

УДК 619:616.98:579.842.14:615.373

ПОЛУЧЕНИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНА ПРОТИВ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА ЖИВОТНЫХ**Медведев А.П., Даровских С.В., Корочкин Р.Б.**УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь.

В статье представлен материал опытной работы по получению иммуноглобулина против сальмонеллеза животных и контролю качества препарата.

The article presents the data on the research work for production of immunoglobulin against salmonellosis and safety control study.

Введение. Для пассивной профилактики сальмонеллеза и лечения животных применяют специфические препараты: гипериммунную сыворотку, сыворотку крови реконвалесцентов, противосальмонеллезный иммуноглобулин. Иммуноглобулин является более эффективным препаратом, чем гипериммунная сыворотка и сыворотка крови реконвалесцентов.

Высокая лечебная эффективность противосальмонеллезного иммуноглобулина объясняется большей концентрацией антител в данном препарате, чем в сыворотках. Известно, что иммуноглобулин оказывает стимулирующее действие на организм, повышает естественную устойчивость животных, способствует их росту и развитию.

Однако существующие способы получения иммуноглобулина сложны, трудоемки, требуют работы при низких температурах и т.д., что в значительной степени ограничивает производство и применение его в ветеринарной практике.

Поэтому мы решили разработать простой и приемлемый для промышленного производства способ получения иммуноглобулина против сальмонеллеза животных.

Исходным сырьем для получения специфического иммуноглобулина явилась сыворотка крови волов, гипериммунизированных формолантигеном из штаммов сальмонелл четырех серологических вариантов: *S. typhimurium*, *S. abortusovis*, *S. dublin*, *S. choleraesuis*.

Материал и методы. Гипериммунизации подвергли здоровых волов массой 380-400 кг. За 18-20 часов до инъекции антигена волам прекращали дачу кормов. Полиантиген волам вводили внутривенно, поочередно, с двух сторон туловища в области голодной ямки, соблюдая правила асептики и антисептики, с интервалом 4-5 суток. По окончании гипериммунизации у волов брали кровь из расчета 16 см³ на 1 кг массы животного. Кровь сепарировали, плазму дефибрировали, получали сыворотку, которую подвергали грубой фильтрации через пластины марки «Ф» с помощью 79-рамных фильтров. Полученную сыворотку консервировали 5%-ным раствором фенола до конечной концентрации 0,5%. Затем определяли в сыворотке количество общего белка, содержание кальция, концентрацию фенола и водородных ионов.

Для фракционирования использовали сыворотку с содержанием белка не менее 6,8%, кальция 0,29-0,33 мг%, фенола – 0,45-0,5%.

Сыворотку перекачивали в реактор, оборудованный мешалкой. Реактор наполняли сывороткой до 9/10 его объема. Определяли pH сыворотки и доводили показатель до 7,8-8,5 10%-ным раствором едкого натрия. Измеряли температуру сыворотки и допускали ее для фракционирования при температуре не выше 20°C.

Осаждали иммуноглобулины полиэтиленгликолем 115 (ПЭГ-115), для чего добавляли в сыворотку 7-9% вещества к ее объему.

Для полного растворения порошкообразного ПЭГ-115 в сыворотке включали мешалку, которую оставляли работающей на 25-30 минут. Затем сыворотку подвергали отстою в течение 24 часов. За это время на дне реактора образовывался плотный белковый осадок. Надосадочную жидкость декантировали из реактора с помощью сифона.

Выход осадка составлял, в зависимости от содержания белка в сыворотке, 3,2-4,1 кг со 100 литров препарата. К белковому осадку добавляли стерильный физраствор из расчета 1:2, включали мешалку на 20-30 минут и получали белковую пасту. Из реактора брали пробу и определяли в ней содержание белка. После этого в реактор добавляли физраствор с таким расчетом, чтобы количество белка в разбавленной пасте не превышало 10-12%, т.е. получали противосальмонеллезный иммуноглобулин. Выход раствора иммуноглобулина составил с 1 кг пасты – 2,4-3,2 л., от исходного объема взятой сыворотки – 10-12%.

Приготовленный иммуноглобулин консервировали 5%-ным раствором фенола, добавляя его до конечной концентрации 0,5 % в препарате. Практически на каждые 9 л противосальмонеллезного иммуноглобулина добавляли литр 5%-ного раствора фенола. Фенол в концентрации 0,5% обеспечивает стерильность препарата. Добавление его в большем количестве недопустимо, т.к. фенол снижает качество препарата, обладает сильным раздражающим действием и является токсическим веществом. Поэтому, чтобы гарантировать стерильность иммуноглобулина, его подвергали стерилизующей фильтрации. В процессе работы было замечено, что раствор иммуноглобулина плохо фильтруется через пластины марки «СФ». В этой связи для интенсификации стерилизующей фильтрации, а также осветления раствора иммуноглобулина, мы предварительно фильтровали его через мезгу, а затем через пластины марки «Ф». Для фильтрации через мезгу использовали нутч-фильтр. Сетку нутч-фильтра выстилали фильтровальной бельтинг-тканью, на которую помещали мезгу (измельченные и размоченные пластины «Ф» слоем 1,5-2,0 см). После этого его фильтровали через пластины «Ф», т.е. подвергали иммуноглобулин так называемой «грубой стерилизации». Заключительным этапом стерилизации иммуноглобулина являлась фильтрация его через пластины «СФ». Для фильтрации иммуноглобулина использовали 79-рамные фильтры. Подготовку пластин «Ф» и «СФ» и 79-рамных фильтров проводили в соответствии с прилагаемыми к ним инструкциями. Перед каждой фильтрацией измеряли величину pH и устанавливали ее в пределах 6,8-7,2 с помощью растворов (10%-ных) соляной кислоты и едкого натрия.

В процессе фильтрации неизбежны потери иммуноглобулина, которые составили в наших опытах 5-7% от исходного объема препарата.

Раствор иммуноглобулина в условиях стерильной комнаты расфасовывали в стерильные флаконы по 200 см³, закрывали стерильными резиновыми пробками и обкатывали алюминиевыми колпачками.

Результаты исследований. В результате проведенной работы предложена схема получения противосальмонеллезного иммуноглобулина, которая включает в себя следующие стадии:

- 1) получение сыворотки против сальмонеллеза животных;
- 2) подготовка исходного сырья для выделения иммуноглобулина;
- 3) фракционирование сыворотки;
- 4) консервация иммуноглобулина;
- 5) стерилизация препарата и его расфасовка.

Схема получения противосальмонеллезного иммуноглобулина перспективна для внедрения в производство. По приведенной схеме нами были приготовлены две опытные серии (№№ 1,2) препарата.

Основные технологические процессы изготовления опытных серий иммуноглобулина представлены на схеме 1.

Схема 1 - Схема технологического процесса

- ТП-1 Гипериммунизация волов сальмонеллезным формолантигеном.
- ТП-2 Взятие крови от волов продуцентов.
- ТП-3 Сепарация крови, отделение форменных элементов.
- ТП-4 Получение исходной сыворотки-сырца. Дефибрирование плазмы.
- ТП-5 Консервирование сыворотки.
- ТП-6 Фракционирование сыворотки.
- ТП-7 Декантация надосадочной жидкости.
- ТП-8 Растворение белкового осадка, получение белковой пасты.
- ТП-9 Получение раствора иммуноглобулина.
- ТП-10 Получение стерильного препарата. Префильтрация (через мезгу, пластины «Ф»). Стерилизующая фильтрация.
- ТП-11 Получение готового продукта. Расфасовка, обкатка, этикетирование.

Для оценки качества приготовленного иммуноглобулина препарат подвергали контролю. Нами была предусмотрена проверка стерильности, безвредности, активности и физико-химических свойств иммуноглобулина.

Из опытных серий отбирали образцы (флакон с препаратом) в начале, середине и конце расфасовки. Всего было взято из каждой серии для контроля по 4 флакона.

Для испытания на стерильность препарат высевали по 0,2-0,3 см³ из каждого флакона в пробирки с МПА, МПБ, МППБ под вазелиновым маслом со средой Сабуро и по 1-2 см³ во флаконы с МПБ и средой Китта-Тароцци. Посевы проводили в 2 пробирки и в 2 флакона с каждой средой из каждого образца препарата.

Пробирки и флаконы с посевами культивировали при температуре 37-38°C. Через трое суток из жидких питательных сред делали пересевы по 1-2 см³ в 2 флакона с МПБ и 2 - со средой Китта-Тароцци. Посевы выдерживали в термостате 10 суток, а пересевы – 8 суток. Посевы на среде Сабуро выдерживали в термостате при температуре 20-24°C в течение 10 суток. Препарат считали стерильным в случае отсутствия роста во всех питательных средах.

Для испытания на безвредность использовали общую пробу препаратов из флаконов. Из каждого флакона брали по 10 см³ иммуноглобулина и смешивали. Смесь вводили подкожно 5 белым мышам массой 16-18 г по 0,5 см³ и 3 морским свинкам массой 350-380 г по 10 см³. За животными вели наблюдение в течение 10 суток.

Препарат считали безвредным, если все животные в течение срока наблюдения оставались клинически здоровыми.

Кроме проверки стерильности и безвредности препарата, мы определяли в них концентрацию водородных ионов, массовую долю белка, содержание фракций бета-глобулинов и полиэтиленгликоля. Результат этих исследований, а также контроль иммуноглобулина обеих серий на стерильность и безвредность представлены в таблице №1.

Таблица 1 - Химические и биологические показатели иммуноглобулина опытных серий

Наименование показателей	Характеристика показателей	
	Серия №1	Серия №2
рН	7,0	7,2
Массовая доля белка, %	11,0±1,1	10,1±0,9
Массовая доля фракций бета+гамма-глобулинов, %	94,9	96,0
Массовая доля полиэтиленгликоля, %	3,0	2,9
Стерильность	Стерильная	Стерильная
Безвредность	Безвредная	Безвредная

Сопоставляя материал таблицы с литературными данными, мы пришли к заключению, что противосальмонеллезный иммуноглобулин опытных серий по своим показателям отвечает требованиям, предъявляемым к гипериммунным сывороткам и иммуноглобулинам, изготовленным из них.

Превентивную активность противосальмонеллезного иммуноглобулина определяли на голубях и белых мышах.

В предварительных опытах при испытании сыворотки на активность нами была найдена ИД₅₀ сальмонелл для голубей и белых мышей, а также определено количество 50%-ных летальных доз, необходимое, чтобы

вызвать гибель 90-100% этих видов лабораторных животных. Поэтому экспериментальная работа сводилась к подбору таких доз иммуноглобулина, при введении которых животным и последующем заражении их, была бы получена прямо пропорциональная зависимость между дозой введенного препарата и выживаемостью голубей, мышей, что является необходимым требованием при расчете ИД₅₀ по методу Кербера и модификации Ашмарина.

Иммунизацию взрослых голубей и мышей массой 18-20 г проводили препаратом начиная с дозы 0,1 см³ и последующим 2, 3, 4 и 5 - кратным шагом разведения при постоянном объеме вводимой дозы. При 5-кратном разведении иммуноглобулина дозы его для животных были подобраны так, что в опыте наблюдали прямую зависимость между дозой препарата и числом выживших голубей и мышей (см. табл. №2,3).

Из таблицы 2 видно, что между дозой иммуноглобулина и числом выживших голубей прослеживается прямая зависимость. Так, препарат в дозе 0,1 см³ защищает от гибели всех опытных голубей. С уменьшением дозы иммуноглобулина снижается число выживших голубей. Препарат в дозе 0,02 см³ предохраняет от гибели четырех, 0,004 см³ – трех, 0,0008 см³ – двух, а в дозе 0,00016 см³ – не более одного голубя.

В качестве контроля служили 5 не получивших иммуноглобулин голубей, которых заражали одновременно с пассивноиммунизированными. Как показывает материал таблицы, контрольные голуби погибают на 3-4-6 сутки после заражения. В эти же сроки начинается отход голубей, получивших 0,00016 см³ иммуноглобулина. В более поздние сроки был зарегистрирован отход голубей, получивших большие дозы препарата.

Таблица 2 - Определение ИД₅₀ иммуноглобулина для голубей

№ серии	Доза препарата (см ³)	Кол. голубей на дозу	Пало голубей по дням										Всего		ИД ₅₀ препарата (см ³)	
			3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	пало	выжило		
1	0,1	5												0	5	0,006
	0,02	5						1						1	4	
	0,004	5			1		1							2	3	
	0,0008	5		1	1		1							3	2	
	0,00016	5	2	1	1									4	1	
2	0,1	5						1	1					1	4	0,004
	0,02	5					1	1						2	3	
	0,004	5							2					2	3	
	0,0008	5		1	1		1							3	2	
	0,00016	5	2	1	1									4	1	
Контроль		5	1	2		2								5	0	

Примечание: заражение производили внутримышечно через 3 часа после введения иммуноглобулина *S. choleraesuis*

Превентивную активность иммуноглобулина в отношении *S. dublin*, *S. typhimurium*, *S. abortusovis* контролировали на белых мышах. Мышей иммунизировали препаратом начиная с дозы 0,1 см³ с 2,3,4 и 5-кратным шагом разведения. Только при 5-кратном разведении дозы оказались подобраны так, что после контрольного заражения мышей выживание их находилось в прямой зависимости от величины введенной дозы иммуноглобулина. Конечные результаты позволили рассчитать ИД₅₀ препарата для белых мышей.

В таблице 3 представлена методика контроля активности иммуноглобулина на примере одной серии.

Таблица 3 - Определение ИД₅₀ иммуноглобулина для белых мышей (серия №1)

Доза сыворотки (см ³)	Кол. мышей на	Заражение		Пало мышей по дням								Всего		ИД ₅₀ препарата (см ³)			
		Мик. тел. на мышку	Наименование возб	3	4	5	6	7	8	9	10	11	Пало		Выжило		
0,1 0,02 0,004 0,0008 0,00016	5	15	<i>S. dublin</i>											0	5	0,005	
	5										1		1	4			
	5										2			2	3		
	5								1		1		1	3	2		
	5					1		1		3				5	0		
Контроль		10	15											10	0		
0,1 0,02 0,004 0,0008 0,00016	5	10	<i>S. typhimurium</i>											0	5	0,006	
	5										1			1	4		
	5											1		1	2		3
	5								1	1	1	1		3	2		
	5					1	1	1	1					4	1		
Контроль		10	10											9	1		
0,1 0,02 0,004 0,0008 0,00016	5	19 тыс.	<i>S. abortusovis</i>												0	5	0,007
	5												1	1	4		
	5											2			2	3	
	5					1				1					2	3	
	5					1	1	1	2						4	1	
Контроль		10	19 тыс.											9	1		

Примечание: заражение производили внутрибрюшинно через 2 часа после введения иммуноглобулинов

Из таблицы 3 видно, что контроль активности иммуноглобулина в отношении одной серогруппы сальмонелл проводили на 25 мышах. В опытах использовали мышей массой 18-20 г. Иммуноглобулин вводили подкожно в дозах: 0,1; 0,02; 0,004; 0,0008; 0,00016 см³. Через 2-3 часа после введения препарата мышей заражали 3 ЛД₅₀ сальмонелл соответствующего серотипа. В качестве контроля служили 10 не получивших иммуноглобулин мышей, которых заражали одновременно с иммунизированными. Данная таблица свидетельствует, что контрольные животные погибли на 3-8 сутки; на 5-8 сутки отмечали гибель мышей, получивших 0,00016 см³ препарата. В более поздние сроки прослеживается отход мышей, получивших большие дозы иммуноглобулина. Спустя 5-7 суток после падежа не менее 8 контрольных животных вели окончательный учет результатов опыта.

Данные таблицы показывают, что между выживаемостью мышей и введенной им дозы иммуноглобулина имеется прямая зависимость. Действительно, препарат в дозе 0,1 см³ предохраняет от сальмонеллеза всех зараженных мышей, но по мере уменьшения дозы его соответственно снижается уровень защиты животных от болезни. Так, например, при испытании активности иммуноглобулина в отношении *S. typhimurium* из 5 мышей, получивших препарат в дозе 0,1 см³, ни одна мышка не пала. Иммуноглобулин в дозе 0,02 см³ предохраняет от гибели четырех мышей, в дозе 0,004 см³ - не более трех, в дозе 0,0008 см³ - двух, а в дозе 0,00016 см³ - не более одной особи. Такая же закономерность отмечается при проверке активности иммуноглобулина в отношении остальных сальмонелл.

Оценку активности иммуноглобулина и исходной сыворотки, взятой для его получения, определяли по величине ИД₅₀ в параллельных опытах на голубях и белых мышах. Результаты этих опытов представлены в таблице №4.

Таблица 4 - Активность иммуноглобулинов и сыворотки для голубей и мышей

Сальмонеллы	Вид животных	ИД ₅₀ (см ³)	
		иммуноглобулина	сыворотки
<i>S. choleraesuis</i>	голуби	0,006±0,001	0,021±0,002
<i>S. dublin</i>	мыши	0,007± 0,001	0,023± 0,001
<i>S. typhimurium</i>	мыши	0,007± 0,002	0,024± 0,002
<i>S. abortusovis</i>	мыши	0,010± 0,002	0,032± 0,001

Материал таблицы 4 свидетельствует, что иммуноглобулин по превентивной активности превосходит сыворотку из которой получен, примерно в три раза. Например, величина ИД₅₀ иммуноглобулина для голубей против *S. choleraesuis* составила 0,006±0,001 см³, а сыворотки - 0,021±0,002 см³.

То же самое можно отметить и в отношении других сероваров сальмонелл.

Заключение. Опытная работа по получению противосальмонеллезного иммуноглобулина позволила предложить технологическую схему производства названного препарата.

В ходе эксперимента были найдены оптимальные физико-химические условия фракционирования сыворотки, разработаны методы консервации, стерилизации и контроля качества специфического иммуноглобулина.

Литература. 1. Противобактериальные лечебно-профилактические сыворотки. /Медведев А.П./ Монография.- Витебск.-2007.- 294 с.

Статья поступила 24.02.2010 г.

УДК 619:615.373

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ ПАСТЕРЕЛЛ РАЗЛИЧНЫМИ СПОСОБАМИ И ИХ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

Медведев А.П., Кошнерова Л.А., Гвоздев С.Н.

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

В статье представлены результаты культивирования пастерелл различными способами и их биологические свойства. Установлено, что уже через 7 часов культивирования в среде с использованием шуттель-аппарата и добавлением в нее (бульон Хоттингера) глюкозы можно получить наибольшее количество жизнеспособных пастерелл с высокой степенью вирулентности. Данную культуру на основании полученных результатов мы предлагаем использовать для приготовления пастереллезного антигена.

The article deals with the result of the cultivation of pasteurelles the different methods and their biological properties. It was established that already in seven hours cultivation in environ with used shuttell-apparatus and addition of glucose in her (broth of Hettinger) may receive most quality viable of pasteurelles with most of virulence. Present culture we propose to use for preparation to antigen of pasterellosis on the basis of receipted results.

Введение. Пастереллез – контагиозная инфекционная болезнь домашних и диких животных, характеризующаяся при остром течении признаками септицемии, крупозным воспалением легких, плевритом, а при хроническом течении – крупозной, гнойно-некротической, фибринозной пневмонией, плевритом, отеками, реже – менингоэнцефалитом, артритом, маститом, керато-конъюнктивитом, эндокардитом, эндометритом и абортами, иногда энтеритом [5,6].

Из шестнадцати видов пастерелл, относящихся к семейству Pasteurellaceae, роду Pasteurella, только два вида (*P. multocida* и *P. haemolytica*) вызывают инфекционную патологию у сельскохозяйственных и диких животных, отдельно или в ассоциации. Причиной возникновения пастереллеза среди поголовья крупного рогатого скота является *P. multocida* и в редких случаях *P. haemolytica*. При пастереллезе свиней ведущая