

УДК619:616.98: 579.842.14:615.371:636.2.053

ИЗГОТОВЛЕНИЕ И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ОПЫТНОЙ СЕРИИ ВАКЦИНЫ ПОЛИВАЛЕНТНОЙ ФОРМОЛКВАСЦОВОЙ ПРОТИВ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА ТЕЛЯТ

Лагун Н.В., Медведев А.П.

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

Изготовлена опытная серия вакцины против сальмонеллеза телят, проведен контроль ее качества. В результате проведенных исследований было установлено, что приготовленная вакцина является стерильным, безвредным и иммуногенным биопрепаратом.

It was made the pilot batch of a vaccine against a salmonellosis of calfs, the control of its quality is carried out. As a result of the spent researches it has been established, that the prepared vaccine is sterile, harmless and a high-immunogene biological product.

Введение. В результате интенсификации промышленного животноводства, обуславливающей высокую концентрацию поголовья на ограниченной площади появились благоприятные условия для пассажа многих видов микробов через организм животных, усиления их вирулентности, что приводит к возникновению и развитию различных инфекционных болезней. К тому же, появлению и их распространению способствуют нарушения производственными ветеринарно-санитарных правил содержания и кормления животных.

Известно, что чаще всего в хозяйствах республики регистрируют болезни, вызываемые условно-патогенными бактериями к которым относят эшерихий и сальмонелл. Эти микроорганизмы поражают сельскохозяйственных, домашних, промысловых и диких животных многих видов. Согласно официальной ветеринарной отчетности среди инфекционных болезней животных первое место по широте распространения занимает эшерихиоз, второе – сальмонеллез, который диагностируют не только в нашей стране, но и во многих странах мира [1,7,3].

Болезнь наносит значительный экономический ущерб животноводству и имеет тенденцию к все более широкому распространению с охватом большого количества животных разных видов. Сальмонеллезом болеет и человек. Поэтому сальмонеллезная инфекция является не только сугубо ветеринарной, но и медицинской проблемой, требующей решения ее путем проведения определенных исследований, направленных на разработку эффективных средств борьбы с болезнью.

Общепризнано, что самыми эффективными средствами борьбы с инфекционными болезнями являются специфические биопрепараты, в частности, вакцины.

В настоящее время для активной профилактики сальмонеллеза телят применяют ассоциированную инактивированную вакцину против острых кишечных инфекций (колибактериоза, сальмонеллеза, клебсиеллеза и протеейной инфекции), вакцину из аттенуированного штамма *S. dublin* и *S. typhimurium*, ассоциированную вакцину против сальмонеллеза и пастереллеза телят, концентрированную формолквасцовую вакцину против сальмонеллеза телят из штаммов *S. dublin* и *S. typhimurium* [6]. Однако, данные биопрепараты не обеспечивают надежной защиты животных по разным причинам и, в первую очередь, по причине несоответствия антигенного состава вакцин этиологической структуре болезни, т.е. тем штаммам сальмонелл, которые циркулируют среди животных в среде их обитания и при определенных условиях вызывают клиническое проявление инфекционной патологии.

В связи с выше отмеченным, разработка высокоактивного препарата имеет большое практическое значение, т.к. применение его для вакцинации телят против сальмонеллеза значительно повысит эффективность вакцинопрофилактики и сохранность животных.

Целью настоящей работы явилось изготовление опытной серии вакцины против сальмонеллеза телят, соответствующей этиологической структуре болезни и проведение контроля качества препарата.

Материалы и методы исследований. Изготовление опытной серии вакцины против сальмонеллеза телят осуществляли в вакцинном и подготовительном цехах УП «Витебская биофабрика», а определение физико-химических и биологических свойств препарата проводили в отделе контроля качества биопредприятия. Для производства вакцины использовали три производственных штамма: *S. enteritidis* КМИЭВ – В 116, *S. dublin* 373, *S. typhimurium* 371. Прежде, чем нарастить бактериальную массу названных штаммов, нами были проверены биологические свойства их на соответствие паспортным данным. В опытной работе необходимы были питательные среды: МПБ, МППБ, МПА, МППЖА, Сабуро, которые мы готовили по общепринятым в микробиологии методикам.

Штаммы сальмонелл высевали на обычные питательные среды и выращивали в термостате при 37 °С в течение 20 часов. Характер роста бактерий изучали путем визуального просмотра выращенных культур. При этом отмечали степень помутнения МППЖА, МППБ, МПБ, образования на поверхности сред пленки или пристеночного кольца, а на дне пробирок осадка. На поверхности МПА определяли величину образовавшихся колоний, их цвет, изрезанность краев, морщинистость поверхности. Из выросших культур готовили препараты - мазки высушивали, фиксировали, окрашивали по Граму и микроскопировали. При этом учитывали форму бактерий, их цвет и взаиморасположение.

Для определения сахаралитической способности сальмонелл культуры их засеивали на дифференциально - диагностические среды Гисса с индикатором Андредде.

Антигенную структуру бактерий изучали с помощью набора сывороток сальмонеллезных О - комплексных и монорецепторных О- и Н- агглютинирующих для экспресс – идентификации сальмонелл по реакции агглютинации (РА). ЛД₅₀ сальмонелл для белых мышей определяли по методу Кербера в модификации Ашмарина [5].

Культивирование бактерий для накопления биомассы их проводили на МПА в матрицах в течение двух суток при температуре 37 °С. На каждый производственный штамм использовали 15 матриц с плотной питательной средой на поверхности которой делали посеvy бульонной культуры сальмонелл. Выращенные агаровые культуры смывали физиологическим раствором и разводили им же до концентрации 4 млрд. м.к./см³. Культуры инактивировали формалином, содержащим не менее 36 % формальдегида. Формалин добавляли к разведенным культурам из расчета 0,3 % к их объему. Инактивацию производили при температуре 37 °С в течение 17 суток. В процессе инактивации культуры перемешивали не менее 2-х раз в сутки. Полноту инактивации культур проверяли путем высева их на обычные среды. Отсутствие роста бактерий свидетельствовало о полной инактивации их.

Инактивированные культуры смешивали в соотношении 1:1, добавляли адъювант, расфасовывали во флаконы и подвергали исследованию на соответствие показателям качества, заложенным в технических условиях.

pH биопрепарата определяли потенциометрически в соответствии с инструкцией, приложенной к прибору.

Путем визуального просмотра флаконов определяли цвет вакцины, наличие осадка, посторонних механических примесей.

Для испытания на стерильность использовали 5 флаконов вакцины. Из каждого флакона высевали по 2 см³ препарата в стогранные флаконы с МПБ, МППБ, в пробирки со средой Сабуро и МППЖА. Флаконы с МПБ и МППБ выдерживали в термостате при температуре 37 °С, а пробирки со средой Сабуро при 22 °С. Через двое суток из флаконов с посевами вакцины делали пересевы на МПБ и МППБ. Первичные посеvy выдерживали в термостате в течение 10 суток, вторичные - 8 суток.

Безвредность вакцины определяли на белых мышах массой 16-18 грамм. Вакцину вводили животным в дозе 0,5 см³ подкожно в области спины. За мышками вели наблюдение в течение 10 суток.

Активность препарата определяли на морских свинках массой 350 -400 г, которым вводили его подкожно в области брюшка в дозе 0,5 см³. На каждый штамм сальмонелл, входящий в состав вакцины использовали пять морских свинок, иммунизированных препаратом и, такое же количество животных аналогичной массы служили контролем, т. е. были не вакцинированными. Через 16 суток после иммунизации всех морских свинок опытных групп и контрольных заражали 3 ЛД₅₀ вирулентных штаммов сальмонелл. За животными вели наблюдение в течение 10 суток, отмечая павших и выживших. Схему проведения опыта по определению активности вакцины и его результаты демонстрирует таблица 1.

Результаты исследований. Нами была определена антигенная структура производственного штамма *S. typhimurium* 371 и установлено, что бактерии содержат соматические O₁, O₄, O₅, O₁₂ и жгутиковые антигены I фазы «i» и II фазы 1 и 5, по серогрупповой принадлежности штамм отнесен к серогруппе В. В поле зрения микроскопа бактерии штамма представляют собой грамотрицательные палочки, располагающиеся одиночно, попарно, небольшими скоплениями. На МПА бактерии формировали колонии S-типа в диаметре до 4 мм, в МПБ и МППБ через 10 - 12 часов вызывали равномерное помутнение среды с образованием через 18 - 20 часов незначительного осадка на дне пробирки, а в МППЖА – диффузное помутнение всей массы полужидкого агара, которое было хорошо выражено при выдерживании пробирок в термостате в течение суток. Сальмонеллы ферментировали с образованием кислоты и газа глюкозу, маннит, ксилозу, сорбит, мальтозу, не расщепляли лактозу и сахарозу, оказались патогенными для белых мышей. ЛД₅₀ бактерий для мышей составила 100 микробных клеток.

Производственный штамм *S. dublin* 373 по результатам исследования антигенной структуры сальмонелл отнесен нами к серогруппе Д, т. к. бактерии этого штамма содержали соматические O₁, O₉, O₁₂ и жгутиковые «g» и «Р» антигены. При микроскопии бактерии предстали грамотрицательными палочками с закругленными концами, располагающиеся скоплениями неопределенной формы. Сальмонеллы хорошо росли в МПБ и МППБ, вызывая помутнение сред уже через 10 - 12 часов. На дне пробирок через 18 - 20 часов образовывался осадок, который при встряхивании пробирок разбивался на мелкие глыбки и зернышки. На МПА бактерии формировали округлые колонии серо-белого цвета с ровными краями, выпуклой поверхностью, величиной от 2 до 4 мм в диаметре. При росте в МППЖА вызывали помутнение всей массы среды. Сальмонеллы расщепляли с образованием кислоты и газа глюкозу, ксилозу, сорбит, арабинозу, дульцит. ЛД₅₀ *S. dublin* 373 для белых мышей составила при подкожном заражении их 50 микробных клеток.

Производственный штамм *S. enteritidis* КМИЭВ – 116 выделен из органов павшего теленка 2-х месячного возраста и задепонирован в РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского. Бактерии штамма представляют собой грамотрицательные палочки, которые хорошо растут в МПБ, МППБ, вызывая интенсивное помутнение сред через 10 - 12 часов после их засева с образованием обильного серо - белого осадка. На поверхности МПА через 24 часа микробы формировали серо-белые колонии S- типа около 4 – 5 мм в диаметре. При росте в МППЖА вызывали его помутнение через 24 часа после засева в среду. Сальмонеллы исследуемого штамма ферментировали с образованием кислоты и газа глюкозу, лактозу, маннит, сорбит, арабинозу, мальтозу, ксилозу, маннозу, дульцит, продуцировали индол, не выделяли сероводород, не разжижали желатину, не утилизировали цитраты, давали отрицательную реакцию Фогеса - Проскауера.

ЛД₅₀ бактерий штамма *S. enteritidis* КМИЭВ – 116 составила для белых мышей массой 16 - 18 г. при внутрибрюшинном заражении их 53470 микробных клеток.

Проведенная опытная работа по определению морфологических, тинкториальных, культуральных, антигенных и биологических свойств производственных штаммов сальмонелл свидетельствует о их соответствии конкретному сероварианту, высокой агглютинабельности и вирулентности, что является основанием для изготовления из этих штаммов вакцины против сальмонеллеза телят.

Приготовление вакцины проводили по следующей схеме:

- выращивали сальмонеллы на поверхности МПА в матрицах;
- выращенные культуры смывали с агара стерильным физиологическим раствором;
- устанавливали концентрацию смывой бакмассы 4 млрд. м.к./см³ путем разведения ее физиологическим раствором;

- инактивировали биомассу бактерий формалином, выдерживая ее при 37°C 17 суток;
- определяли полноту инаktivации сальмонелл путем посева на питательные среды;
- смешивали инактивированную биомассу каждого штамма в соотношении 1:1;
- добавляли адьювант – алюмокалиевые квасцы в виде 10% раствора, простерилизованного в течение часа при температуре 120 °С до 0,1 %;
- расфасовывали вакцину во флаконы по 100 см³;
- проводили контроль качества препарата.

При визуальном просмотре флаконов с вакциной в проходящем свете механических примесей в препарате не обнаружено. Вакцина представляет собой жидкость слабощелочной реакции (рН=7,2), с незначительным осадком, который легко разбивается при встряхивании флаконов в равномерную взвесь.

В питательных средах с посевами вакцины и выдерживанием их в термостате при 37 °С в течение 10 суток видимого роста микроорганизмов не обнаружено, что свидетельствует о стерильности препарата.

Вакцина, введенная подкожно белым мышам массой 16 - 18 г. в дозе 0,5 см³ не вызывала клинически заметного изменения состояния их здоровья, т.е. препарат был безвредным.

Таблица 1 - **Определение активности вакцины опытной серии для морских свинок**

Опытные группы	Свинок в группе	Доза вакцины (см ³)	Метод введения	Результат заражения	
				Пало	Выжило
1	5	0,5	п/к	–	5
2	5	0,5	п/к	–	5
3	5	0,5	п/к	–	5
Контрольная	5	–	–	5	–

Из таблицы видно, что в остром опыте в результате контрольного заражения все вакцинированные морские свинки выжили, а контрольные, не получившие вакцины, пали. Следовательно, вакцина является активным препаратом, т. к. защищает морских свинок от развития ярко выраженного инфекционного процесса и гибели.

Заключение. На основании результатов проведенной работы можно заключить, что приготовленная нами вакцина поливалентная формолквасцовая против сальмонеллеза телят опытной серии является стерильным, безвредным и активным препаратом.

Литература. 1. Андросик, Н.Н. Специфическая профилактика сальмонеллеза сельскохозяйственных животных / Н.Н. Андросик // Зооантропонозные болезни, меры профилактики и борьбы : материалы международной научно-практической конференции. – Минск, 1997. – С. 102-104. 2. Инфекционные болезни животных: учебное пособие для студентов вузов, обучающихся по специальности "Ветеринария" / В.А. Кузьмин [и др.] ; ред. А.А. Кудряшов, А.В. Святковский. – Санкт-Петербург ; Москва ; Краснодар : Лань, 2007. – 607 с. : цв.ил. – Гл. 5. – С. 411. 3. Калишин, Н.М. Распространение сальмонеллеза на территории Санкт-Петербурга / Н.М. Калишин, С.Н. Омаров // Международный вестник ветеринарии. – 2004. – № 1. – С. 17–21. 4. Медведев, А.П. Основные принципы контроля качества вакцин / А. П. Медведев, А.А. Вербицкий // Ученые записки учреждения образования «Витебская государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал. – Витебск : УО ВГАВМ, 2005. – Т. 41, вып. 1. – С. 30–31. 5. Пархоменко, Н.А. О методах определения вирулентности и иммунизирующей дозы микроорганизмов / Н.А. Пархоменко, Л.Н. Выговская // Биолого-экологические проблемы заразных болезней диких животных и их роль в патологии сельскохозяйственных животных и людей. – Покров, 2002. – С. 259–260. 6. Профилактика и лечение сальмонеллеза телят / С.В. Васенко [и др.] // Проблемы инфекционных и инвазионных болезней в животноводстве на современном этапе. – М., 1999. – С. 161–162. 7. Специфическая профилактика сальмонеллеза сельскохозяйственных животных / Б. Ю. Шустер [и др.] // Ветеринария. – 1994. – № 2. – С. 11–14.

Статья поступила 14.09.2010г.

УДК 611.441

ФИЛОГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ЭНДОКРИННОЙ СИСТЕМЫ: ЩИТОВИДНАЯ ЖЕЛЕЗА И ЕЕ БИОИНДИКАЦИОННЫЕ СВОЙСТВА В МОРФОЭВОЛЮЦИИ

Луппова И.М., Федотов Д.Н., Юдасина С.В.

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

В работе отражены вопросы филогенетического становления эндокринных функций и биоиндикационных свойств щитовидной железы, ее формообразований и процессов морфологической трансформации от беспозвоночных к позвоночным животным. Нами выявлено, что в процессе филогенеза Vertebrata осуществлялась концентрация эндокринных клеток в специализированные эндокринные органы.

In job the questions phylogenies state endocrine of functions and bioindicator properties thyroid gland, her processes of morphological transformation from Arthropoda to Vertebrata by an animal are reflected.

Введение. Огромная проблема эндокринной регуляции жизнедеятельности органов и тканей ставит перед учеными разных профилей свои задачи. Исследования морфологов с их методами анализа позволяют принять участие в раскрытии её актуальных аспектов. Первоочередными из них являются задачи выявления основ морфологии эндокринных желез и особенностей их онто- и филогенеза.

В процессе эволюции возникли анатомические и функциональные связи между отдельными клетками, что привело к образованию многоклеточных организмов. С увеличением их размеров и сложности становилось