

африканской чумой свиней. // *Ветеринарный врач*. 2011, №6, с. 2-7. 17. Юдаков А.В., Юшкова Л.Я., Бальбердин Б.Н., Аммиров М.А. *Ветеринарная санитария в подсобных хозяйствах воинских частей*. // РЖ «Проблемы ветеринарной санитарии, гигиены и экологии». 2012, № 1(7), с. 53-54.

Статья передана в печать 19.09.2012 г.

УДК 619:616.98:579:842

Совершенствование метода контроля активности сыворотки поливалентной антитоксической против сальмонеллёза телят, поросят, ягнят, овец и птиц.

Ходр Мунзер, Медведев А.П., Новиков С.В.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»
г. Витебск, Республика Беларусь, 210026

В статье представлены способы определения активности сыворотки, позволяющие объективно оценивать иммуногенность препарата.

The paper presents methods for determining the activity of serum, allowing objective assessment of the immunogenicity of the drug

Введение. Сальмонеллы по числу сероваров - одна из самых многочисленных групп микроорганизмов. Основными возбудителями сальмонеллёза у сельскохозяйственных животных являются следующие сероварианты бактерий: *S.choleraesuis*, *S. dublin*, *S. typhimurium*, *S.abortusovis*. Реже болезнь у животных могут вызывать сальмонеллы других серологических вариантов. Сальмонеллы патогенны не только для животных, но и для человека. Поэтому борьба с сальмонеллёзом представляет собой важную ветеринарную и медико-биологическую проблему.

Одним из исторически первых способов борьбы с сальмонеллезом явились серопрфилактика и серотерапия.

Методику получения сыворотки против сальмонеллёза животных разработал А.Г. Малявин (1967 – 1970). Им же предложены методы контроля качества препарата. Необходимо отметить, что гипериммунные сыворотки против сальмонеллёза – ценные биологические препараты, обладающие не только специфическим, но и стимулирующим действием. Сыворотки целесообразно применять для стимуляции, дезинтоксикации, парентерального питания и коррекции гомеостаза.

Биопредприятия поставляют сыворотку для нужд животноводства после контроля ее на стерильность, безвредность, активность. Активность препарата в отношении *S. dublin*, *S. typhimurium*, *S.abortusovis* контролируют на морских свинках, а в отношении *S.choleraesuis* – на голубях. Морским свинкам сыворотку вводят подкожно в дозах 0,25, 0,5 и 1,0 см³. На каждую дозу используют двух животных. Голубям препарат инъецируют внутримышечно в дозах 0, 5 и 1,0 см³, используя трех голубей на дозу. Через 24 часа животных, иммунизированных сывороткой, заражают смертельной дозой сальмонелл соответствующего серовара. Одновременно заражают контрольных морских свинок и голубей (не получавших сыворотку) – по три животных каждым серотипом сальмонелл. Сыворотку признают активной, если из шести иммунизированных животных выживают не менее четырех при гибели не менее двух контрольных. Срок наблюдения за зараженными животными семь суток, считая с момента падежа контрольных морских свинок и голубей. Допускается выживание одного контрольного животного. И. П. Ашмарин и А.А. Воробьев доказали, что при использовании для оценки активности биопрепарата трех-шести животных нельзя с достоверностью отличить активную серию препарата от неактивной даже в том случае, когда все иммунизированные животные выжили, при 100%-ной гибели контрольных. Вероятность достоверности контроля препарата даже в этом случае не превышает 50-70%.

Поэтому мы поставили перед собой цель – усовершенствовать применяемый метод контроля активности сыворотки поливалентной антитоксической против сальмонеллеза телят, поросят, ягнят, овец и птиц.

Материалы и методы. В опытной работе были использованы штаммы сальмонелл: *S.choleraesuis*, *S. dublin*, *S. typhimurium*, *S.abortusovis*. Штаммы бактерий хранили на полужидком агаре в запаянных пипетках и пробирках под ватно-марлевыми пробками. Упомянутые штаммы микроорганизмов выращивали на скошенном агаре в пробирках и культуры применяли для заражения белых мышей, которых использовали для определения активности сыворотки. Белым мышам массой 18-20г сыворотку вводили подкожно в дозах: 0,1; 0,02; 0,004; 0,0008 и 0,00016 см³, задеиствовав на дозу 5-10 мышей. Спустя 2-3 часа мышей заражали внутрибрюшинно 2-3 ЛД₅₀ сальмонелл определенного серотипа. Контролем служили мышки, не получавшие сыворотки, которых заражали одновременно с пассивно иммунизированными. Учет результатов испытания активности сыворотки проводили в течение 7 дней после гибели контрольных животных. Допускали выживание в контроле не более одного животного. Величину 50%-ной иммунизирующей дозы сыворотки для белых мышей рассчитывали по Керберу и Ашмарину.

Агглютинирующую активность сыворотки определяли в реакции агглютинации (РА). Сыворотку разводили 1:25, 1:50, 1:100 и т.д. до титра. Антигеном служила взвесь инактивированных сальмонелл с содержанием 500 млн. микробных клеток в 1 см³. Антиген и каждое разведение сыворотки смешивали по 0,5 см³, т.е. в соотношении 1:1. Пробирки встряхивали до получения гомогенной смеси, выдерживали 12-

16 часов в термостате и 2-3 часа при комнатной температуре. Учет РА проводили визуально по степени просветления жидкости в пробирках и выраженности агглютината.

Результаты исследований. Применяемый метод контроля активности сыворотки не позволяет объективно оценивать качество препарата по этому показателю, так как в опытах используют недостаточное количество лабораторных животных. К тому же, голуби и морские свинки весьма устойчивы к сальмонеллам. Так, минимальная смертельная доза бактерий для голубей составляет 1,5 – 2 млрд., морских свинок – 4,5 млрд. микробных клеток. При подборе голубей и морских свинок для контроля активности не учитывают некоторую естественно приобретенную устойчивость животных к сальмонеллам, а также защитные свойства нормальной сыворотки крови волов. Известно, что из лабораторных животных наиболее чувствительны к сальмонеллам белые мыши. Их содержание и воспроизводство менее трудоемко, чем других видов лабораторных животных. К тому же, мыши не являются остродефицитными для ветеринарных лабораторий и биопредприятий. Контролировать активность сыворотки производственных серий с высокой степенью достоверности можно по величине ИД₅₀ ее для голубей, морских свинок или белых мышей. Однако, метод определения ИД₅₀ сыворотки для лабораторных животных довольно трудоемкий и дорогой. Известно, что достоверность результатов контроля не ниже 95% имеет место, когда иммуногенность препарата проверяется не менее, чем на 10 животных при условии, что 8 из 10 остаются живыми, а 8 из 10 контрольных гибнут. С учетом этого обстоятельства мы вели разработку метода контроля активности сыворотки, приемлемого для внедрения в практику сывороточного производства.

Опытным путем нами подобрана доза сыворотки, которая обеспечивала выживание не менее 8 из 10 иммунизированных при гибели 8 из 10 контрольных мышек. Такой результат был получен при иммунизации мышей сывороткой в дозе 0,004 см³. Затем мы исследовали иммуногенность сыворотки 11 производственных серий для белых мышей. Результаты опыта приведены в таблице 66.

Таблица 66

Активность сыворотки производственных серий для белых мышей.

№№ серий	Доза сыворотки (см ³)	Количество мышей на дозу	Выживаемость и падеж мышей					
			S. dublin		S. typhi-murium		S.abortusovis	
			П	В	П	В	П	В
209	0,004	10	2	8	1	9	2	8
210	0,004	10	2	8	1	9	1	9
211	0,004	10	2	8	2	8	2	8
212	0,004	10	3	7	2	8	2	8
213	0,004	10	2	8	3	7	1	9
214	0,004	10	6	4	4	6	5	5
216	0,004	10	2	8	2	8	2	8
217	0,004	10	2	8	2	8	3	7
220	0,004	10	2	8	2	8	2	8
223	0,004	10	3	7	2	8	2	8
228	0,004	10	2	8	2	8	1	9
Контроль			10	0	9	1	9	1

Примечание: П- пало, В- выжило.

Из таблицы 66 видно, что сыворотка десяти производственных серий (за исключением серии №214) обладает достаточно выраженной иммуногенной активностью. Препарат в дозе 0,004 см³ защищает от гибели 70-90% иммунизированных животных при падеже 90-100% мышей в контроле. Сыворотка серии №214 предотвращает из 10 мышек гибель только 4-6 особей.

При трехкратном исследовании активности сыворотки всех серий получили примерно одинаковые результаты, т.е. выживаемость белых мышей, колеблется в основном в пределах 80-90%, а для серии №214 – 40-60%. При этом необходимо заметить, что сыворотка серии №214 при исследовании применяемым методом признана активной.

Чтобы убедиться в действенности разрабатываемого метода при выявлении сыворотки неактивных производственных серий, мы провели следующую работу.

В остром опыте проконтролировали активность сыворотки для белых мышей серии №№ 214,216 и 3-х фальсифицированных в отношении активности проб препарата серии №217. Сыворотку фальсифицировали стерильным физиологическим раствором, который добавляли для ее разведения в количестве 20% (проба 1), 30% (проба 2) и 50% (проба 3) к объему препарата

Полученные результаты отражает цифровой материал таблицы 67.

Таблица 67

Контроль активности сыворотки на белых мышках

№№ серий и проб	Доза сыворотки (см ³)	Количество мышей на дозу	Выживаемость и падеж мышей					
			S. dublin		S. typhi-murium		S.abortusovis	
			П	В	П	В	П	В
214	0,004	10	5	5	4	6	4	6
216	0,004	10	2	8	1	9	2	8
1	0,004	10	4	6	4	6	5	5
2	0,004	10	5	5	6	4	5	5
3	0,004	10	7	3	6	4	6	4
Контроль			10	0	9	1	8	2

Примечание: П- пало, В- выжило.

Из данных таблицы 2 видно, что сыворотка серии 216 защищает от падежа 80-90% мышей, препарат серии 214 и фальсифицированная сыворотка проб 1,2 – 40-60% животных, а пробы 3 – 30-40% особей. Таким образом, метод контроля активности сыворотки на белых мышах с использованием одной дозы (0,004 см³), которая является своеобразной тест-пробой, позволяет достаточно эффективно выявлять препарат неактивных производственных серий.

Проверять иммуногенность сыворотки в отношении *S.choleraesuis* можно также на белых мышах с использованием упомянутой тест-пробы. Однако, ввиду исключительно высокой чувствительности мышей к этому сероварианту сальмонелл, мы воздержались рекомендовать этот метод контроля активности сыворотки для внедрения в практику, но не исключаем возможность использования его в научно-исследовательских целях.

Проверку активности сыворотки в отношении *S.choleraesuis* в условиях производства мы рекомендуем проводить путем постановки острого опыта, т.е. заражения 10 голубей, иммунизированных препаратом в дозе 0,5 см³, и 10 голубей не получавших препарат (контроль). При этом в случае падежа не менее 8 контрольных голубей и выживании не менее 8 иммунизированных голубей, сыворотку признавать активной. Методы контроля активности сыворотки для лабораторных животных в остром опыте имеют некоторые недостатки. Так, для проведения опытов необходимо большое количество животных, которых подбирают для эксперимента по принципу аналогов, учитывая только их массу без определения естественной резистентности особей к сальмонеллам. Для заражения животных необходимо постоянно поддерживать контрольные штаммы сальмонелл и перед постановкой опыта определять вирулентность бактерий и заражающую дозу их. Все это требует значительных затрат рабочего времени, труда и материальных средств.

Поэтому наша опытная работа была направлена на определение агглютинирующей активности сыворотки, которая по данным контроля ее в остром опыте на голубях и белых мышах была признана иммуногенной (препарат серии №№ 209, 210, 211, 212, 213, 216, 220, 223). Сыворотку этих серий разводили физиологическим раствором, начиная с разведения 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 и т.д. до титра. В качестве антигена использовали взвесь живых бактерий с концентрацией 500 млн. м.к. в 1 см³. Реакцию ставили классическим пробирочным методом. Положительной считали реакцию с оценкой в два плюса.

Результаты определения титра агглютининов в сыворотке производственных серий представлены в таблице 68.

Таблица 68

№ серии	Агглютинирующая активность сыворотки производственных серий			
	Титр агглютининов в РА к сальмонеллам			
	<i>S.choleraesuis</i>	<i>S. dublin</i>	<i>S. typhi-murium</i>	<i>S.abortusovis</i>
209	1:800	1:1600	1:1600	1:800
210	1:1600	1:1600	1:1600	1:160
211	1:1600	1:1600	1:800	1:800
212	1:800	1:800	1:1600	1:1600
213	1:1600	1:1600	1:1600	1:1600
216	1:1600	1:1600	1:800	1:800
220	1:800	1:1600	1:1600	1:1600
223	1:800	1:1600	1:1600	1:1600

Из таблицы видно, что титр агглютининов ко всем четырем серовариантам сальмонелл составляет от 1:800 до 1:1600. Поэтому можно считать, что препарат с таким титром антител является вполне иммуногенным и проверка его активности на лабораторных животных не целесообразна. Титр агглютининов в сыворотке можно определить в течение суток. Постановка РА не требует сложных приборов и оборудования, дефицитных компонентов, проста в техническом исполнении.

Общепризнано, что при многих бактериальных инфекциях в основном превалирует гуморальный иммунный ответ, а при вирусных – клеточный, и тем не менее, качество противовирусных препаратов оценивают в различных серологических реакциях: РА, РН, РИД, РИФ и других, избегая постановки острых опытов на лабораторных животных. С учетом этого обстоятельства и приведенных выше опытных данных полагаем, что активность сыворотки против сальмонеллеза животных можно оценивать в РА. Титр антител от 1:800 и выше является показателем, свидетельствующим о достаточной активности ее для практического применения.

Заключение. Результаты опытной работы позволили предложить способы контроля активности сыворотки на лабораторных животных и в реакции агглютинации.

Доказана возможность объективной оценки иммуногенности сыворотки по высоте титра антител в препарате и, следовательно, пригодности его по этому показателю для практического применения.

Литература. 1. Даровских, С.В. Поливалентная антитоксическая сыворотка против сальмонеллеза животных : автореф. ... канд. вет. наук / С.В. Даровских ; Институт экспериментальной ветеринарии им. Вышеселеского. – Минск, 2009. – 21 с. 2. Медведев, А.П. Производство и контроль гипериммунных сывороток и иммуноглобулина против сальмонеллеза животных : автореф. ... д-ра вет. наук / А.П. Медведев ; ВГНКИ. – Москва, 1998. – 31с.

Статья передана в печать 12.09.2012 г.