

ПОЛУЧЕНИЕ И КОНТРОЛЬ ПОЛИВАЛЕНТНОЙ АНТИТОКСИЧЕСКОЙ СЫВОРОТКИ ПРОТИВ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА ТЕЛЯТ, ПОРΟΣЯТ И ПТИЦ

Даровских С.В.

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

г. Витебск, Республика Беларусь

Введение

Эффективность развития животноводства в значительной мере зависит от эпизоотической ситуации по инфекционным болезням, особенно вызываемым условно-патогенной микрофлорой, на долю которых в Республике Беларусь приходится 89,9% от количества неблагополучных пунктов. Среди этих заболеваний особое место занимает сальмонеллез, который наносит значительный экономический ущерб животноводству [4].

Проблему сальмонеллеза ставят в ряд важнейших ветеринарных и медико-экологических проблем. Это связано с увеличением числа серологических вариантов возбудителей, обнаруженных у сельскохозяйственных животных, птиц и людей, контаминацией сальмонеллами пищевых продуктов животного происхождения и различных объектов внешней среды. Расширился спектр типов бактерий, циркулирующих среди поголовья различных видов животных и птиц [2].

Отслеживание эпизоотической ситуации, определение этиологической структуры сальмонеллеза – необходимое условие и основание для конструирования новых и совершенствования применяющихся специфических препаратов для лечения и профилактики болезни. При изучении литературных источников и анализе ветеринарной отчетности за последние пять лет было выявлено, что в Республике Беларусь наиболее часто сальмонеллез у телят, поросят и птиц вызывали следующие сероварианты сальмонелл: *Salmonella dublin*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis*, *Salmonella choleraesuis*. На долю других сальмонелл (*S.london*, *S. humber*, *S. cholerae suis*, *S. pullorum-gallinarum* и др.) выделяемость бактерий была весьма незначительна.

В настоящее время для специфической пассивной профилактики и лечения применяют антитоксическую поливалентную сыворотку против сальмонеллеза телят, поросят, ягнят и птиц. Этот препарат получают на УП «Витебская биофабрика» путем гипериммунизации волов-производителей поливалентным антигеном, не содержащим в сво-

ем составе антител против тех серовариантов сальмонелл, которые наиболее часто выделяются в различных хозяйствах РБ, что является одной из причин низкой эффективности данного биопрепарата [1,3].

В этой связи целью нашей работы явились разработка и получение сыворотки для профилактики и лечения сальмонеллеза животных и птиц, содержащей в своем составе антитела против тех серовариантов сальмонелл, которые наиболее часто выделяются в РБ (*Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella dublin*, *Salmonella enteritidis*).

Материалы и методы

Совместно сотрудниками кафедры микробиологии и вирусологии УО ВГАВМ и УП «Витебская биофабрика» разработана и выпущена опытная серия препарата «Сыворотка поливалентная антитоксическая против сальмонеллеза телят, поросят и птиц».

Получение гипериммунной сыворотки представляет собой сложный и поэтапный процесс. Вначале отобрали волов, будущих продуцентов препарата. На следующем этапе мы сконструировали новый антиген, в который входили следующие штаммы сальмонелл: *Salmonella cholerae suis*, *Salmonella typhimurium*, *Salmonella dublin*, *Salmonella enteritidis*.

Производственные штаммы сальмонелл (*S. cholerae suis* 370, *S. typhimurium* 371, *S. dublin* 373) были получены на УП «Витебская биофабрика». К производственным штаммам прилагаются паспорта, в которых дана полная характеристика микроорганизмов. Штаммы хранились в сухом виде в ампулах. Производственные штаммы сальмонелл перед использованием проверили на чистоту и изучили их биологические свойства, которые соответствовали паспортным данным.

Культура *Salmonella enteritidis* была выделена из патматериала при проведении бактериологических исследований на кафедре микробиологии и вирусологии УО ВГАВМ. Были изучены биологические свойства штамма с последующей паспортизацией.

Проверенные культуры, каждую отдельно, засевали в баллоны, содержащие бульон Хоттингера, и культивировали при 37 ± 1 °C в течение 10 часов. Параллельно проводили контроль чистоты роста. Затем полученные культуры сальмонелл смешивали в одной емкости в соотношении 1:1 и добавляли формалин (содержание формальдегида не менее 36,6%), выдерживали в термостате 25 суток при 37 ± 1 °C, с целью инактивации.

Далее провели сорбцию антигена с помощью 4%-ного раствора гидроксида алюминия в течение 3 суток при 20 °C. После отстаивания готовый антиген концентрировал до 10 млрд. микробных клеток путем декантации надосадочной жидкости. Полученный антиген проверяли на стерильность путем посева на МПА, МПБ, среду Китта-Тароцци и агар Сабуро, а также измеряли pH. Для контроля безвредности антиген вводили подкожно 5 белым мышам массой 16–18 г в дозе 0,5 см³. Проверенный антиген использовали для гипериммунизации волов.

Для гипериммунизации отбирали только клинически здоровых животных, перед инъекцией антигена продуцентов выдерживали на голодной диете в течение 20 часов. Схема иммунизации включала 4 инъекции (чередование 2 внутрибрюшинных и 2 подкожных), с интервалом 5 суток, в дозах 5, 10, 15 и 20 см³ соответственно. За всеми животными вели ежедневное наблюдение, контролируя их состояние после каждой инъекции.

Спустя 10 суток провели забор крови у иммунизированных продуцентов из расчета 16 см³ на кг живой массы. Для предохранения крови от свертывания применяли антикоагулянт (10%-й раствор натрия лимоннокислого).

На следующем этапе полученную кровь сепарировали, чтобы отделить форменные элементы крови и получить плазму. Полученную плазму дефибрировали в дефибринаторе с добавлением 30%-го раствора хлористого кальция.

Полученную сыворотку консервировали 5%-ным раствором фенола, до содержания его в препарате не более 0,5%.

Далее готовую сыворотку подвергали отстою в отстойниках на протяжении 40 суток при температуре +2...+15 °С. По истечении срока отстоя сыворотку осветляли и фильтровали с помощью картонных фильтров «Т», «КФО-1» и «КФМ». Затем полученный препарат мы подвергали стерильной фильтрации с помощью фильтрационной установки PALL и фасовали в стерильные флаконы объемом 200 см³, укупоривали резиновыми пробками, закатывали металлическими колпачками.

Заключительный контроль опытной серии препарата «Сыворотка поливалентная антитоксическая против сальмонеллеза телят, поросят и птиц» проводили в ОКК УП «Витебская биофабрика» на безвредность, стерильность и иммунную активность.

Для определения безвредности использовали 5 белых мышей массой 16–18 г, полученных из вивария УП «Витебская биофабрика», благополучного по инфекционным заболеваниям. Препарат вводили подкожно в области спины в количестве 0,5 см³, после обработки места инъекции тампоном, смоченным 70-градусным спиртом. Наблюдение за подопытными животными вели в течение 10 суток.

Изучение иммунной активности сыворотки заключалось в определении ее профилактических свойств после иммунизации морских свинок и голубей и последующего их заражения патогенными культурами сальмонелл. Для определения иммунной активности сыворотки в отношении *S. typhimurium*, *S. dublin*, *S. enteritidis* брали по пять морских свинок на каждый серотип сальмонелл и вводили подкожно по 0,5 см³ сыворотки в смеси с 0,5 см³ физиологического раствора. Через 24 часа иммунизированных животных и трех контрольных в каждой группе заражали подкожно 4 ЛД₅₀ контрольных штаммов *S. typhimurium* (371), *S. dublin* (373), *S. enteritidis*. Активность препарата по отношению к *S. cholerae suis* (370) проверяли на шести голубях. Исследуемую сыворотку им вводили в количестве 1 см³ на голову.

Через 24 часа опытных голубей и трех контрольных заражали внутримышечно в грудную мышцу 4 ЛД₅₀ штаммом *S. cholerae suis* (370). За зараженными животными вели наблюдение в течение 10 суток.

С целью определения стерильности использовали МПА, МПБ, агар Сабуро и среду Китта-Тароцци, по две пробирки каждой среды. Для проведения испытания использовали 5 флаконов из опытной партии сыворотки. Из каждого флакона засеивали в количестве по 0,2 см³ в пробирки с МПА, МПБ, агаром Сабуро и средой Китта-Тароцци и по 2 см³ во флаконы с МПБ и средой Китта-Тароцци. Посевы проводили из каждого флакона испытуемого препарата в 2 пробирки и в 2 флакона с каждой средой. Через двое суток из флаконов с МПБ проводят пересев в указанном выше объеме в 2 пробирки с МПА, а во флаконы с МПБ.

Посевы на агаре Сабуро выдерживали в термостате при температуре 20–22 °С, а на остальных средах – при температуре 37±1°С в течение 10 суток. Вторичные посевы на питательных средах выдерживали в течение 8 суток.

Результаты исследований

В результате изучения морфологических, культуральных, ферментативных, патогенных и антигенных свойств установлено, что *S. dublin*, *S. typhimurium*, *S. cholerae suis*, *S. enteritidis* – грамотрицательные палочки длиной 2–5 мкм и шириной 0,7–1,5 мкм, без спор и капсул, обладают подвижностью.

На МПА образуют прозрачные с голубоватым оттенком колонии в «S» форме, диаметром 2–3 мм. На МПБ через 18–20 часов инкубирования в термостате вызывают равномерное помутнение среды. На агаре Эндо культуры образуют колонии прозрачные, бледно-розовые, на среде Левина – прозрачные с фиолетовым блеском, на агаре Плоскирева – бесцветные, непрозрачные, на висмут-сульфит агаре – черные с металлическим блеском (*S. cholerae suis* образует нежно-зеленые колонии). В биохимическом отношении штаммы ферментируют с образованием кислоты и газа глюкозу, маннит, ксилозу, сорбит, арабинозу, дульцит; не ферментируют лактозу и сахарозу; образуют сероводород, не образуют индол.

В антигенном отношении культуры изучили в реакции агглютинации с О- и Н-агглютинирующими диагностическими сыворотками. Все культуры дали положительную РА с соответствующими сыворотками.

Штаммы сальмонелл обладали вирулентными свойствами, LD₅₀ для белых мышей массой 14–16 г., что составляло 100 микробных клеток при подкожном введении. Готовый инактивированный антиген был признан безвредным, т.к. в течение 10 суток мыши оставались живыми и клинически здоровыми.

Величину pH измеряли с помощью pH-метра трижды и подсчитали среднее арифметическое значение, которое составило 7,3.

Полиантиген признали стерильным, потому что после высева на питательные среды рост микроорганизмов и грибов отсутствовал в течение 10 суток. После гипериммунизации волов-производителей, взятия крови, получения из нее сыворотки, последующего отстаивания и фильтрации мы получили опытную серию биопрепарата, который подвер-

гли контролю в ОКК УП «Витебская биофабрика». При этом установили, что полученная сыворотка была:

– безвредной, т.к. в течение 10 суток животные оставались живыми и клинически здоровыми, а на месте введения препарата отека не наблюдалось;

– активной (иммуногенной), т.к. за период наблюдения за зараженными животными все морские свинки и голуби выжили, а у контрольных животных была зафиксирована гибель;

– стерильной, т.к. в течение 10 суток рост микроорганизмов на питательных средах отсутствовал.

Заключение

В ходе экспериментальной работы мы получили препарат «Сыворотка поливалентная антитоксическая против сальмонеллеза телят, поросят и птиц». Опытная серия биопрепарата для пассивной профилактики и лечения сальмонеллеза животных обладает высокой иммунной активностью, стерильна и безвредна. Полученные результаты будут использованы для разработки ТУ и наставления по применению биопрепарата.

ЛИТЕРАТУРА

1. Борисович, Л.В. Ветеринарные препараты: справочник / Ю.Ф. Борисович, Л.В. Кириллов; под ред. Д.Ф. Осидзе. – Москва: Колос, 1981. – 448
2. Емельяненко, П.А. Ветеринарная микробиология /Л.А. Емельяненко, Т.В. Дунаев, Д.Г. Кудлай. - Москва: Колос, 1982. - 304 с.
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: научно-практический журнал\ Витеб. госуд. академия ветер. медицины. - Витебск, 2006.-Т.42. ч.2- с.37-40
4. Аксенов, А. М. Задачи ветеринарной медицины в стабильном развитии животноводства республики / А. М. Аксенов // Современные вопросы патологии сельскохозяйственных животных: материалы международной научно-практической конференции, Минск, 23 - 24 октября 2003 года. - Минск, 2003. - С. 3-5.

РЕЗЮМЕ

В статье автором изложена информация по получению нового препарата для пассивной иммунизации животных и птиц против сальмонеллеза, содержащего в своем составе антитела против тех серовариантов сальмонелл, которые наиболее часто выделяются в хозяйствах РБ. Также описаны методы заключительного контроля на разработанный биопрепарат.

SUMMARY

The article features the data on a new compound for preventive immunization of animals and birds against salmonellosis which contains antibodies against the serovars most frequently isolated in the farms. The methods for conclusive control of the compound has been described.