

УДК 619:579.841.94:615.28

ПРИМЕНЕНИЕ ТЕОТРОПИНА В КАЧЕСТВЕ ИНАКТИВАНТА КУЛЬТУР БОРДЕТЕЛЛ

Вербицкий А.А., Медведев А.П.

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

*В статье показана эффективность применения теотропина в качестве инактиванта культур бордетелл, установлены бактерицидная и бактериостатическая активность вещества, его оптимальные дозы и продолжительность воздействия на культуры, обеспечивающие полную инактивацию бактерий и их токсинов. **Ключевые слова:** бордетеллы, культура, инактивант, теотропин, бактерицидная активность, бактериостатическая активность.*

THE USE OF THYOTROPIN AS AN INACTIVANT OF BORDETELLA CULTURES

Verbitsky A.A., Medvedev A.P.

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

*The article shows effectiveness of thyotropin as an inactivant of Bordetella cultures, the antibacterial effect has been determined, its optimal dosage and exposition on cultures fully inactivating of the bacterium and its toxins. **Key-words:** Bordetella, culture, inactivant, thyotropin, bactericidal activity, bacteriastatic activity.*

Введение. Специфическую профилактику многих болезней бактериальной и вирусной природы осуществляют инактивированными вакцинами. При производстве этих препаратов в качестве инактиванта культур микроорганизмов традиционно используют формалин. Например, для инактивации сальмонелл и их токсинов допускается формалин, содержащий не менее 36% формальдегида. К культуре сальмонелл добавляют 0,3-0,4% формалина и процесс инактивации проводят в течение 20-25 суток при периодическом перемешивании культуры. Однако формалин обладает токсичностью, реактогенностью, иммунодепрессивностью. К тому же это вещество может нарушать антигенную структуру инактивируемых бактерий и, в этой связи, снижать иммуногенную активность бактериальных антигенов в составе препаратов для специфической профилактики инфекционных болезней. Процесс инактивации культур микроорганизмов зависит не только от инактивирующей способности применяемого вещества, но и от продолжительности воздействия его на бактерии, концентрации бакмассы, температуры проведения процесса, т.е. режима инактивации.

Для инактивации культур бактерий применяют различные физические и химические средства: нагревание, ультрафиолетовые лучи, ацетон, спирт, тиомерсал и т.д. Например, при получении анатоксинов были апробированы метиленовая синь, нингидрин, β-пропилактон, тирозин, глюкуроновая кислота, гидроксилламин и другие. К сожалению, эти вещества обладают мутагенным и токсическим действием, что ограничивает их применение в качестве инактивантов.

Поэтому целью нашей работы явилась апробация теотропина в качестве инактиванта культур бордетелл, предназначенных для изготовления инактивированных вакцин.

Материалы и методы исследований. Для инактивации выращенных культур бордетелл использовали теотропин. Это вещество представляет собой порошок желтоватого цвета со слабым специфическим запахом, стабильно при хранении и нагревании, т.е. не утрачивает своих свойств при нагревании до 196°C и хранении при температуре 40°C в течение 10 лет. Теотропин хорошо растворим в воде, спирте, ацетоне. Он не раздражает кожу, слизистые оболочки глаз, дыхательных путей, мочеполовой системы. Отсутствие раздражающего и токсического действия теотропина на ткани животного делает его перспективным препаратом в качестве средства для инактивации вакцинных штаммов бордетелл при получении специфических препаратов против бордетеллеза свиней.

При проведении опытной работы использовали холодильник бытовой, микроскоп МБИ-2, центрифугу лабораторную ЦЛС-3, весы чашечные с разновесами, водяную баню, пипетки пастеровские, стекла предметные и покровные, пробирки, чашки Петри, анилиновые краски для окрашивания бактерий по Граму, жидкие и плотные питательные среды, стандарты мутности на 0,5 и 1,0 млрд. микробных клеток.

Бактерии штамма *B. bronchiseptica* «КМИЭВ-В120» хранили в запаянных пипетках в полужидкой среде в холодильнике при температуре +2°C. Репродукцию штамма проводили путем высева бактерий в жидкую цитратно-дрожжевую среду и выдерживания ее в термостате при температуре

36-37°C в течение 24 часов. Морфологию бордетелл определяли путем микроскопии препаратов-мазков, окрашенных по Граму.

Для определения культуральных свойств бордетелл их высевали в жидкие среды (мясопептонный бульон, цитратно-дрожжевую среду, бульон Хоттингера), в мясопептонный полужидкий агар, на поверхность плотного мясопептонного агара и вели выращивание бактерий при 37°C в течение суток, а затем определяли характер их роста на питательных средах.

Биохимическую активность бордетелл определяли методами, общепринятыми в микробиологической практике, используя жидкие, полужидкие среды Гисса и другие.

Антигенную структуру бактерий изучали в реакции агглютинации, которую ставили классическим пробирочным методом с применением специфической диагностической сыворотки.

Опытную работу по инаktivации культуры бордетелл проводили с культурами бактерий, выращенных в жидкой цитратно-дрожжевой среде. Инаktivацию производили в термостате при температуре 37-38°C в течение 20 часов. Теотропин к культурам добавляли в количестве 5 мг/см³, 10 мг/см³ и 12 мг/см³.

Бактерицидную и бактериостатическую активность теотропина изучали путем визуального сравнения характера роста бактерий в средах с добавлением вещества и в контрольных средах без его добавления. Для более объективной оценки интенсивности роста бактерий в средах определяли их концентрацию при помощи стандарта мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Кроме этого, из пробирок, в которых наблюдали отсутствие роста, делали высевы в жидкие питательные среды с последующим выдерживанием их в термостате при 37°C в течение 10 суток, чтобы убедиться в полной инаktivации микроорганизмов и подтвердить высокую бактерицидную активность теотропина. Полноту инаktivации токсинов бордетелл определяли на белых мышах массой 16-18 г. Культуры бактерий, после добавления к ним теотропина и отсутствия в них видимого роста, вводили мышам внутрибрюшинно в дозе 0,5 см³, затем вели наблюдение за ними в течение 48 часов. Токсины бордетелл считали полностью инаktivированными, если мыши оставались здоровыми в течение срока наблюдения.

Результаты исследований. Выполненная опытная работа позволила получить следующие результаты.

Бактерии *B. bronchiseptica* на препаратах-мазках в поле зрения светового микроскопа представляли собой грамтрицательные коккообразные биполярно окрашенные палочки размером 0,4-0,6x1,5-2,5 мкм.

В жидких питательных средах бордетеллы росли хорошо, вызывая помутнение их с образованием осадка и пристеночного кольца. Более интенсивный рост бордетелл нами отмечен в цитратно-дрожжевой среде и менее значительный – в мясопептонном бульоне и среде Хоттингера.

На мясопептонном агаре бактерии формировали гладкие, полупрозрачные, блестящие колонии диаметром 0,2-0,4 мм, которые через 48-72 часов культивирования приобретали серо-белый цвет. При определении биохимических свойств было выявлено полное отсутствие активности к сахарам и многоатомным спиртам. Однако бактерии редуцировали нитриты в нитраты, продуцировали уреазу, оксидазу, каталазу.

В реакции агглютинации бордетеллы со специфической диагностической сывороткой давали положительную реакцию с оценкой в два креста в разведении 1:200, что свидетельствует о принадлежности бактерий к виду *B. bronchiseptica*.

Результаты определения бактерицидной и бактериостатической активности теотропина в отношении бордетелл представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Бактерицидное и бактериостатическое действие теотропина на бактерии штамма *B. bronchiseptica* «КМИЭВ-В120» в зависимости от дозы инаktivанта и экспозиции

Доза теотропина	Экспозиция (часов)									
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
5 мг/см ³	-	-	-	±	±	±	±	±	±	±
10 мг/см ³	-	-	±	±	±	±	±	±	+	+
12 мг/см ³	-	±	±	±	±	±	±	±	+	+

Примечания:

«-» - не оказывает бактериостатического и бактерицидного действия;

«+» - бактерицидное действие;

«±» - бактериостатическое действие.

Из таблицы 1 видно, что теотропин при добавлении к культуре бордетелл в дозе 5 мг/см³ в течение 6 часов не оказывает ни бактерицидного, ни бактериостатического действия. Лишь при 8-часовой экспозиции и в последующие сроки воздействия теотропина на бордетеллы установлено бактериостатическое действие вещества и отсутствие бактерицидного действия, т.е. инаktivант в упомянутой дозе не вызывает гибели бактерий.

Теотропин в дозе 10 мг/см³, внесенный в культуру бордетелл, через 6 часов экспозиции начинает оказывать бактериостатическое действие на микроорганизмы и спустя 18 часов контакта с бактериями вызывает их полную инаktivацию.

Данные таблицы 1 свидетельствуют, что теотропин, добавленный к культуре бордетелл из расчета 12 мг/см³, через 4 часа контакта с микробами оказывает на них бактериостатическое действие, а через 16 часов полностью вызывает гибель бактерий.

При сравнительной оценке роста бактерий в средах с добавлением теотропина и без его добавления установлено следующее. При внесении в среду вещества в количестве 5 мг/см³ концен-

трация бордетелл составила $1,5 \text{ млрд м.к/см}^3$, 10 мг/см^3 – 1 млрд м.к/см^3 , 12 мг/см^3 – $0,5 \text{ млрд м.к/см}^3$, в то время, как концентрация микробных клеток в контрольных средах составила 4 млрд м.к/см^3 .

Для определения полноты инактивации токсинов бордетелл использовали культуры с добавлением теотропина 10 мг/см^3 и 12 мг/см^3 с экспозицией инактивации 16, 18 и 20 часов, в которых микробные клетки были полностью инактивированы.

Белым мышам массой 16/18 г вводили внутривентриально по $0,5 \text{ см}^3$ указанных культур бордетелл и вели за ними наблюдение в течение 48 часов. В течение этого срока мыши оставались подвижными, охотно принимали корм и воду, т.е. были здоровыми, что являлось свидетельством инактивации теотропином токсинов бордетелл.

Заключение. Полученные в процессе опытной работы данные позволяют заключить, что при добавлении теотропина к культурам бордетелл из расчета 5 мг/см^3 и продолжительности инактивации от 8 до 20 часов вещество оказывает на микроорганизмы бактериостатическое действие, но не проявляет бактерицидной активности.

Теотропин, добавленный к культурам бордетелл в дозе 10 мг/см^3 , в первые четыре часа контакта с микробами не оказывает бактерицидного и бактериостатического действия на них и только спустя 6 часов действует бактериостатически, а через 18 часов наблюдается полная инактивация бактерий.

При внесении инактиванта в культуры бордетелл из расчета 12 мг/см^3 наблюдается бактериостатическая активность вещества через 2 часа контакта его с бактериями, а через 16 часов регистрируется бактерицидная активность теотропина, проявляющаяся полной гибелью микроорганизмов.

Теотропин полностью инактивирует токсины бактерий при добавлении его к культурам бордетелл в дозе 10 мг/см^3 через 18 часов воздействия вещества, а в дозе 12 мг/см^3 – 16 часов контакта инактиванта с токсинами.

Следовательно, теотропин обладает способностью инактивировать бордетеллы и их токсины, что свидетельствует о возможности применения вещества в качестве инактиванта бордетеллезных культур, предназначенных для приготовления препаратов для иммунизации животных против бордетеллеза.

Литература. 1. Александрова, М. А. Влияние температуры и времени ее воздействия на стабильность пастереллезной культуры / М. А. Александрова // Передовой науч. - произв. опыт в биологической промышленности: экспресс-информация. – Москва, 1984. – С. 6 - 7. 2. Амосова, Л. А. Разработка способа получения поверхностных протективных антигенов *S. dublin*, *S. typhimurium* при помощи солянокислого гидроксилламина и мочевины для изготовления компонентов вакцины против сальмонеллеза крупного рогатого скота / Л. А. Амосова, Ю. В. Ломако, Н. В. Москалева // Весці Нацыянальнай акадэміі навук Беларусі. Сер. аграрных навук. – 2009. – №4. – С. 86 - 91. 3. Бакулов, И. А. Эпизоотология с микробиологией: учебник для студентов средних специальных учебных заведений / И. А. Бакулов, В. А. Ведерников, А. Л. Семенухин; под ред. И. А. Бакулова. – 2-е изд., стереотип. – Москва: Колос, 2000. – 481 с.: ил. 4. Бирюченко, Д. А. Инактивация *Actinobacillus pleuropneumoniae* формальдегидом / Д. А. Бирюченко, В. С. Русалеев, А. П. Понаморев // Ветеринарная патология. – 2007. – №4. – С. 59 - 63. 5. Борисович, Ю. Ф. Ветеринарные препараты: справочник / Ю. Ф., Л. В. Кириллов; под ред. Д. Ф. Осидзе. – Москва: Колос, 1981. – 448 с.: ил. 6. Бушуева, Н. Б. Инактивация микроорганизмов при производстве бактериальных вакцин / Н. Б. Бушуева // Аграрная наука. – 1998. №1. – С. 20 - 21. 7. Воробьев, А. А. Анатоксины / А. А. Воробьев, Н. Н. Васильев, А. Г. Кравченко. – Москва: Медицина, 1965. – 488 с. 8. Вендон, Ю. З. Использование гидроксилламина для изготовления вирусных инактивированных антигенов / Ю. З. Вендон // Вопросы вирусологии. – 1966. – № 4. – С. 483 - 487. 9. Дмитриев, Б. А. Проблемы и перспективы создания синтетических вакцин / Б. А. Дмитриев // Иммунология. – 1986. – № 1. – С. 24 - 29. 10. Кирилова, В. В. Принципы отбора штаммов для изготовления инактивированных вакцин / В. В. Кирилова // Эпизоотология, эпидемиология, средства диагностики и специфической профилактики инфекционных болезней общих для человека и животных: материалы Всесоюзной конференции. – Москва, 1988. – С. 278-279. 11. Кленова, И. Ф. Ветеринарные препараты в России: справочник / И. Ф. Кленова, Н. А. Яременко. – Москва: Сельхозиздат, 2000. – 554 с. 12. Колотилова, Т. Г. Инактивация сальмонелл и пастерелл димером этиленмина: автореф. дис. канд. вет. наук / Т. Г. Колотилова. – Владимир, 2001. – 21 с. 13. Костина, Г. И. К вопросу о механизмах химической инактивации микроорганизмов / Г. И. Костина // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. – 1981. – №8. – С. 25 - 32. 14. Медведев, А. П. Инактивация сальмонелл димером этиленмина / А. П. Медведев, Т. П. Иванова, С. В. Даровских // Ученые записки учреждения образования «Витебская государственная академия ветеринарной медицины»: научно-практический журнал. – Витебск: УО ВГАВМ, 2005. – 41, вып. 2, ч. 1. – С. 36-37. 15. Медведев, А. П. Основы получения противобактериальных вакцин и сывороток: монография / А. П. Медведев, А. А. Вербицкий: Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск: ВГАВМ, 2010. – 196 с. 16. Медведев, А. П. Противобактериальные лечебно-профилактические сыворотки / А. П. Медведев. – Витебск: УО ВГАВМ, 2007. – 379 с. 17. Медуницын, Н. В. Вакцинология / Н. В. Медуницын. – Москва: Триада-Х, 1999. – 272 с. – Библиогр.: 272 с. 18. Орехов, Д. А. Использование аминоксиленимина при конструировании липосомальной вакцины против колибактериоза птиц / Д. А. Орехов [и др.] // Ветеринарная патология. – 2007. – №2 – С. 66 - 69. 19. Расчинкина, А. С. Действие гидроксилламина и его аналогов О-метилгидроксилламина и N-метилгидроксилламина на бактерии *E. coli*: автореф. дис...канд. биол. наук: 03.096 / А. С. Расчинкина; БГУ. – Минск, 1971. – 21 с. 20. Русалеев, В. С. [и др.] Инактивация бактерий *Haemophilus parasuis* диаметром, этиленмина и формалином / Болезни диких животных // Всерос. науч. – исслед. ин-т ветер. вирусологии и микробиологии. – Псков, 2004. – С. 172-174. 21. Семенова, Г. М. Инактивация бактерий *Haemophilus parasuis* формалином и аминоксиленимином / Г. М. Семенова, А. В. Городенцев, Н. Б. Шадрова // Сибирская язва и другие опасные инфекционные болезни животных / Всероссийский научн. – исслед. институт ветеринарной вирусологии и микробиологии. – Псков, 2005. – С. 240 – 244.

Статья передана в печать 06.02.2018 г.