

трехслойный капсид без оболочки. Каждый сегмент РНК – это ген, который кодирует один белок, исключение составляют гены 9 и 11, которые кодируют по 2 протеина.

Литература. 1. *Rotavirus Replication: Plus-Sense Templates for Double-Stranded RNA Synthesis Are Made in Viroplasm/Lynn S. Silvestri, Zenobia F. Taraporewala// J Virol. 2004 July; 78(14): 7763–7774.* 2. *Genome Heterogeneity of SA11 Rotavirus Due to Reassortment with "O" Agent /Catie Small, Mario Barro, Thomas L. Brown, and John T. Patton //Virology. 2007 March 15; 359(2): 415–424.* 3. *Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments /JelleMatthijnssens, Max Clarlet, MustafizurRahman, HoussamAttoul, KrisztiánBányai, Mary K. Estes, Jon R. Gentsch, Mirenturrisa-Gómara, Carl Kirkwood, Vito Martella, Peter P.C. Mertens, Osamu Nakagomi, John T. Patton, Franco M. Ruggeri, Linda J. Saif, Norma Santos, Andrej Steyer, Koki Taniguchi, Ulrich Desselberger, Marc Van Ranst //Arch Virol. 2008; 153(8): 1621–1629.* 4. *Expression of two bovine rotavirus non-structural proteins (NSP2, NSP3) in the baculovirus system and production of monoclonal antibodies directed against the expressed proteins / Aponte C., Mattlon N.M., Estes M.K., Charpilienne A., Cohen J. // Arch. Virol. 133:85-95(1993).* 5. *Bovine rotavirus RF gene 10 encoding NSP4 / Charpilienne A., Enouf V., Cohen J. //EMBL/GenBank/DBJ databasesMAY-2002*

УДК 619:615.373.

ОСВЕТЛЕНИЕ И СТЕРИЛИЗУЮЩАЯ ФИЛЬТРАЦИЯ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ СЫВОРОТКИ ПРОТИВ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА ЖИВОТНЫХ

Медведев А.П., Даровских С.В., Жаков В.М., Даровских И.А., Огурцова К.А.

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

Показана возможность осветления сыворотки против сальмонеллеза животных путем сепарации. Фильтрация сыворотки с применением бактериальных фильтров обеспечивает ее стерильность.

It has been shown the method for clarifying the immune serum against salmonellosis. The serum filtration through bacterial filters results in its sterility.

Введение. Лечебно-профилактические сыворотки и выделяемые из них иммуноглобулины применяют с целью экстренной профилактики многих болезней и лечения человека и животных. Например, в практике здравоохранения немаловажное значение имеет сыворотка против дифтерии, столбняка, ботулизма и другие. В ветеринарии для профилактики инфекций и лечения животных используют гипериммунные сыворотки против рожи, эшерихиоза, лептоспироза, сальмонеллеза и других болезней.

Лечебно-профилактические сыворотки содержат готовые антитела, поэтому пассивный иммунитет у людей и животных наступает практически незамедлительно при их введении. Ценность сывороток заключается еще и в том, что сывороточные белки пополняют организм энергетическими и пластическими веществами, оказывают неспецифическое действие на организм, повышают его тонус и способствуют выздоровлению больного.

УП «Витебская биофабрика» для нужд животноводства выпускает сыворотку против рожи, эшерихиоза, пастереллеза и сальмонеллеза.

Поливалентную антитоксическую сыворотку против сальмонеллеза телят, поросят и птиц изготавливают в сывороточном цехе фабрики из крови волов-производителей, гипериммунизируемых антигеном, в состав которого входят сальмонеллы, чаще всего поражающие животных различных видов в хозяйствах страны. У производителей берут кровь, сепарированием отделяют эритроциты, дефибринируют плазму, получают сыворотку. С целью осветления сыворотки ее отстаивают и подвергают фильтрованию через многорамные фильтры с пластинами марки «Ф», а с целью стерилизующей фильтрации пропускают через пластины «СФ». В силу того, что сыворотка термолабильна единственным пока еще промышленным способом ее стерилизации является фильтрация.

Существующая технология осветления сыворотки имеет ряд недостатков. Основными из них являются следующие: значительная продолжительность отстоя (2 месяца), потери сыворотки при отстое и при фильтрации через многорамные фильтры с пластинами «Ф», трудоемкость подготовительных операций, связанная с монтажом и демонтажом 79-рамных фильтров, относительно невысокая производительность фильтрования, значительные материальные затраты при использовании фильтрующих пластин одноразового действия.

Поэтому целью нашей работы явилась апробация возможности осветления сыворотки с применением сепараторов и последующей стерилизации ее с помощью бактериальных фильтров.

Материалы и методы. В опытной работе использованы поливалентная антитоксическая сыворотка против сальмонеллеза телят, поросят и птиц, пластинчатый теплообменник, емкости – отстойники, сепаратор-осветлитель ОЦМ-10, сепаратор-разделитель ОСТ -3, ФЭК-56Н, SM-фильтры фирмы «Миллипор», питательные среды (МПБ, МПА, МППБ, Сабуро), белые мышки, морские свинки.

Предварительно нами был проанализирован литературный материал относительно физических свойств дисперсных фаз сыворотки. Известно, что неосветленная сыворотка, как гетерогенная жидкая система является эмульсией. Неосветленная сыворотка содержит балластные белки в количестве 0,6-1%, выпадающие в осадок в течение 2-х месячного отстоя. В сыворотке во взвешенном состоянии в виде тонкодисперсной фазы находится жировая фракция в количестве 0,34-0,4%, а также микроорганизмы. Целью осветления являлась удаление из сыворотки балластных белков, жировой фракции, микроорганизмов.

Плотность сыворотки – 1,024 г/см³, плотность балластных белков – 1,28 г/см³, плотность липидной фракции – 0,9 г/см³, вязкость сыворотки – 1,55 – 1,57 Пз, плотность бактерий – 1,01-1,4 г/см³, размеры микроорганизмов – 0,5-5 мкм.

Эти данные относительно физических свойств дисперсных фаз сыворотки свидетельствуют о принципиальной возможности осветления ее методом сепарации.

Сыворотку из емкости отстойника подавали в пластинчатый теплообменник для подогрева ее до температуры 25-30°C, затем на сепаратор-осветлитель ОЦМ-10 для отделения балластных белков и сепаратор-разделитель ОСТ-3 для отделения тонкодисперсных балластных белков и липидной фракции.

Сыворотку после осветления подвергали стерилизующей фильтрации для чего использовали глубинные и мембранные фильтры.

По окончании фильтрации сыворотку проверяли на стерильность. Для этого ее высевали в пробирки с МПА, МПБ, средой Сабуро, МППБ под вазелиновым маслом и во флаконы с МПБ и МППБ (50-100см³). Посевы выдерживали в термостате в течение 10 суток при температуре 37 - 38°C. Среду Сабуро инкубировали при температуре 18-20°C. Отсутствие видимого роста микроорганизмов на питательных средах считали свидетельством стерильности сыворотки.

Зачастую материал из которого изготавливают фильтрующие пластины, оказывает вредное химическое воздействие на фильтруемую сыворотку. Поэтому мы проводили контроль сыворотки на безвредность. Для этого сыворотку вводили подкожно 5 белым мышкам массой 16-18 г и 3 морским свинкам массой 350-400 г. Мышкам сыворотку инъецировали в дозе 0,5 см³, а морским свинкам – 10 см³. Препарат считали безвредным, если подопытные животные оставались здоровыми в течение 10 суток наблюдения.

Возможно, что фильтрующие пластины, применяемые для стерилизации сыворотки, наряду с задержкой контаминирующих ее микроорганизмов, адсорбируют специфические антитела, а при сепарировании некоторая часть иммуноглобулинов вместе с балластными белками и липидной фракцией удаляются из сыворотки при ее фильтрующей стерилизации, поэтому мы определяли титр специфических антител в реакции агглютинации (РА). РА ставили классическим способом (объемным, пробирочным). Исследуемую сыворотку разводили 1:25, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1:3200. Для разведения сыворотки использовали изотонический раствор хлорида натрия. В качестве антигена применяли стандартный корпускулярный антиген – агглютиноген, т.е. взвесь инактивированных бактерий (диагностикум). Учет РА проводили невооруженным глазом и оценивали интенсивность ее в крестах (плюсах).

Результаты исследований. До сепарирования сыворотки крови титр агглютининов, по результатам РА, составил 1:1600. После определения титра антител сыворотку подогревали в пластинчатом теплообменнике. Было установлено, что наиболее оптимальной температурой для проведения эффективного сепарирования является подогрев сыворотки до 25-30°C. Подогретая сыворотка подавалась в сепаратор-осветлитель ОЦМ-10 и было определено, что после сепарации количество балластных белков снизилось с 1% до 0,5%. При определении концентрации антител в сыворотке после ее сепарации титр агглютининов остался на прежнем уровне, т.е. в разведении 1:1600, реакция агглютинации была оценена нами в три креста. Следовательно, осветление сыворотки путем сепарации не снижает ее агглютинирующей активности.

Затем сыворотку подвергли сепарации в сепараторе-разделителе ОСТ-3 с целью отделения тонкодисперсных балластных белков и липидной фракции. После сепарирования количество балластных белков составило 0,3%, т.е. снизилось на 0,2%, а количество жировой фракции в сыворотке уменьшилось на 0,3%. Титр агглютининов не снизился и после сепарирования ее в сепараторе-разделителе остался на уровне 1:1600 с оценкой интенсивности реакции в титре креста. Следующим этапом в технологии изготовления сыворотки является ее стерилизующая фильтрация. Для стерилизующей фильтрации важное значение имеют выбор фильтрующего материала и система фильтрации. В настоящее время из разнообразных фильтрующих материалов готовят мембранные и глубинные фильтры.

Глубинные фильтры состоят из волокон, частиц или фрагментов, образующих единую массу, в которой имеются извилистые каналы, поры. Размеры пор варьируют и превышают размеры задерживаемых частиц. Однако фильтрующий эффект обеспечивается суммарным действием различных факторов (седиментация, электростатические и Ван-дер-ваальсоновы силы и т.д.). К глубинному типу фильтров относят асбестовые, асбесто-целлюлозные пластины, керамические свечи, мелкопористое стекло и т.д. Фильтрацию с помощью этих фильтров проводят под давлением. Поэтому при увеличении давления микроорганизмы, контаминирующие сыворотку, могут проникнуть через фильтр в фильтрат. Отрицательной характеристикой глубинных фильтров является возможность прорастания микроорганизмов, попавших в матрикс фильтров, токсическое химическое воздействие на сыворотку, снижение титра агглютининов в препарате.

Для фильтрации сыворотки нами были использованы асбестовые пластины и SM-фильтры фирмы «Миллипор». В последнее время довольно широкое распространение получил особый тип ситовых фильтров – мембранные фильтры. Они изготовлены из полимерных материалов, биологически инертны и способны выдерживать высокое давление. В их матриксе задерживается ничтожное количество жидкости и очень мала абсорбционная емкость. Экспериментальным путем установлено, что при фильтровании через мембранные фильтры практически нет потерь. SM-фильтры биологически инертны, не оказывают токсического действия на фильтруемую жидкость, устойчивы к воздействию высоких температур, обладают высокой пропускной способностью.

Перед фильтрацией сыворотки через асбестовые пластины, нами была поставлена пробирочная РА в результате которой установили, что титр антител в препарате составил 1:3200. Затем сыворотку подвергли фильтрации по окончании которой вновь в РА определили агглютинирующую активность препарата. Титр агглютининов снизился до 1:1600, что является свидетельством высокой адсорбционной способности асбестовых фильтров в отношении специфических антител. Кроме определения титра агглютининов мы определили безвредность сыворотки для белых мышей и морских свинок. Для этого 5 белым мышам массой 16-18 г ввели сыворотку подкожно в области спины в дозе 0,5см³, а морским свинкам массой 350-400 г препарат инъецировали подкожно в дозе 10см³ в области брюшной стенки. За лабораторными животными вели наблюдение в течение 10 суток. На протяжении этого срока мыши и морские свинки оставались клинически здоровыми, что свидетельствует о неспособности материала, из которого изготовлены фильтры, дефундировать в сыворотку токсические вещества.

Профильтрованную через асбестовые фильтры сыворотку мы высевали на питательные среды (МПА, МПБ, МППБ под вазелиновым маслом, среду Сабуро). Упомянутые среды, за исключением среды Сабуро, инкубировали в термостате при температуре 37- 38°C в течение 10 суток. Среду Сабуро выдерживали при 18 - 20°C также 10 суток. При визуальном просмотре сред видимого роста микроорганизмов не обнаружено, т.е. сыворотку признавали стерильной.

Фильтрацию сыворотки через мембранные фильтры осуществляли с помощью системы, состоящей из емкости высокого давления, фильтродержателя и мембранных SM-фильтров фирмы «Миллипор». При работе с фильтродержателем диаметром 293 мм с мембранным фильтром типа SM нам удалось за 2 часа простерилизовать 60 литров сыворотки. Профильтрованную через мембранные фильтры сыворотку на стерильность и безвредность не исследовали в связи с тем, что фирма «Миллипор» гарантирует стерильность и биологическую инертность любых фильтруемых жидкостей с применением изготавливаемых ее фильтров.

Заключение. Сепарация позволяет осветлить поливалентную антитоксическую сыворотку против сальмонеллеза телят, поросят и птиц за счет значительного снижения содержания в ней балластных белков и липидных фракций. Применение асбестовых пластин для стерилизующей фильтрации снижает агглютинирующую активность сыворотки ввиду их высокой абсорбционной способности. Из асбестовых фильтров не вымываются в сыворотку вещества, оказывающие на мышей и морских свинок токсическое действие, что подтверждается проверкой безвредности препарата для этих лабораторных животных.

Мембранные фильтры обладают высокой пропускной способностью, являются биологически инертными, исключают потери сыворотки в процессе фильтрации и гарантировано обеспечивают ее стерильность.

Литература. 1.Медведев А.П. Противобактериальные лечебно-профилактические сыворотки: монография/ Медведев А.П.-Витебск:УО ВГАВМ, 2007.-379 с. 2.Масленко Р.И. Основы иммунологии/ Р.И. Масленко – Львов: Урожай, 1999.- 472с. 3.Медведев А.П. Контаминация биопрепаратов посторонней микрофлорой/ А.П. Медведев, В.М. Жаков// Ученые записки/ УО ВГАВМ.-Витебск, 2003.-т.39, ч.1 – с.166-167. 4.Медведев А.П. Осветление сыворотки против сальмонеллеза животных/А.П. Медведев// Ветеринарная наука – производству: Межведомственный сборник.-Минск, 1993.- Вып.31.-с.119-122. 5.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.

УДК 619:615.373

ПИТАТЕЛЬНАЯ СРЕДА ИЗ НЕПИЩЕВОГО СЫРЬЯ ДЛЯ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ ПАСТЕРЕЛЛ

Медведев А.П., Кошнерова Л.А., Гласкович А.А., Огурцова К.А.

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

Приготовлена питательная среда из непищевого сырья и доказана ее пригодность для культивирования пастерелл.

The nutrient medium is prepared from not food materials and its suitability is proved for cultivation pasterellos.

Введение. Пастереллез - контагиозная инфекционная болезнь домашних и диких животных, характеризующаяся при остром течении признаками септицемии, крупозным воспалением легких, плевритом, а при хроническом течении гнойно-некротической пневмонией, артритом, маститом, керато-конъюнктивитом, эндометритом и иногда энтеритом (А.Н. Панин, Р.В. Душук, 2001).

Вызываемая пастереллами патология сопровождается значительным экономическим ущербом вследствие гибели животных, вынужденного убоя, снижения продуктивности, затрат на проведение лечебно-профилактических и оздоровительных мероприятий.

В системе мер по профилактике и ликвидации пастереллеза большое значение отводят применению специфических средств защиты. Действительно, биопромышленность России производит для нужд животноводства 15 вакцин против пастереллеза и 3 гипериммунные лечебно-профилактические сыворотки. В Республике Беларусь единственное биопредприятие УП «Витебская биофабрика» выпускает вакцину полужидкую гидроокисьалюминиевую против пастереллеза крупного рогатого скота, вакцину ассоциированную поливитаминную против сальмонеллеза, пастереллеза и стрептококкоза свиней и сыворотку против пастереллеза крупного рогатого скота, овец и свиней.

Для производства биопрепаратов требуется большое количество питательных сред, особенно жидких. Питательные среды нужны для изучения биологических свойств микроорганизмов, выделения чистой культуры бактерий и ее идентификации, постановки лабораторного диагноза, хранения и поддержания ценных производственных и музейных штаммов, санитарно-бактериологической оценки воды, продуктов питания для людей, кормов для животных и других целей.

В литературе имеются сведения по получению из различного непищевого сырья (желатин, казеин, фибрин, утилизированное мясо, органы животных и птиц, куриные эмбрионы, дрожжи, кормовая рыбная мука и др.) гидролизатов и приготовлению на их основе качественных питательных сред для культивирования микроорганизмов. Об этом свидетельствуют исследовательские работы многих авторов (Л.Я. Телишевская, В.Е. Караваева, Е.Г. Аверьянова, 1987; СИ. Цыганкова, В.И. Космына, Г.Г. Горбенко, 1987; А.С. Фоменко, 1991; М.В. Хромов, 1991; А.П. Медведев, 1994; Л.Я. Телишевская, 2000, 2002 и др.).

Для изготовления основ питательных сред используют качественное говяжье мясо, пригодное в пищу людям, что нецелесообразно и экономически не выгодно.

Поэтому мы испытали возможность получения белковых гидролизатов и приготовления на их основе питательных сред из непищевого сырья, т.е. из мяса волов-производителей гипериммунных сывороток,