

Лептоспиры, выращенные на среде ПСР, сохранялись наиболее короткое время – 24 часа (табл. 5).

Таблица 5 – Сроки персистенции лептоспир в организме морских свинок, выращенных до их инфицирования на среде ПСР

Сроки посева крови из органов после инфицирования, часов	Результаты исследования посевов в темном поле микроскопа					
	L. pomona	L. tarassovi	L. grippothyphosa	L. icterohaemorrhagiae	L. conicola	L. sejroe
8	+	+	+	+	+	+
24	+	+	+	+	+	+
36	–	–	–	–	–	–
48	–	–	–	–	–	–
60	–	–	–	–	–	–

Примечание: "+" - лептоспиры, выявленные микроскопически;
"–" - лептоспиры, не выявленные микроскопически.

Различия в сроках персистенции указанных групп лептоспир в организме инфицированных животных статистически значимы.

Определение выживаемости лептоспир в перитонеальном экссудате морских свинок, является простым, легко выполнимым и быстрым тестом при оценке патогенности лептоспир в зависимости от состава питательной среды.

Определение сроков персистенции в организме морских свинок на основе посевов крови и кусочков внутренних органов в жидкую питательную среду, являющееся более трудоемким, кропотливым, тем не менее является более надежным и позволяет установить влияние свойств питательной среды на патогенность лептоспир и четко дифференцировать их по данному признаку.

В результате проведенной работы с помощью тестов микроскопического исследования перитонеальной жидкости и определения сроков персистенции микроорганизмов нами установлено, что среды ССФР и ССФБ обеспечивают сохранение и поддержание высокой вирулентности лептоспир и могут использоваться в производстве противолептоспирозных препаратов.

Закключение. По результатам проведенной работы нами установлена корреляция между сроками выживания лептоспир в организме лабораторных животных в зависимости от среды их культивирования.

Статья поступила 5.05.2009 г.

УДК 619 : 615.371 / 372 : 616.986.7

ОЦЕНКА РОСТОВОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТОЧНЫХ И АЛЬБУМИНОВЫХ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД

Зайцев В.В.

УП «Витебская биофабрика», г. Витебск

Установлено, что альбуминовая питательная среда пригодна только для однократного посева из-за дальнейшего снижения антигенной активности лептоспир. Предложены модифицированные сывороточные среды, содержащие 2–5% фактор биосинтеза, которые обеспечивают накопление лептоспир с высокой антигенной активностью.

It has been established that albumin growth medium is useful for single recovery due to antigenic decline of leptospirae. Modified serum media containing the biosynthesis factor (2–5%) have been proposed allowing accumulation of leptospirae with high antigenic activity.

Введение. 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 среде из сыворотки крови кролика, в последующих работах использовали разведенную сыворотку.

Простейшая сывороточная среда представляет собой смесь стерилизованной воды с асептически полученной сывороткой крови кролика или овцы в разных количествах.

Известно значительное количество сывороточных сред различного состава [6]. Это среды Уленгута (1917), полужидкая среда Флетчера (1928), Кортгафа (1932), Ферворт-Вольфа в модификации Тарассова (1937). Каждая из этих сред содержит 5–10% сыворотки крови кролика или барана, фосфатный буфер или дистиллированную воду, витамины группы В и некоторые другие добавки. Сывороточные среды используют для поддержания производственных штаммов лептоспир и получения матровых и производственных расплодов [2].

Для культивирования лептоспирозных бактерий в настоящее время используют сывороточные среды: Любашенко [8], среда, предложенная сотрудниками УО ВГАВМ А.В. Зайцевой, Г.Э. Дремачем [3]. Применяется также жидкая питательная среда для лабораторного выращивания патогенных лептоспир на основе белков лизированной крови кролика [1].

Вторая группа сред – это полусинтетические и синтетические белковые и безбелковые питательные среды. Основное внимание уделяется работе с этими питательными средами, т.к. накопление лептоспир на них значительно выше, чем на сывороточных средах [8].

Приоритет в создании синтетических и полусинтетических сред принадлежит зарубежным исследователям. Наиболее широкое распространение получили следующие среды: синтетическая безбелковая среда Шенберга (1967), твин (полисорбат) – альбуминовая среда Элленгаузена в модификации Джонсона (1967), синтетическая

безбелковая среда Торнея (1974), среда Элленгаузена (1976), твин (полисорбат) – альбуминовая среда Рассела (1986) и др.

Полусинтетические среды, также как и сывороточные, имеют сходный состав. Они содержат фосфатный буфер, растворы неорганических солей, витамины группы В, жирные кислоты и бычий альбумин.

В настоящее время разработаны и апробированы среды, содержащие в своем составе различные альбумины и пригодные для выращивания лептоспир [4, 5, 6, 7].

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

В настоящее время методика отбора штаммов по степени иммуногенности заключается в многократном клонировании испытуемых штаммов на плотной среде с постоянным отбором типичных колоний и последующим сопоставлением однотипных клонированных штаммов по иммуногенной и антигенной активности.

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

Цель настоящей работы – изготовление и оценка ростовой активности сывороточных и альбуминовых сред.

Материал и методы исследований. В работе использовали 6 патогенных штаммов: *Leptospira romona* ВГНКИ-6; *Leptospira tarassovi* ВГНКИ-4; *Leptospira grippothyphosa* ВГНКИ-1; *Leptospira icterohaemorrhagia* ВГНКИ-2; *Leptospira canicola* ВГНКИ-3; *Leptospira sejroe* 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 (ССФБ);
- полусинтетическая среда Рассела в модификации В.И. Ситькова (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 2–10°C. Отстоявшуюся сыворотку сливали в стерильные бутылки, которые помещали в водяную баню с температурой 57–58°C и прогревали при периодическом перемешивании в течение 30 минут.

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

Для приготовления альбуминовой среды первоначально готовили следующие растворы:

1. Исходные растворы каждого компонента (из расчета г/100 см³ дистиллированной воды): NH₄Cl – 25,0; ZnSO₄·7H₂O – 0,4; MgCl₂·8H₂O – 1,5; CaCl₂·H₂O – 1,5; FeSO₄·7H₂O – 0,5; молочнокислый натрий – 10,0; твин-80 – 10,0; витамин В₁ – 0,5; витамин В₁₂ – 0,02.

2. Раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА): БСА фракция У – 10,0; дистиллированная вода – 50,0; CaCl₂ – 1,0; MgCl₂ и ZnSO₄ – по 1 см³ исходного раствора; FeSO₄ – 10,0 см³ свежеприготовленного исходного раствора; витамин В₁₂ – 12 см³, твин-80 – 1,25 см³. Доводили pH до 7,4, добавляли дистиллированную воду до 100 см³, стерилизовали фильтрованием.

3. Основная среда (на 996 см³ дистиллированной воды): NaHPO₄ – 1,0; KH₂PO₄ – 0,3; NaCl – 1,0; NH₄Cl – 1,0; тиамин – 1,0; молочнокислый натрий – 1,0; глицерин – 1,0. Доводили pH до 7,4, стерилизовали при 121°C в течение 20 минут.

Основу среды и раствор альбумина смешивали в соотношении 9:1 и стерилизовали фильтрацией.

Далее по рекомендации В.И. Ситькова [5] в состав среды включили 0,5% сыворотки крови барана и 0,5–1,0% фактора роста, приготовленного из экстракта печени.

Сывороточные среды готовили согласно ранее описанным методам [2, 7].

Приготовленные питательные среды разливали по пробиркам. Произвели засев каждого штамма лептоспир в пробирки с разными питательными средами. Далее из одной пробирки с каждым штаммом делали пересев в 4–5 пробирок, содержащих по 8–10 см³ питательной среды, внося в них по 0,5–1,0 см³ культуры. Накопление лептоспир в поле зрения микроскопа наблюдали через 7 суток культивирования при температуре 27–28°C.

В дальнейшем каждый штамм поддерживали путем пересева через 5, 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 18–20°C без доступа света в течение 1, 3 и 6 месяцев.

Каждую партию питательной среды проверяли на пригодность для культивирования лептоспир путем посева определенного производственного штамма на 3–5 пробирок со средой.

Подвижность и морфологию лептоспир изучали в поле зрения микроскопа при увеличении 40 × 7, 10.

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

С целью изучения биологической активности каждый штамм водили кролику с соблюдением правил асептики в ушную вену однократно в дозе 15 млн.м.к. Через 25 дней после введения штамма у кроликов из ушной вены брали 5 см³ крови, получали сыворотку и исследовали ее в РМА. Каждую пробу сыворотки разводили физиологическим раствором по схеме, приведенной в таблице 1.

РМА ставили на пластинах из органического стекла с лунками, смешивая 0,1 см³ сыворотки из каждого разведения с 0,1 см³ культуры лептоспир (антиген). При этом разведение сыворотки удваивалось.

Культуры (антиген) использовали 5–10 суточного роста с накоплением 60–100 подвижных лептоспир в поле зрения микроскопа. Сыворотку крови кроликов испытывали в РМА с определенным производственным вакцинным штаммом. Контролем реакции служила смесь культур с физиологическим раствором по 0,1 см³, в которой лептоспиры оставались подвижными, без видимых изменений морфологии, признаков агглютинации и лизиса.

Таблица 1 – Схема разведения сыворотки физиологическим раствором

№№ пробирок	Объем (см ³)		Разведение сыворотки	
	физраствор	сыворотка	до смешивания с антигеном	после смешивания с антигеном
1	9,6	0,4	1:25	1:50
2	1,0	1,0 из разв. 1:25	1:50	1:100
3	1,0	1,0 из разв. 1:50	1:100	1:200
4	1,0	1,0 из разв. 1:100	1:200	1:400
5	1,0	1,0 из разв. 1:200	1:400	1:800
6	1,0	1,0 из разв. 1:400	1:800	1:1600
7	1,0	1,0 из разв. 1:800	1:1600	1:3200

Пластины, содержащие смесь сывороток с антигеном, помещали в термостат и выдерживали в течение 1 часа при температуре 30–37°С.

Реакцию читывали под микроскопом с конденсором темного поля при увеличении 20×1,5×10 или 20×10, 15 и оценивали в крестах по четырехбалльной системе:

- четыре креста – агглютинированы 100% лептоспир;
- три креста – агглютинированы 75% лептоспир;
- два креста – агглютинированы 50% лептоспир;
- один крест – агглютинированы 25% лептоспир
- минус – агглютинация отсутствует.

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. Сравнительная оценка культивирования лептоспир на средах разного состава (таблица 2) показала, что накопление бактериальной массы на альбуминовой среде превышало накопление в сывороточной среде в 3,4–6,2 раза.

Таблица 2 – Сравнительная оценка накопления лептоспир в сывороточной и альбуминовой среде по В.И. Ситькову

Производственные штаммы лептоспир	Накопление лептоспир в средах, млн/см ³	
	сывороточная	альбуминовая
<i>L. grippothyphosa</i>	81,8±1,0	342±8,0
<i>L. icterohaemorrhagiae</i>	92,5±1,4	388±10,0
<i>L. canicola</i>	75,8±1,2	368±8,0
<i>L. tarassovi</i>	98,4±1,6	485±12,0
<i>L. sejroe</i>	82,5±1,2	508±12,0
<i>L. pomona</i>	92,6±1,6	436±16,0

Учитывая, что при пересевах на альбуминовых средах лептоспиры утрачивали биосинтез специфических антигенов, нами были изучены эти показатели у спирохет, выращенных на альбуминовой среде по В.И. Ситькову.

Результаты исследований представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Сравнительная оценка антигенной активности лептоспир, выращенных на сывороточной и альбуминовой средах

Количество пересевов в альбуминовой среде	Титр антител в сыворотке крови кроликов к лептоспирам серогрупп					
	Pomona	Tarassovi	Grippothyphosa	Sejroe	Canicola	Icterohaemorrhagiae
1	1:1600	1:400	1:1600	1:1600	1:800	1:800
2	1:800	1:400	1:800	1:800	1:800	1:400
3	1:200	1:100	1:100	1:50	1:100	1:100
Сывороточная среда (контроль)	1:1600	1:800	1:3200	1:1600	1:800	1:800

Как видно из таблицы 3, лептоспиры на альбуминовой среде утрачивают антигенную активность, хотя и сохраняют способность к активному размножению.

Таким образом, альбуминовая питательная среда по В.И. Ситькову обеспечивает интенсивное накопление лептоспир всех испытанных серогрупп и пригодна только для однократного посева при условии включения в ее состав не менее 0,5% сыворотки барана.

Для вторичной раскладки альбуминовая среда непригодна из-за снижения антигенной активности выращенных на ней лептоспир.

В последующих опытах нами дана оценка ростовой активности экспериментальных сывороточных сред ССФР и ССФБ (таблицы 4 и 5).

Из данных, представленных в таблице 4, видно, что при включении в среду 5–10% фактора роста, отмечается максимальное накопление спирохет 560–716 млн.м.к./см³.

Таблица 4 – Накопление лептоспир в среде ССФР в зависимости от концентрации фактора роста

Наименование штаммов	Накопление лептоспир (млн.м.к./см ³) в среде, содержащей фактор роста, %				
	0	2	5	10	20
Grippothyphosa	90,4±0,8	212±4	624±32	685±40	704±36
Icterohaemorrhagia	92,8±1,4	176±8	588±20	672±28	688±25
Canicola	82,6±1,0	182±5	560±18	653±22	670±20
Tarassovi	96,2±1,4	208±6	638±22	705±20	726±18
Sejroe	85,0±1,2	194±4	632±20	689±20	712±24
Pomona	94,6±1,5	204±5	636±24	716±30	742±32

Включение в среду более 10% регулятора роста экономически невыгодно, добавление менее 5 % – приводит к существенному снижению интенсивности размножения лептоспирозных бактерий.

Титр антител в сыворотках крови кроликов к лептоспирам серогрупп Pomona, Tarassovi, Grippothyphosa, Sejroe, Canicola и Icterohaemorrhagia, выращенных на среде, содержащей 5–10% фактора роста, составил соответственно 1:1600, 1:800, 1:3200, 1:1600, 1:800 и 1:800.

Из результатов, сведенных в таблице 5, видно, что среда ССФБ₃, содержащая фактора биосинтеза 2–5%, обеспечивает накопление лептоспир в количестве 712–904 млн.м.к./см³.

Таблица 5 – Накопление лептоспир в среде ССФБ в зависимости от концентрации фактора биосинтеза

Наименование штаммов	Накопление лептоспир (млн.м.к./см ³) в среде, содержащей фактор биосинтеза, %				
	0	1	2	5	10
Grippothyphosa	90,4±0,8	412±8	736±12	820±10	842±16
Icterohaemorrhagia	92,8±1,4	426±6	755±10	806±12	810±10
Canicola	82,6±1,0	366±8	704±14	752±14	766±18
Tarassovi	96,2±1,4	436±12	822±20	904±20	922±22
Sejroe	85,0±1,2	378±12	735±18	808±20	832±24
Pomona	94,6±1,5	340±15	712±16	820±22	872±26

При концентрации фактора биосинтеза в среде менее 2% отмечается существенное снижение интенсивности роста всех серогрупп лептоспир. Включение в состав питательной среды более 5% фактора биосинтеза экономически нецелесообразно.

Титр антител в сыворотках крови кроликов к лептоспирам серогрупп Pomona, Tarassovi, Grippothyphosa, Sejroe, Canicola и Icterohaemorrhagia составил соответственно 1:1600, 1:800, 1:1600, 1:1600, 1:800 и 1:1600.

Заключение. По результатам проведенной работы установлено, что альбуминовая питательная среда обеспечивает интенсивное накопление лептоспир всех испытанных серогрупп лептоспир, но пригодна только для однократного посева.

Для вторичной расплодки альбуминовая среда непригодна, так как снижает антигенную активность лептоспир.

Предлагаемые модифицированные сывороточные среды, содержащие 2–5% фактора биосинтеза, обеспечивают накопление лептоспир в количестве 712–904 млн.м.к./см³ с высокой антигенной активностью.

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. Зайцев, В.В. Разработка метода концентрирования лептоспир / В.В. Зайцев, Г.Э. Дремач // Ученые записки УО ВГАВМ. – Витебск: УО ВГАВМ, 2007. – Т. 43. – Вып. 2. – С. 45–48. 3. Зайцева, А.В. Среда для выращивания лептоспирозных бактерий / А.В. Зайцева, Г.Э. Дремач // Патент РБ № 7321. – 2005. 4. 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. 5. 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. 6. 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. 7. Соболева, Г.Л. Рост лептоспир в альбуминовой питательной среде / Г.Л. Соболева // Биологические препараты против инфекционных болезней животных. – М., 1981. – С. 51–54. 8. Справочник ветеринарного лаборанта / Ф.З. Андросов [и др.]; под ред. В.Я. Антонова. – М.: Колос, 1981. – С. 37.

Статья поступила 24.05.2009 г.

УДК 619:579.842.11

ПОЛУЧЕНИЕ АДГЕЗИВНЫХ АНТИГЕНОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ КОЛИБАКТЕРИОЗА E. coli

Зайцев В.В., *Дремач Г.Э., *Горбунова И.А., Билецкий М.О.

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

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

Проведено исследование по получению адгезивного антигена из баксуспензий эшерихий, отделенных от питательного раствора путем очистки и концентрирования на мембранах УПМ-300 и УПМ-5, что позволяет получить очищенный препарат, удельная активность которого в 2–4 раза выше, чем неочищенного.