

пчел / И.Р. Кириевский // М.: САТ; Донецк: Сталкер, 2006. – 303 с. 4. Кокорев, Н. Болезни и вредители пчел / Н. Кокорев, Б. Чернов // М.: ТИД Континент-Пресс, Континенталь-Книга, 2006. – 352 с. 5. Куликов, Н.С. Лечение европейского гнильца пчел опрыскиванием и опыливанием сотов антибиотиками и норфазолнатрием / Н.С. Куликов // 18 Международный конгресс по пчеловодству. – М. – С. 174. 6. Махова, М. Чувствительность и реакция на различные антибиотики отдельных штаммов *Bacillus larvae* / М. Махова // Апиомондия. 22 Международный конгресс по пчеловодству (доклады). Мюнхен, 1–7 августа 1969. Бухарест-Румыния. – С. 125–126. 7. Солонко, А.А. Микробиология и иммунология: Учеб. пособие. Ч. 1. Общая микробиология и иммунология / А.А. Солонко, А.А. Гласкович, П.А. Красочко и др.; под общ. ред. А.А. Гласкович, П.А. Красочко // Мн.: НПО «ПИОН», 2002. – 248 с. 8. Солонко, А.А. Практикум по микробиологии / А.А. Солонко, А.А. Гласкович, Ф.Е. Тимофеев // Мн.: Дизайн ПРО, 1998. – 192 с. 9. Тимофеев, Ф.Е. Болезни пчел / Ф.Е. Тимофеев // Мн.: «Ураджай», 2000. – 182 с. 10. Херольд, Э. Новый курс пчеловодства / Э. Херольд, К. Вайс; пер. с нем. М. Беляева // 10-е изд., перераб. – М.: САТ: Астрель, 2008. – 368 с. 11. Чанышев, З.Г. Применение сульфамидных препаратов и антибиотиков для профилактики и лечения смешанной инфекции – американского и европейского гнильцов / З.Г. Чанышев // 18 Международный конгресс по пчеловодству. – М. – С. 157. 12. Маслій, І.Г. Порівняльна оцінка ефективності фармацевтичних препаратів відносно збудників інфекційних хвороб бджіл / І.Г. Маслій // Вет. медицина. – 2000. – Вип. 77. – С. 242–247.

УДК 619 : 615.371 / 372 : 616.986.7

СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ЛЕПТОСПИРОЗНЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫРАЩЕННЫХ НА РАЗНЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ

Зайцев В.В.

УП «Витебская биофабрика»,
г. Должа, Республика Беларусь

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о наличии различий серологических свойств лептоспир, выращенных как на общепринятых, так и экспериментальных средах на основе сывороток крови барана.

The results show a serological difference of leptospirae grown on conventional and experimental media derived from ram's blood.

Введение. Любая микробиологическая работа и, следовательно, выполнение любой практической задачи связаны с приготовлением питательных сред для выращивания микроорганизмов.

Среды необходимы для накопления, выделения и сохранения микроорганизмов, а также для выращивания культур с целью исследования их обмена веществ или получения ценных продуктов метаболизма. Среда должна включать все компоненты, необходимые для конструктивных и энергетических процессов клетки, – источники углерода, азота, зольные элементы, микроэлементы.

Синтетические возможности микроорганизмов и способы получения ими энергии разнообразны. Следовательно, и очень различны их потребности в источниках питания. Отсюда ясно, что универсальных сред, пригодных для роста всех без исключения микроорганизмов, не существует. Разнообразие обмена веществ микроорганизмов проявляется прежде всего в их отношении к источникам углерода и азота; вот почему эти элементы представлены в средах различными веществами и именно они определяют специфичность сред.

Автотрофные микроорганизмы способны использовать в качестве единственного источника углерода углекислоту воздуха или карбонатов, тогда как потребности в углероде гетеротрофных микроорганизмов такими соединениями углерода не могут быть удовлетворены. Для развития гетеротрофных микроорганизмов среда должна содержать более восстановленные соединения углерода, которые в зависимости от физиолого-биохимических особенностей организма могут быть представлены различными органическими соединениями, например кислотами, спиртами, углеводами, углеводородами.

Неодинаковы требования микроорганизмов и к источнику азота. Для культивирования микроорганизмов, фиксирующих молекулярный азот, используют среды, не содержащие соединений азота. В состав всех других сред входят различные азотсодержащие соединения. Это могут быть нитраты или соли аммония, одна или несколько аминокислот. Наконец, известны микроорганизмы, нуждающиеся в полном наборе аминокислот или белках.

Потребности разнообразных групп микроорганизмов в зольных элементах и микроэлементах удовлетворяются обычно за счет одних и тех же минеральных солей. Поэтому так называемый «минеральный фон» сред для многих микроорганизмов может быть очень близким по составу.

Кроме элементов, необходимых для конструктивных процессов, среда должна содержать и энергетический материал. В средах для культивирования гетеротрофных организмов соединения углерода в большинстве случаев являются и энергетическим материалом. В средах для хемоавтотрофных организмов эту роль выполняют минеральные соли.

Из вышесказанного ясно, что при составлении сред следует обязательно учитывать особенности обмена веществ микроорганизмов. Кроме того, среды одного и того же микроорганизма могут быть разными в зависимости от задач исследования. Например, среда для длительного сохранения микроорганизма в лабораторных условиях заметно отличается от сред, предназначенных для получения тех или иных продуктов обмена веществ.

Однако какой полноценной ни была бы среда, ее компоненты могут остаться недоступными, если активная кислотность среды (рН) не соответствует значениям, при которых возможно развитие изучаемых организмов. Поэтому, приготовив среду, проверяют значение рН и, если необходимо, доводят его до нужной величины растворами кислот, щелочей или солей, имеющих щелочную реакцию. В процессе стерилизации значение рН может изменяться, поэтому нередко требуется дополнительное определение его в стерильных средах и в случае надобности корректирование стерильными растворами кислоты или щелочи.

Лептоспиры были выделены в чистой культуре значительно позже (1917), чем многие другие патогенные микроорганизмы. Это связано с их повышенной требовательностью к составу питательной среды. Первые культуры были выращены на сыворотке крови кролика, в последующих работах использовали разведенную сыворотку. Простейшей сывороточной средой является смесь стерильной воды с асептически полученной сывороткой крови кролика или овцы в разных количествах.

Известно значительное количество сывороточных сред различного состава: среды Уленгута (1917), Ферворт-Вольфа в модификации Тарассова (1937), Кортгофа (1932), полужидкая среда Флетчера (1928). Обеспечивая неплохой рост лептоспир, такие среды, тем не менее, обладают рядом недостатков, так как их качество в значительной степени зависит от индивидуальных свойств сыворотки животных-доноров. Другим существенным недостатком таких сред является многоэтапность получения сыворотки, что сопровождается контаминацией ее посторонней микрофлорой и в связи с этим ее выбраковкой.

Вторая группа сред – это полусинтетические и синтетические белковые и безбелковые питательные среды [7].

В настоящее время разработаны и апробированы среды, содержащие в своем составе различные альбумины и пригодные для выращивания лептоспир [3, 4, 6]. Однако из-за того, что альбумин не обеспечивает удовлетворительный рост всех штаммов патогенных лептоспир, применение вышеуказанных сред не вышло за рамки лабораторных исследований.

В последнее время предложена жидкая питательная среда для лабораторного выращивания патогенных лептоспир на основе белков лизированной крови кролика [1], сыворотки крови барана [2] и альбумина животных [5].

Активность вакцин во многом зависит от иммуногенности производственных штаммов лептоспир, из которых ее готовят. За рубежом и до недавнего времени в СНГ для изготовления вакцин против лептоспироза использовали штаммы с учетом серогрупповой принадлежности и способности расти на питательных средах без учета их иммуногенной активности.

Методика отбора штаммов по степени иммуногенности разработана коллективом лаборатории контроля и стандартизации коли-сальмонеллезных и лептоспирозных препаратов (Ю.А. Малахов, А.П. Самохвалов, В.С. Соловьев и др.) и заключается в многократном клонировании испытуемых штаммов на плотной среде с постоянным отбором типичных колоний и последующем сопоставлении однотипных клонированных штаммов по иммуногенной и антигенной активности.

Использование упомянутой методики позволяет селекционировать производственные штаммы, значительно превышающие по степени иммуногенности ранее применяемые.

Цель настоящей работы – определить серологические свойства лептоспир, выращенных на разных питательных средах.

Материал и методы исследований. Анализируя результаты серологических и бактериологических исследований ветеринарных диагностических учреждений, можно отметить однородность этиологии лептоспироза, наличие некоторых количественных различий в составе лептоспир, поражающих сельскохозяйственных животных, в разных областях республики.

С нашей точки зрения, причина однородности этиологической структуры лептоспироза обусловлена массовыми перевозками животных. Это приводит к равномерному распределению на территории страны лептоспир различных серологических вариантов, исключает возможность формирования в том или ином регионе специфических популяций лептоспир, инфицирующих сельскохозяйственных животных.

Имеющиеся на сегодняшний день данные об этиологической структуре лептоспироза сельскохозяйственных животных в стране свидетельствуют о необходимости повседневного контроля за ее изменением и целесообразности изготовления вакцины против лептоспироза из местных штаммов для ограниченных регионов.

На основании вышеизложенного нами в работе использовались 6 патогенных производственных штаммов лептоспир: *Leptospira pomona* ВГНКИ-6; *Leptospira tarassovi* ВГНКИ-4; *Leptospira grippothyphosa* ВГНКИ-1; *Leptospira icterohaemorrhagiae* ВГНКИ-2; *Leptospira conicola* ВГНКИ-3; *Leptospira hardjo* ВГНКИ-5.

Для культивирования лептоспир в опытах использовали следующие питательные среды: сывороточная витаминизированная среда на основе сыворотки барана (СВСБ); сывороточная среда с фактором роста (ССФР); сывороточная среда витаминизированная с фактором биосинтеза антигенов (ССВФБ); полусинтетическая среда Рассела (ПСР).

Кровь у баранов брали в стерильные бутылки вместимостью 3-5 дм³, увлажненные физиологическим раствором. После свертывания крови бутылки встряхивали для отделения кровяного сгустка от стенок и помещали для отстоя сыворотки на 24 часа при температуре 2-10⁰С. Отстоявшуюся сыворотку сливали в стерильные бутылки, которые помещали в водяную баню с температурой 57-58⁰С и прогревали при периодическом перемешивании в течение 30 минут.

Инактивированную сыворотку фильтровали через осветляющие и стерилизующие фильтры. Профильтрованную сыворотку проверяли на стерильность.

Баранов исследовали на лептоспироз в процессе эксплуатации. Для забора крови использовали животных, в сыворотке крови которых в РМА не выявлялись специфические антитела.

Из одной пробирки с каждым штаммом лептоспир делали пересев в 4-5 пробирок, содержащих по 8-10 см³ питательной среды, внося в них по 0,5-1,0 см³ культуры. Накопление 80-100 лептоспир в поле зрения микроскопа наблюдалось через 7 суток культивирования при температуре 27-28⁰С.

В дальнейшем каждый штамм поддерживали путем пересева каждые 15, 30 и 45 дней.

Культуры каждого штамма первой или последующей генерации расфасовывали по 2-5 см³ в стерильные ампулы, которые запаивали и хранили при температуре 18-20⁰С без доступа света в течение 1, 3 и 6 месяцев.

Каждую партию питательной среды проверяли на пригодность для культивирования лептоспир путем посева каждой производственной штамма на 3-5 пробирок со средой.

Подвижность и морфологию лептоспир изучали в темном поле микроскопа при увеличении 40 x 7-10.

Производственные штаммы, выращенные на питательных средах разного состава, контролировали на биологическую активность путем иммунизации кроликов и постановки РМА с гомогенной сывороткой.

Исследуемые производственные штаммы считали активными в антигенном отношении: а) если они давали положительную РМА не менее, чем на 2 креста до половины титра сыворотки гомологичной серогруппы; б) если они при введении кролику обеспечивали титр антител в сыворотке крови не менее чем 1:400.

Результаты исследований. Выращивание лептоспир в СВСБ, изготовленных из разных партий сывороток барана, показало, что ростовая активность в отношении разных культур спирохетт неравноценна (таблица 1).

Таблица 1 – Серологическая активность лептоспир, выращенных в СВСБ

№ партии сыворотки	Титр антител в сыворотке крови кроликов к лептоспирам разных серологических групп					
	Pomona	Tarassovi	Grippothyphosa	Icterohaemorrhagia	Conicola	Hardjo
1	1:400	1:400	1:800	1:400	1:400	1:800
2	1:400	1:400	1:400	1:200	1:400	1:400
3	1:800	1:200	1:400	1:100	1:200	1:100
4	1:800	1:200	1:800	1:800	1:200	1:200
5	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400	1:400
6	1:800	1:400	1:800	1:400	1:100	1:400
7	1:400	1:200	1:400	1:200	1:400	1:200
8	1:800	1:400	1:200	1:200	1:400	1:200

Как видно из таблицы 1, одни партии сывороток обеспечивали интенсивный рост лептоспир и выраженный биосинтез специфических антител у всех сероваров, другие только у отдельных. Безусловно, используя разные партии сывороток, не всегда возможно получить равноценные культуры и вакцины по биологической активности. Очевидно, что пересевы штаммов лептоспир на среды, содержащие сыворотку барана с низкой ростовой активностью, приведет к их диссоциации.

Поэтому встает необходимость модифицировать пропись питательных сред.

В дальнейших исследованиях нами изучены свойства штаммов лептоспир на среде ПСР (таблица 2).

Из результатов, показанных в таблице 2, видно, что через 2 пассажа лептоспир на среде ПСР отмечается существенное снижение биосинтеза специфических антигенов, а при последующих пересевах вообще утрачивают их, что проявляется снижением иммунной активности.

Таким образом, среда ПСР обеспечивает интенсивный рост лептоспир, но не пригодна для повторного посева лептоспир из-за значимого снижения их антигенной активности.

Таблица 2 – Сравнительная оценка антигенной активности лептоспир, выращенных на среде ПСР

Количество пересевов	Титр антител в сыворотке крови кроликов к лептоспирам разных серологических групп					
	Pomona	Tarassovi	Grippothyphosa	Icterohaemorrhagia	Conicola	Hardjo
1	1:1600	1:400	1:1600	1:800	1:800	1:1600
2	1:800	1:400	1:800	1:400	1:800	1:800
3	1:200	1:50	1:200	1:100	1:100	1:50
6	-	-	1:10	1:10	1:10	-

Среда ССФР обеспечивала высокое накопление лептоспир и в течение 3 пересевов (таблица 3) гарантировала их высокую иммуногенность и поэтому ее целесообразно использовать для выращивания матровой и производственной культур.

Таблица 3 – Сравнительная оценка антигенной активности лептоспир, выращенных на среде ССФР

Количество пересевов	Титр антител в сыворотке крови кроликов к лептоспирам разных серологических групп					
	Pomona	Tarassovi	Grippothyphosa	Icterohaemorrhagia	Conicola	Hardjo
1	1:1600	1:800	1:1600	1:800	1:800	1:1600
2	1:1600	1:800	1:1600	1:800	1:800	1:1600
3	1:1600	1:800	1:1600	1:800	1:800	1:1600
6	1:800	1:400	1:800	1:400	1:400	1:800

Среда ССВФБ даже после 6 пересевов лептоспир гарантировала сохранение антигенной активности специфических антигенов и высокую иммуногенность (таблица 4).

Таблица 4 – Сравнительная оценка антигенной активности лептоспир, выращенных на среде ССВФБ

Количество пересевов	Титр антител в сыворотке крови кроликов к лептоспирам разных серологических групп					
	Pomona	Tarassovi	Grippothyphosa	Icterohaemorrhagia	Conicola	Hardjo
1	1:1600	1:800	1:1600	1:800	1:800	1:1600
2	1:1600	1:800	1:1600	1:800	1:800	1:1600
3	1:1600	1:800	1:1600	1:800	1:800	1:1600
6	1:1600	1:800	1:1600	1:800	1:800	1:1600

Заключение. Полученные результаты исследований свидетельствуют о наличии различий серологических свойств лептоспир, выращенных как на общепринятых, так и экспериментальных средах на основе сывороток крови барана.

Литература. 1. Волина, Е.Г. Культивирование лептоспир в жидкой питательной среде с лизированной кроличьей кровью / Е.Г. Волина, Л.Е. Саруханова // ЖМЭИ. – 2001. – № 1. – С. 3-5. 2. Зайцева, А.В. Среда для выращивания лептоспирозных бактерий / А.В. Зайцева, Г.Э. Дремач // Патент РФ № 7321. – 2005. 3. Ситьков, В.И. Изготовление и испытание малобелковой питательной среды для культивирования лептоспир / В.И. Ситьков, В.И. Бобрышев, И.К. Тутов // Сборник науч. трудов Ставропольской ГСХА. – Ставрополь, 1994. – С. 42-45. 4. Ситьков, В.И. Новая питательная среда для культивирования лептоспир / В.И. Ситьков, В.И. Бобрышев, И.К. Тутов // Материалы Междунар. конф. – Барнаул, 1995. – С. 98-99. 5. Ситьков, В.И. Научные и практические основы промышленного производства и применения вакцин: Дисс. ... д-ра вет. наук / В.И. Ситьков. – М., 1997. – С. 29-33. 6. Соболева, Г.Л. Рост лептоспир в альбуминовой питательной среде / Г.Л. Соболева // Биологические препараты против инфекционных болезней животных. – М., 1981. – С. 51-54. 7. Справочник ветеринарного лаборанта / Ф.З. Андросов [и др.]; под ред. В.Я. Антонова. – М.: Колос, 1981. – С. 37.

УДК 615.281.34.25.37

РАЗРАБОТКА И СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ СПЕЦИФИЧЕСКИХ СРЕДСТВ ЭКСТРЕННОЙ ЗАЩИТЫ ЦНС ЖИВОТНЫХ ОТ ВИРУСА БЕШЕНСТВА

Иванов В.С., Еремец В.И., Пухова Н.М., Лебедько Е.И., Салов Д.А.

Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности
Россельхозакадемии, г.Щелково, Россия

Антирабические иммуноглобулины или антирабические сыворотки используются для экстренной защиты людей и животных от бешенства во всех странах мира. Имеются определенные проблемы в получении высококачественных стабильных сывороточных препаратов. Была показана возможность получения и применения антирабической сыворотки крупного рогатого скота в качестве дополнительного специфического средства для спасения животных от бешенства.

Specific immunoglobulines or serumes are using for urgent safe of human and animals from rabies. Effective and stability antirabies bovine serum was devised and application for the success safe of animals.

Введение. Бешенство - летальная вирусная болезнь животных и человека, при которой мишенью поражения является ЦНС. Заражение происходит главным образом через укус. При укусах, сопровождающихся появлением крови, вирус неминуемо вступает в контакт с мышечными клетками и нервными окончаниями.

Часть его может задерживаться в воротах инфекции и начать репродуцироваться в мышечных клетках, а другая часть может быть захвачена нервными окончаниями и начать продвижение в нервных волокнах к ЦНС со скоростью примерно 50-100 мм/сут. (1, 2). Поэтому, по мнению экспертов по бешенству, любой укус с появлением крови должен рассматриваться как опасный укус 3-й категории тяжести (3), требующий комбинированного применения антирабического иммуноглобулина (АИГ) и вакцины.

Обычно для пассивной иммунизации людей используют человеческий или лошадиный иммуноглобулин в дозах 20 МЕ/кг и 40 МЕ/кг, соответственно.

Вся доза АИГ незамедлительно вводится в ткани вокруг ран и вглубь внутримышечно. Вакцинацию проводят в день пассивной иммунизации и на 3, 7, 14, 30-й день после начала вакцинации (4). При некоторых обстоятельствах допускается проведение пассивной иммунизации после вакцинации, но не позднее 7-и суток с момента начала вакцинации (5). Применение антирабических антител преследует цель защиты ЦНС от вируса бешенства до его проникновения в этот орган и выигрыша времени для формирования поствакцинального иммунитета.

Следует признать, что, несмотря на видимую простоту и законченность тактики экстренной профилактики бешенства у людей, имеются вопросы, которые не акцентируются, но постоянно напоминают о себе и требуют своего решения.

Отмечается сложность производства сывороточных препаратов, их недостаточная стандартизованность и эффективность, и самое неприятное - угнетающее влияние пассивной иммунизации на формирование активного иммунитета (6, 7, 8, 9), которое, правда, можно несколько снизить путем изменения очередности введения препаратов (10,11). Однако, несмотря на выявленные недостатки, существующая технология экстренной защиты людей от бешенства применяется с положительным эффектом уже не одно десятилетие практически во всех странах мира.

В ветеринарной практике вынужденную, фактически постэкспозиционную, иммунизацию животных осуществляют только антирабическими вакцинами, хотя показания к применению антирабического иммуноглобулина или антирабической сыворотки имеются.

Во многом это объясняется отсутствием доступных и активных препаратов для пассивной иммунизации животных.

Целью настоящей работы являлась разработка доступного рационального способа получения высокоактивного стабильного при хранении сухого стандартизованного антирабического сывороточного препарата и технологии его применения для экстренной постэкспозиционной защиты ЦНС ценных или просто любимых животных от вируса бешенства.

Материал и методы. В опытах использовали 5 бычков массой 230-250 кг и антирабическую референс-вакцину серии 1-06 с активностью 1,8 МЕ/мл, изготовленную во ВНИТИБП из вируса бешенства штамм Щелково-51, репродуцированного в монослое культуры клеток ВНК-21. Перед применением сухую вакцину восстанавливали до первоначального объема адьювантным растворителем, с таким расчетом, чтобы в 6 мл вакцины оказалась одна максимальная доза сапонина.