмонелл и пастерелл при выращивании их в бульоне Хоттингера, приготовленном из различного сырья, была практически равнозначной. Так концентрация сальмонелл, выращенных в бульоне Хоттингера, приготовленном из говядины II категории составила 18 млрд. м.к./см<sup>3</sup>, в бульоне из непищевого сырья – 17,5 млрд. м.к./см<sup>3</sup>, а концентрация пастерелл, соответственно, 7 и 6,5 млрд. м.к./см<sup>3</sup>.

Ассоциированный сальмонеллезно-пастереллезный антиген, составленный из культур бактерий, выращенных в различных питательных средах, выдержал проверку на стерильность, т.е. засеянные им питательные среды не дали видимого роста микроорганизмов в течение 10 суток выдерживания их в термостате.

При проверке безвредности было установлено, что мышки и морские свинки, получившие антиген, как первой, так и второй опытных серий оставались клинически здоровыми в течение 10 дней наблюдения за ними, что явилось свидетельством безвредности полученных антигенов.

При определении превентивной активности антигена первой серии в отношении *S. dublin* были получены следующие результаты. Антиген в дозе 0,1 см<sup>3</sup> защищал от гибели 5 мышек из 10, взятых в опыт, в дозе 0,2 см<sup>3</sup> – 8 мышек, а животные, получившие 0,3 см<sup>3</sup> антигена – выжили все, в то время как 10 контрольных мышек погибли. При определении активности антигена этой же серии в отношении *S. typhimurium* было установлено, что антиген в дозе 0,1 см<sup>3</sup> предохранял от падежа 6 мышек из 10 иммунизированных, в дозе 0,2 см<sup>3</sup> – 8 особей, в дозе 0,3 см<sup>3</sup> – 9 мышек при гибели 9 животных из 10 контрольных.

При контроле на активность антигена первой опытной серии в отношении *P. multocida* оказалось, что антиген в дозе 0,1 см<sup>3</sup> предохраняет гибель 5 из 10-ти иммунизированных мышей, в дозе 0,2 см<sup>3</sup> – 7 мышек, в дозе 0,3 см<sup>3</sup> – 9 мышей при гибели всех контрольных животных.

Примерно, такие же данные получены при испытании активности антигена второй серии в отношении *S. dublin*, *S. typhimurium* и *P. multocida*. Необходимо упомянуть, что антиген этой серии составлен из культур сальмонелл и пастерелл, выращенных в бульоне Хоттингера, приготовленном из непищевого сырья, т.е. мяса говядины, как продукта, непригодного в пищу людям.

**Заключение.** Нами установлено, что производственные штаммы сальмонелл и пастерелл отвечали паспортным данным и были типичными по морфологическим, тинкторальным, культуральным, биохимическим и антигенным свойствам соответствующим видам и серовариантам семейств Enterobacteriaceae и Pasteurellaceae.

Для культивирования сальмонелл и пастерелл был приготовлен бульон Хоттингера из говяжьего мяса II категории и непищевого сырья – говяжьего мяса, подлежащего утилизации. При выращивании бактерий в питательных средах, приготовленных из различного сырья, концентрация их оказалась практически одинаковой. Это свидетельствует о возможности приготовления питательных сред из непищевого сырья и использования их в практике культивирования сальмонелл и пастерелл.

Из культур бактерий, выращенных в различных средах и инактивированных формалином, был сконструирован сальмонеллезно-пастереллезный антиген, который проконтролирован на стерильность, безвредность и активность.

Антиген опытных серий №1 и №2 оказался стерильным и безвредным.

Бактерии (*S. dublin*, *S. typhimurium* и *P. multocida*), входящие в состав антигена, выращенные в бульоне Хоттингера, приготовленном из непищевого сырья, не утрачивали своей иммуногенности и вызывали в организме мышей формирование иммунитета такого же уровня, что и бактерии, выращенные в бульоне, полученном из качественного говяжьего мяса II категории.

Антиген серии №2, так же как антиген серии №1, признан нами пригодным для гипериммунизации волов-продуцентов лечебно-профилактической сыворотки против сальмонеллеза и пастереллеза крупного рогатого скота.

Таким образом, проведенная опытная работа свидетельствует о возможности приготовления стерильного безвредного и активного сальмонеллезно-пастереллезного антигена из производственных штаммов сальмонелл и пастерелл, выращенных в питательной среде полученной из непищевого сырья.

**Литература:** 1. Афанасенко, В.И. Меры борьбы и профилактики при ассоциативных инфекциях животных/ В.И. Афанасенко, А.П. Красиков// Актуальные проблемы инфекционных, паразитарных и незаразных болезней домашних животных и меры борьбы с ними: сборник научных трудов. - Омск, 1998.-С.24-26. 2. Леев, С.В. Профилактика и диагностика болезней сельскохозяйственных животных /С.В. Леев, Ю.А. Малахов, В.В. Шорохов //Сборник научных трудов ВГНКИ. - Москва, 2001.-Т.62.-С.52-57. 3. 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.

Статья передана в печать 3.01.2011 г.

УДК 619:616.98.579:573

#### СПОСОБ СНИЖЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИИ ЛИПИДОВ В ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ СЫВОРОТКЕ ПРОТИВ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА И ПАСТЕРЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

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

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

*Разработан простой, технологичный, приемлемый для сыровоточного производства способ снижения содержания общих липидов в лечебно – профилактической сыворотке против сальмонеллеза и пастереллеза крупного рогатого скота.*

*An uncomplicated, technology simple, available procedure for serum manufacturing has been developed which enables a reduced number of lipids in the result serum against bovine salmonellosis and pasteurellosis.*

**Введение.** Липиды – органические вещества, которые наряду с углеводами и белками, входят в состав тканей и жидкостей животных и растений. Липиды различаются по своей структуре, составу и свойствам. Они не растворимы в воде, но растворяются в спиртоле, хлороформе, бензоле, эфире и других органических растворителях.

Липиды играют важную роль в организме животных. Они служат энергетическим материалом, участвуют в процессах тканевой проницаемости, являются хорошими растворителями для отдельных витаминов и обеспечивают их накопление в организме.

В тканях и жидкостях животных липиды находятся как в свободном состоянии, так и в виде соединений с белками, углеводами и между собою.

Известно, что в состав лечебно – профилактической сыворотки против сальмонеллеза и пастереллеза крупного рогатого скота кроме специфических антител входят ряд компонентов таких как белки, общие липиды и их фракции. Незначительная часть белков гипериммунной сыворотки связана с антителами, большая же часть их, как и другие компоненты, в том числе и общие липиды не отвечают за активность препарата и являются балластом.

При применении препарата неспецифические белки инициируют в организме синтез антиглобулинов, снижающих профилактический и лечебный эффект, а липиды вызывают при хранении сыворотки связывание с ними специфических белков, ее помутнение, образование осадка, что отрицательно влияет на качество биопрепарата и его товарный вид.

Известен способ осветления сывороток против других инфекций заключающийся в добавлении к ним 5% порошкообразного полиэтиленгликоля и последующим тщательным перемешиванием, отстаем их и фильтрацией. Однако, этот способ обеспечивает только осаждение балластных белков, а не освобождает сыворотки от липидов.