

Литература: 1. Исаев, Е.В. Получение антигена для иммунизации продуцентов противорожистой сыворотки / Е.В. Исаев // Ветеринарная биотехнология: настоящее и будущее: материалы Межд. науч.-практ. конф., посвященной 80-летию ФГУП «Щелковский биокомбинат», Щелково, 20-23 сентября 2004. – Щелково, 2004. – С. 177-178. 2. Исаев, Е.В. Оценка активности рожистого в зависимости от способа его получения / Е.В. Исаев, Е.Э. Школьников // Ветеринарная биотехнология: настоящее и будущее: материалы Межд. науч.-практ. конф., посвященной 80-летию ФГУП «Щелковский биокомбинат», Щелково, 20-23 сентября 2004. – Щелково, 2004. – С. 178-180. 3. Медведев, А.П. Проблемы производства противобактериальных биопрепаратов для пассивной профилактики и лечения животных / А.П. Медведев, А.А. Вербицкий, С.В. Даровских / Ученые записки УО ВГАВМ. – Витебск, 2006. – Т. 42. – Вып. 1, ч. 2. – С. 37-40. 4. Медведев, А.П. Противобактериальные лечебно-профилактические сыворотки: монография / А.П. Медведев. – Витебск: УО ВГАВМ, 2007. – 379 с.

УДК 619 : 615. 371 / 372 : 616. 986. 7

РАЗРАБОТКА МЕТОДА КОНЦЕНТРИРОВАНИЯ ЛЕПТОСПИР

*Зайцев В.В., **Дремач Г.Э.
УП «Витебская биофабрика»

** УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
Республика Беларусь

Авторами статьи приводятся сведения о разработке нового метода концентрирования лептоспир. Концентрат антигена в небольших дозах обеспечивает адекватный иммунный ответ, характеризуется малой иммунизирующей дозой, обладает высокой устойчивостью лептоспир в процессе длительного хранения.

The article contains the data on a new method for concentration of leptospira bacteria. The obtained antigen in small doses gains on adequate immune response, requires small immune dose and a high endurance of leptospirae during storage.

Введение. Перекрестный иммунитет между лептоспирами различных серогрупп, а в ряде случаев и сероваров, либо не создается, либо очень слабо выражен. Поэтому вакцина, которая могла бы быть эффективна против всех лептоспир, должна содержать большинство сероваров. Изготовление такой вакцины технически не осуществимо, поэтому в каждом отдельном случае целесообразно определить – вакцина какого состава необходима для животных данного вида в определенном регионе.

Проведенное изучение этиологической структуры болезни позволило нам с достаточным основанием включить в состав биопрепарата для специфической профилактики лептоспироза крупного рогатого скота серогруппы возбудителя: Pomona, Tarassovi, Grippotyphosa, Sejroe; в вакцину против лептоспироза свиней – лептоспиры серогрупп Pomona, Tarassovi, Icterohaemorrhagiae.

Эпизоотологические показатели свидетельствуют о необходимости дальнейшего совершенствования средств специфической профилактики лептоспироза животных.

С 1990 года проводится работа по усовершенствованию технологии изготовления вакцины против лептоспироза [2, 3, 4, 5, 7, 11, 12].

В 1990 году в России внедрили концентрированную вакцину против лептоспироза [10], а с 1997 года – сухую вакцину [1, 6]. Однако она не получила практического применения из-за выпадения не разбивающегося осадка при длительном хранении.

Биологическая промышленность России в настоящее время выпускает вакцину против лептоспироза депонированную ВГНКИ и сухую вакцину [8, 9].

В нашей стране выпускается только депонированная вакцина против лептоспироза животных, содержащая в 1 см³ препарата 70 млн. лептоспир.

Цель настоящих исследований – разработка метода концентрирования лептоспир.

Материалы и методы. При выполнении научных исследований в работе использовали производственные штаммы лептоспир Grippotyphosa ВГНКИ-1, Icterohaemorrhagiae ВГНКИ-2, Canicola ВГНКИ-3, Tarassovi ВГНКИ-4, Sejroe Hardjo и Pomona ВГНКИ-6.

Культуру каждого штамма в дозе 7 млн.м.к./см³ внутривенно вводили кроликам с последующим исследованием сыворотки крови в РМА через 20-22 дня после введения культуры.

Исследуемый штамм считали активным в антигенном отношении:

а) если он давал положительную РМА на 2-4 креста не менее чем до половины титра сыворотки гомологичной серогруппы;

б) при титре антител в сыворотке крови кролика не менее чем 1:800.

Проверенные культуры лептоспир адаптировали к питательным средам, используемым для культивирования. Для их изготовления использовали сыворотку и лизированную кровь овец и гидролизат казеина.

Кровь овец брали в стерильные бутылки вместимостью 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 стерильный бутыль, который 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. Для этого сыворотку высевали на следующие пита-

тельные среды: МПА, МПБ, среду Сабуро и МППБ под вазелиновым маслом. Сыворотку считали стерильной при отсутствии роста посторонней микрофлоры во всех средах.

Овец доноров исследовали на лептоспироз в процессе эксплуатации. При обнаружении у отдельных животных специфических антител к лептоспирам в разведении 1:20 и выше прекращали у всех доноров взятие крови для изготовления питательной среды и обрабатывали их стрептомицином по специальной схеме.

Для составления сывороточной среды к рабочему раствору фосфатного буфера добавляли инактивированную сыворотку крови овец до содержания в среде белка не менее 0,22%.

Для изготовления казеиновой среды к рабочему раствору фосфатного буфера добавляли гидролизат казеина до конечного содержания в среде 0,5-0,6%.

В питательные среды добавляли также факторы роста: витамины группы В и др.

Приготовленные питательные среды подвергали стерилизующей фильтрации. Каждую серию питательной среды для культивирования лептоспир дополнительно проверяли путем посева каждого производственного штамма лептоспир на 3 пробирки со средой. Среду считали пригодной для культивирования лептоспир, если через 7 суток культивирования при температуре 28-30°C интенсивность роста составляла не менее 80 подвижных лептоспир с типичной морфологией в поле зрения при увеличении 40 x 7-10.

Концентрацию лептоспир в культуре определяли с помощью счетной камеры Петрова-Хауссера или Тома по прилагаемым к ним методикам. Подсчитывали лептоспиры также с помощью микроскопа. Для чего на предметное стекло наносили пипеткой каплю культуры (0,02 см³), предварительно разведенной питательной средой, накрывали покровным стеклом. Капля заполняла все пространство под покровным стеклом, не выступая из-под него.

Учет количества лептоспир проводили под микроскопом с моно- или бинокулярной насадкой, используя объектив 40, окуляр 7-10. Подсчет количества лептоспир осуществляли в 15 полях зрения по диагоналям препарата, после чего определяли среднее содержание в одном поле зрения с учетом сделанного разведения.

Для разработки метода концентрирования лептоспир с использованием мембранной технологии необходимо было решить задачи:

- выбрать ультрафильтрационные мембраны, обеспечивающие оптимальную селективность и производительность процесса;
- изучить влияние некоторых факторов на процесс концентрирования бактерий методом ультрафильтрации.

Эффективность работ мембран оценивали по их производительности (G):

$$G = V / (S \cdot t), \text{ где}$$

G – производительность мембраны, дм³/м²ч;

V – объем фугата, дм³;

S – поверхность фильтрации, м²;

t – время фильтрации, ч.

Эффективность работ мембран оценивали и по селективности, которую рассчитывали по формуле:

$$U = \frac{A_i - A_n}{A_i} \times 100\%$$

A_i – содержание лептоспир в исходном растворе, млн/см³;

A_n – содержание лептоспир в фугате, млн/см³.

Кратность концентрирования составляла 5, 10, 20, 40 раз и определялась соотношением:

$$K = V_i / V_k, \text{ где}$$

V_i – исходный объем культуры лептоспир, см³;

V_k – объем концентрата культуры лептоспир, см³.

В экспериментальной работе использовали следующее оборудование: аппарат для ультрафильтрации марки УПВ-6 (ТУ 117-67-87), колонки полых волокон (ТУ 6-06-4151-87), термостаты на 27-28°C и 36-38°C, автоклавы ГПД-560, фильтр-патроны фирмы "Mullirog", шкафные холодильники, микроскопы МБИ-3, МБИ-6, конденсор темного и светлого поля и др.

К полученной концентрированной культуре лептоспир добавляли адьюванты: азросил А300, ПЭГ 600, гидроокись алюминия.

После добавления к сгущенной бактериальной массе разбавителя и адьюванта концентрация лептоспир в вакцине составляла в среднем 750 млн./см³ микробных клеток.

Для проведения испытания было изготовлено 10 образцов концентратов лептоспир. Для сравнительного контроля использовали 2 серии депонированной вакцины: одну первого и одну второго варианта.

Приготовленные образцы концентрированных культур лептоспир расфасовывали по 10-20 см³.

Опыты были проведены на 60 кроликах, 72 золотистых хомячках, 50 белых мышях и 36 морских свинок. Все использованные в опыте животные были исследованы на наличие у них антител в РМА к лептоспирам, входящим в состав вакцины. К проведению исследований допускались только те лабораторные животные, у которых специфических антител к лептоспирам выявлено не было.

О наличии иммунитета судили по титру антител в реакции микроагглютинации, которую ставили с разведения 1:10 с двукратным интервалом до 1:1280 с антигенами лептоспир, входящими в состав вакцины, а также по превентивной активности сыворотки крови животных для золотистых хомячков.

Для этого у иммунизированных кроликов брали кровь через 25 суток, а полученную среднюю пробу сыворотки вводили трем хомякам по 0,25 см³ и трем - 0,5 см³. Через 2 часа после инъекции сыворотки хомяков заражали дозой 5 LD₅₀ лептоспир серологических групп, входящих в состав концентрата или вакцины.

Для проверки на безвредность испытываемые образцы вводили внутрибрюшинно пяти белым мышам

массой 15-18 г по 0,3 см³ каждого оboазца и трем морским свинкам массой 350-400 г подкожно в объеме 3 см³. Наблюдение за животными вели в течение 10 суток.

Активность полученных опытных образцов концентратов и вакцин контролировали на кроликах массой 2,5-3,0 кг. Концентраты вводили кроликам первой группы внутривенно, а второй – внутримышечно. Для чего каждому кролику первой группы концентрат применяли с соблюдением правил асептики в ушную вену однократно в дозе: первый вариант 0,06 см³, а второй – 0,075 см³. Каждому кролику второй группы концентрат вводили внутримышечно однократно в дозе 0,3 см³. Через 25 суток после введения концентрата у животных обеих групп из ушной вены брали кровь, получали из нее сыворотку и исследовали ее в РМА со штаммами лептоспир, входящими в состав биопрепарата.

Результаты исследований. Производственные штаммы лептоспир *Grippotyphosa* ВГНКИ-1, *Icterohaemorrhagiae* ВГНКИ-2, *Canicola* ВГНКИ-3, *Tarassovi* ВГНКИ-4, *Sejroe Hardjo* и *Pomona* ВГНКИ-6, выращенные на среде из крови и сыворотки овец, гидролизате казеина, приготовленных специальными методами, концентрировали на ультрафильтрационных установках, определяли их количество в счетной камере Петрова-Хауссера.

Основная задача при производстве концентрированной вакцины против лептоспироза – это ее стандартизация по содержанию лептоспирозных антигенов. В предварительных исследованиях, учитывая данные по иммуногенности поливалентной депонированной вакцины ВГНКИ и степени сгущения лептоспир в культуре, мы пришли к заключению, что лептоспиры каждой серологической группы в 3-4 валентной вакцине должны содержаться в концентрациях 750 млн.м.к./см³ в зависимости от способа приготовления концентрированной вакцины против лептоспироза.

Концентрат лептоспир разводили растворителем до 800 млн./см³ при смешивании с адьювантом ПЭГ 600 и до 750 млн./см³ при смешивании с аэросилом.

Результаты исследований по определению уровня титра специфических антител к лептоспирам различных серогрупп приведены в таблице 1 и 2.

Таблица 1 - Титр специфических антител в сыворотке крови кроликов в РМА при внутримышечной иммунизации животных

Производственные штаммы		Способ приготовления вакцины		
		поливалентная депонированная вакцина (контроль)	концентрат лептоспир с аэросилом	концентрат лептоспир с адьювантом ПЭГ 600
Титр антител в РМА	<i>Grippotyphosa</i>	1:224±12	1:668±20	1:720±12
	<i>Icterohaemor-rhagiae</i>	1:52±4	1:124±8	1:144±8
	<i>Canicola</i>	1:100±2	1:126±12	1:166±15
	<i>Tarassovi</i>	1:208±8	1:612±16	1:680±22
	<i>Sejroe Hardjo</i>	1:118±9	1:224±8	1:262±13
	<i>Pomona</i>	1:226±12	1:420±12	1:482±15
Выжило хомяков, % зараженных		44±6	85±5	92±5

Таблица 2 - Титр специфических антител в сыворотке крови кроликов в РМА при внутривенной иммунизации животных

Производственные Штаммы		Способ приготовления вакцины		
		поливалентная депонированная вакцина (контроль)	концентрат лептоспир с аэросилом	концентрат лептоспир с адьювантом ПЭГ 600
Титр антител в РМА	<i>Grippotyphosa</i>	1:460±8	1:640±15	1:485±22
	<i>Icterohaemor-rhagiae</i>	1:120±6	1:146±9	1:180±9
	<i>Canicola</i>	1:100±2	1:208±8	1:182±9
	<i>Tarassovi</i>	1:146±8	1:482±13	1:486±15
	<i>Sejroe Hardjo</i>	1:284±6	1:266±4	1:228±6
	<i>Pomona</i>	1:622±12	1:708±16	1:760±28
Выжило хомяков, % зараженных		82±6	94±8	100±4

Из данных таблиц 1 и 2 видно, что концентрат лептоспир как с аэросилом, так и с полимерным адьювантом, обладает выраженной иммуногенностью и при внутримышечной, и при внутривенной иммунизации. Поливалентная вакцина с гидроокисью алюминия проявляет иммуногенность только при внутривенном введении.

Концентрат лептоспир при небольшой дозе 0,5-2,0 см³ обеспечивает адекватный иммунный ответ, характеризуется малой иммунизирующей дозой, устойчив к нагреванию.

При хранении концентрата в течение 6 месяцев в термостате при температуре 37⁰С иммуногенная активность его не изменяется, что свидетельствует о высокой устойчивости антигенов лептоспир в процессе хранения.

Заключение. На основании полученных результатов работы можно сделать следующие выводы:

1. Разработан способ концентрирования лептоспир, который может быть использован при изготовлении противолептоспирозных биопрепаратов.

2. Концентрат, приготовленный по предлагаемому способу, обеспечивает формирование активного иммунитета у лабораторных животных и высокую устойчивость лептоспир в процессе хранения.

Литература: 1. Вакцина против лептоспироза животных лиофилизированная / А.Н. Панин [и др.] // *Ветеринария*. – 2002. – № 1. – С. 21-24. 2. Ситьков, В.И. Совершенствование технологии промышленного изготовления вакцины для профилактики лептоспироза животных / В.И. Ситьков // *Сб. науч. трудов Ставропольской ГСХА*. – Ставрополь, 1995. – С. 33-35. 3. Ситьков, В.И. Опыт промышленного изготовления вакцины для профилактики лептоспироза животных / В.И. Ситьков // *Матер. межд. конф.* – Барнаул, 1995. – С. 91-92. 4. Ситьков, В.И. Основные биотехнологические приемы изготовления вакцин для профилактики лептоспироза / В.И. Ситьков // *Матер. Всесоюз. конф. РАН*. – Ставрополь, 1996. – С. 32-33. 5. Ситьков, В.И. Опыт приготовления сухой вакцины против лептоспироза животных / В.И. Ситьков // *Тезисы докл. науч.-произв. конф.* – Курск, 1996. – С. 197. 6. Ситьков, В.И. Научные и практические основы промышленного производства и применения вакцин / В.И. Ситьков // *Диссертация в форме научного доклада на соискание ученой степени доктора ветеринарных наук*. – 1997. – С. 62. 7. Ситьков, В.И. Новая питательная среда для культивирования лептоспир / В.И. Ситьков, В.А. Бобрышев, И.К. Тутов // *Матер. межд. конф.* – Барнаул, 1996. – С. 98-99. 8. Ситьков, В.И. Концентрирование лептоспир на модульной установке МСМ-1,5 / В.И. Ситьков, В.Н. Лемешко // *Тезисы докл. 5-й Всерос. конф. Щелково, 1996*. – С. 247-249. 9. Ситьков, В.И. Опыт получения сухой вакцины против лептоспироза животных / В.И. Ситьков, В.Н. Лемешко // *Тезисы докл. 5-й Всерос. конф. Щелково, 1996*. – С. 99. 10. Ситьков, В.И. Изыскание оптимальных условий концентрирования лептоспир / В.И. Ситьков, В.Н. Лемешко // *Вестник ветеринарии*. – 1996. – № 1. – С. 73-75. 11. Ситьков, В.И. Опыт промышленного изготовления вакцины против лептоспироза / В.И. Ситьков, В.Н. Лемешко, И.К. Тутов // *Ветеринария*. – 1996. – № 1. – С. 9-10. 12. Ситьков, В.И. Теоретические, научные и практические основы приготовления вакцин для профилактики лептоспироза животных / В.И. Ситьков, И.К. Тутов // *Тезисы докл. науч.-произв. конф.* – Курск, 1996. – С. 280-281.

УДК 619 : 615.37 : 635

АКТУАЛЬНОСТЬ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРИМЕНЕНИЯ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИХ СРЕДСТВ НА ОСНОВЕ ЛИПОПОЛИСАХАРИДОВ ГРАМОТРИЦАТЕЛЬНЫХ БАКТЕРИЙ (Современный подход и направления)

Зайцев В.В., Зайцева А.В., Дремач Г.Э.

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

Авторами статьи приводятся сведения о перспективности применения иммуномодуляторов на основе липополисахаридов грамотрицательных бактерий, механизме их действия на организм животных, разработке отечественных препаратов.

The article features the data on prospectives for application of the immunomodulants derived from lipopolysaccharides of gramnegative bacteria, affect on the organism, development of domestic.

Современная эпизоотическая ситуация по инфекционным болезням в Республике Беларусь, странах ближнего и дальнего зарубежья требует напряжённой работы по созданию и реализации эффективных средств и способов их профилактики.

Следует констатировать, что интенсивная эксплуатация животных с целью увеличения их продуктивности, обилие различных стресс-факторов снижает резистентность животных вследствие поражения иммунной системы и механизмов неспецифической защиты.

Известно немало случаев проявления вторичных иммунодефицитов, являющихся результатом нарушений содержания и кормления, переболевания животных в раннем возрасте, бессистемного применения лечебных препаратов, обладающих иммунодепрессивным действием.

Применение антимикробных средств для лечения и профилактики болезней животных не только вызывает дисбактериоз, но и приводит к исчезновению тех штаммов бактерий, которые синтезируют витамины, и дефициту витаминов, в частности группы В.

Явления иммунодефицитов усугубляют продукты метаболизма антибиотиков, противовоспалительные препараты, анестетики. Иммунная недостаточность приводит к снижению эффективности проводимой терапии, способствует активации условнопатогенной флоры.

Увеличение персистенции патогенных микроорганизмов на фоне местного иммунодефицита способствует длительному переживанию бактерий в кишечнике. Неконтролируемый генерализованный ответ организма вызывает септический синдром, выражающийся в системном поражении тканей и органов, диссеминированному внутрисосудистому свёртыванию, дыхательной недостаточности и летальном исходе [14].

Хроническое воспаление как альтернатива генерализованному ответу развивается в иммунодефицитном организме, неспособном к осуществлению полноценного острофазового ответа. Результаты хронич-