

УДК 619:616.98:579.842.14-085.37

РАЗРАБОТКА СПОСОБОВ КОНТРОЛЯ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ ПРОТИВ САЛЬМОНЕЛЛЁЗА ЖИВОТНЫХ НА БЕЛЫХ МЫШАХ**Медведев А.П., Алешкевич В.Н., Даровских С.В.**

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

В статье представлены данные по разработке способа контроля активности сыворотки против сальмонеллёза животных на белых мышах.

The article features the data on developing methods for the serum against salmonellosis activity control on white mice.

Ключевые слова: сальмонеллы, морские свинки, голуби, белые мыши, сыворотка, доза, активность, контроль, препарат.

Keywords: salmonellae, guineapigs, pigeons, white mouse, serum, dose, activity, control, substance.

Введение. Сальмонеллёз – полиэтиологическая инфекционная болезнь с фекально-оральным механизмом передачи, вызываемая бактериями рода *Salmonella*, характеризующаяся разнообразными клиническими проявлениями – повышением температуры тела, энтеритом, бронхопневмонией, артритом, коликами, параличами, абортами.

Сальмонеллёзом болеет преимущественно молодняк сельскохозяйственных животных. Болеет сальмонеллёзом и человек, у которого болезнь проявляется в виде пищевых токсикоинфекций.

Сальмонеллёз широко распространен во всех странах и представляет собой сложную ветеринарную и медицинскую проблему. Несмотря на постоянное совершенствование ветеринарно-санитарных мероприятий и технологии ведения животноводства, применение разнообразных лечебных препаратов, эта болезнь по-прежнему наносит большой экономический ущерб.

В связи с быстрой адаптацией сальмонелл к антибиотикам и другим антисептическим средствам, все более широкое применение получает гипериммунная сыворотка против сальмонеллёза животных. Эффективность применения этой сыворотки зависит от ее стерильности, безвредности и активности препарата.

Активность сыворотки в отношении *S. dublin*, *S. typhimurium*, *S. abortusovis* контролируют на морских свинках, а в отношении *S. choleraesuis* – на голубях.

Морским свинкам сыворотку вводят подкожно в дозах: 0,25, 0,5 и 1,0 см³. На каждую дозу используют двух животных. Голубям сыворотку вводят внутримышечно в дозах 0,5 и 1,0 см³, используя трех голубей на дозу. Через 24 часа животных, иммунизированных сывороткой, заражают смертельной дозой сальмонелл соответствующего серовара. Одновременно заражают контрольных морских свинок и голубей (не получивших сыворотку) по трое животных к каждому серовару сальмонелл. Сыворотку признают активной, если из шести иммунизированных животных выживает не менее четырех при гибели не менее двух контрольных.

Однако И.П. Ашмарин и А.А. Воробьев (1962)

считают, что при использовании для оценки активности биопрепаратов трех-шести животных нельзя с достоверностью отличить иммуногенную серию препарата от неиммуногенной, даже в том случае, когда все иммунизированные животные выжили, при 100%-ной гибели контрольных. Вероятность достоверности контроля препарата даже в этом случае не превышает 50-70%.

Цель работы: оценить достоверность применяемого способа контроля активности сыворотки и разработать метод контроля иммуногенности препарата на белых мышах.

Материалы и методы исследований. В опытах были использованы: 1500 белых мышей, штаммы сальмонелл - *S. choleraesuis* 370, *S. typhimurium* 371, *S. dublin* 373, *S. abortusovis* 372, питательные среды: мясопептонный бульон (МПБ), мясопептонный агар (МПА), мясопептонный печеночный бульон с кусочками печени под вазелиновым маслом (среда Китта-Тароцци), среда Сабуро, гипериммунные сыворотки против сальмонеллёза животных, сальмонеллёзные монорецепторные О- и Н-агглютинирующие адсорбированные сыворотки для идентификации сальмонелл, краски, предметные стекла, микроскопы (МБИ-1, МБИ-6).

Сальмонелл выращивали в МПБ, на МПА и чистоту культур определяли микроскопией препаратов, окрашенных по Граму.

Антигенную структуру сальмонелл устанавливали согласно методическим указаниям по применению сальмонеллёзных монорецепторных О- и Н-агглютинирующих адсорбированных сывороток для идентификации сальмонелл в РА.

Вирулентность сальмонелл для белых мышей определяли по величине 50%-ной летальной дозы (ЛД₅₀). Для этого культуры бактерий выращивали на скошенном МПА при температуре 37–38°C в течение 18–20 часов, смывали стерильным физраствором, устанавливали концентрацию для *S. abortusovis* (1000, 100, 10, 0,1 млн. м.к. в см³), *S. choleraesuis*, *S. dublin*, *S. typhimurium* (10000, 1000, 100 и 10 м.к. в 1 см³). Культуры из каждого разведения вводили внутрибрюшинно по 0,5 см³ белым мышам массой 18-20 г.

Стерильность сыворотки проверяли путем

высева ее в МПБ, МППБ, среду Сабуро и выдерживания сред в термостате при 37–38°C в течение 10 суток. Сыворотку считали стерильной в случае отсутствия роста на всех питательных средах.

Безвредность сыворотки проверяли на пяти белых мышах массой 16–18 г и трех морских свинок массой 350–400 г, которым препарат вводили подкожно в дозах по 0,5 и 1,0 см³, соответственно.

Превентивную активность сыворотки определяли для белых мышей массой 18–20 г. Сыворотку мышам вводили подкожно, начиная с дозы 0,5 см³ с 3, 4, 5-кратным шагом разведения. На каждую дозу использовали 5–10 животных. Заражали мышей внутрибрюшинно через 2–3 часа после иммунизации 3-5 ЛД₅₀ сальмонелл определенного

серотипа. Контролем служили животные, не получившие сыворотку. Контрольных мышей (5–10) заражали одновременно с пассивно иммунизированными. Окончательный учет результатов испытания активности сыворотки проводили через 7 дней после падежа контрольных животных. Допускали выживание в контроле не более двух мышей.

Результаты исследований. Опытная работа была начата с определения активности 10 производственных серий сыворотки с помощью применяемого метода контроля с целью последующего анализа полученных данных и объективной оценки достоверности этого метода.

Результаты контроля активности этих серий представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Активность сыворотки против сальмонеллёза животных для голубей и морских свинок

№ серии	Устойчивость к сальмонеллам							
	<i>S. choleraesuis</i>		<i>S. dublin</i>		<i>S. typhimurium</i>		<i>S. abortusovis</i>	
	голубей		морских свинок					
	П	В	П	В	П	В	П	В
197	2	4	0	6	0	6	0	6
	2	1	2	1	2	1	3	0
198	1	5	0	6	0	6	1	5
	2	1	2	1	2	1	2	1
199	2	4	0	6	0	6	2	4
	3	0	3	0	3	0	2	1
200	1	5	0	6	0	6	1	5
	2	1	2	1	3	0	2	1
201	2	4	2	4	1	5	2	4
	3	0	2	1	2	1	2	1
202	0	6	1	5	2	4	0	6
	3	0	2	1	2	1	2	1
203	1	5	1	5	2	4	2	4
	2	1	3	0	3	0	2	1
204	2	4	2	4	1	5	2	4
	2	1	2	1	2	1	3	0
205	2	4	2	4	2	4	0	6
	3	0	2	1	3	0	2	1
206	0	6	1	5	1	5	2	4
	3	0	3	0	2	1	3	0

Примечания: П – пало, В – выжило, первая строчка напротив номера каждой серии – количество павших и выживших животных, получивших сыворотку; вторая строчка – количество павших и выживших животных в контроле.

Данные таблицы 1 позволяют отметить следующее. При сравнении результатов контроля сыворотки проверенных серий нельзя различить по активности препарат этих серий, так как разница павших и выживших голубей и морских свинок, как контрольных, так и получивших сыворотку, не превышает одного-двух животных. При выживании одного из трех контрольных животных логично предположить, что выживут все голуби и морские свинки, получившие сыворотку. Однако данные таблицы 1 этого не подтверждают. И наоборот, при гибели всех контрольных животных должно было выжить минимальное количество голубей и морских свинок, получивших сыворотку, но, как свидетельствует опытный материал, препарат некоторых серий предохраняет от гибели всех шесть иммунизированных животных при падеже всех контрольных.

Следовательно, применяемый метод контроля активности сыворотки не позволяет объек-

тивно судить об уровне защиты лабораторных животных от сальмонелл. Связано это с тем, что при проверке активности препарата испытывают не более трех доз сыворотки и на каждую дозу используют только два-три животных. При этом необходимо отметить, что голуби и морские свинки весьма устойчивы к сальмонеллам. Так, минимальная смертельная доза сальмонелл для голубей составляет 1,5–2 млрд. м.к., морских свинок – 4–4,5 млрд. м.к.

Кроме этого, при подборе голубей и морских свинок для контроля активности сыворотки не учитывают некоторую естественно приобретенную устойчивость к возбудителям сальмонеллёза, что также снижает результативность применяемого метода контроля.

Объективность регламентированного метода контроля активности препарата в значительной степени зависит от защитных свойств нормальной

сыворотки крови продуцентов (волов). Поэтому мы исследовали влияние нормальной сыворотки на устойчивость голубей и морских свинок к сальмонеллам. Нормальную сыворотку крови получали от неподвергавшихся гипериммунизации волов в реакции агглютинации (РА) на наличие в ней противосальмонеллезных агглютининов. Для опытов использовали только сыворотку, давшую в РА отрицательный результат.

Таблица 2 – Влияние нормальной сыворотки крови волов на устойчивость голубей и морских свинок к сальмонеллам

Доза сыворотки (см ³)	Количество животных на дозу	Количество павших и выживших							
		голубей		морских свинок					
		<i>S. choleraesuis</i>		<i>S. dublin</i>		<i>S. typhimurium</i>		<i>S. abortusovis</i>	
		П	В	П	В	П	В	П	В
0,5	10	10	0	9	1	10	0	9	1
1,0	10	6	4	7	3	7	3	6	4
контроль	10	9	1	9	1	10	0	8	2

Примечания: П – пало, В – выжило.

Данные, представленные в таблице 2, позволяют заключить, что нормальная сыворотка в дозе 0,5 см³ не обладает защитными свойствами, а в дозе 1,0 см³ предохраняет от гибели 3–4 животных из 10 взятых в опыт. Эти данные дают основание утверждать, что защитные свойства нормальной сыворотки крови волов также снижают объективность применяемого метода определения активности препарата.

Данные опытов свидетельствуют о том, что действующий метод контроля активности сыворотки не позволяет достоверно оценивать истинную иммуногенность препарата и только лишь до некоторой степени дает ориентировочное представление о его качестве. Но учитывая, что голубей и морских свинок используют для контроля активности противосальмонеллезных препаратов в биологической промышленности, мы разработали способ определения активности сыворотки по величине 50%-ной иммунизирующей ее дозы для животных, который позволяет выражать активность препарата в цифровых значениях и оценивать ее более достоверно. Однако способ имеет существенные недостатки. Для определения активности сыворотки требуется большое количество лабораторных животных. Кроме этого, для получения высокодостоверных результатов опыт необходимо проводить в трех повторениях. Поэтому внедрить этот способ в практику контроля сыворотки на биопредприятиях не представилось возможным, но при решении спорных вопросов, касающихся активности препаратов, и в научно-исследовательских целях этот способ может быть использован.

Известно, что из лабораторных животных наиболее чувствительны к сальмонеллам белые мыши. К тому же их содержание и воспроизводство менее трудоемко и затратно, чем других видов лабораторных животных. Белые мыши не являются остродефицитными для лабораторий и биопредприятий. Поэтому нами был предложен способ контроля активности сыворотки против сальмонеллеза животных по величине 50%-ной иммунизирующей дозы для белых мышей. Было показано, что метод достоверен и эффективен. Однако значительными

Нормальную сыворотку вводили голубям и морским свинкам в дозах 0,5 и 1,0 см³, используя на дозу 10 животных, с последующим заражением их смертельной дозой сальмонелл (2–3 ЛД₅₀) определенной серовара.

В качестве контроля служили 10 голубей и морских свинок, не получавших сыворотку. Результаты опыта представлены в таблице 2.

недостатками, препятствующими внедрению метода в практику контроля активности сыворотки, являются трудоемкость опытов и использование в них большого количества мышей.

Нами было принято решение разработать более простой и в то же время надежный способ контроля, который позволил бы выявлять препарат неактивных серий.

Известно, что достоверность результатов контроля не ниже 95% имеет место, когда иммуногенность проверяется не менее чем на 10 животных при условии, что 8 из 10 иммунизированных особей остаются живыми, а 8 из 10 контрольных гибнут. С учетом этого обстоятельства мы вели разработку метода контроля активности сыворотки, приемлемого для внедрения в практику сывороточного производства.

Опытным путем нами подобрана доза сыворотки, которая обеспечивала выживание не менее 8 из 10 иммунизированных мышей при гибели не менее 8 из 10 контрольных. Такой результат был получен при иммунизации мышей сывороткой в дозе 0,004 см³. Затем мы исследовали иммуногенность сыворотки 12 производственных серий для белых мышей. Результаты опыта приведены в таблице 3.

Из таблицы 3 видно, что сыворотка 12 производственных серий (за исключением серии №214), обладает достаточно выраженной превентивной активностью.

Препарат в дозе 0,004 см³ защищает от гибели 80–90% иммунизированных животных при падеже 90–100% мышей в контроле. Сыворотка серии № 214 предотвращает гибель только 4–6 особей из 10 мышей.

При трехкратном исследовании активности сыворотки всех серий получены примерно одинаковые результаты, т.е. выживаемость белых мышей колеблется в пределах 80–90%, а для серии № 214 – 40–60%. При этом необходимо заметить, что препарат серии № 214 при исследовании применяемым методом был признан активным. Для того чтобы убедиться в достоверности разработанного метода, мы в остром опыте проконтро-

лировали активность сыворотки для белых мышей серий №№ 214, 216 и 3 фальсифицированных в отношении активности проб препарата серии № 217. Фальсифицировали сыворотку стерильным физиологическим раствором, который добавляли

для ее разведения в количестве 20% (проба 1), 30% (проба 2) и 50% (проба 3) к объему препарата.

Полученные результаты острого опыта отражает материал таблицы 4..

Таблица 3 – Иммуногенность сыворотки производственных серий для белых мышей

№ серии	Доза сыворотки (см ³)	Количество мышей на дозу	Падеж и выживаемость мышей					
			<i>S. dublin</i>		<i>S. typhimurium</i>		<i>S. abortusovis</i>	
			П	В	П	В	П	В
209	0,004	10	2	8	1	9	2	8
210	0,004	10	2	8	1	9	1	9
211	0,004	10	2	8	2	8	2	8
212	0,004	10	3	7	2	8	1	9
213	0,004	10	1	9	3	7	2	8
214	0,004	10	6	4	4	6	5	5
215	0,004	10	2	8	2	8	1	9
216	0,004	10	2	8	1	9	2	8
217	0,004	10	1	9	1	9	1	9
220	0,004	10	1	9	2	8	1	9
223	0,004	10	2	8	1	9	2	8
228	0,004	10	0	10	1	9	2	8
Контроль			10	0	10	0	9	1

Примечания: П – пало, В – выжило.

Таблица 4 – Контроль активности сыворотки на белых мышцах

№ серий и проб сыворотки	Доза сыворотки (см ³)	Количество мышей на дозу	Падеж и выживаемость мышей в отношении					
			<i>S. dublin</i>		<i>S. typhimurium</i>		<i>S. abortusovis</i>	
			П	В	П	В	П	В
214	0,004	10	5	5	4	6	4	6
216	0,004	10	2	8	1	9	2	8
1	0,004	10	4	6	4	6	5	5
2	0,004	10	5	5	6	4	5	5
3	0,004	10	7	3	6	4	7	3
Контроль			10	0	9	1	8	2

Из данных таблицы 4 видно, что сыворотка серии № 216 защищает от падежа 80–90% мышей, препарат серии № 214 и фальсифицированная сыворотка проб 1, 2– 40–60% животных, а пробы 3 – 30–40% особей.

Таким образом, метод контроля активности сыворотки на белых мышцах с использованием одной дозы (0,004 см³), которая является своеобразной тест-пробой, позволяет достаточно эффективно выявлять сыворотку неактивных производственных серий. Этот метод мы рекомендуем для проведения контроля активности сыворотки на биопредприятиях и использования его в научно-исследовательской работе по совершенствованию технологии получения сывороточных противосальмонеллезных препаратов и повышению уровня их превентивной активности.

Заключение. Метод контроля активности сыворотки против сальмонелллёза животных, применяемый на биопредприятиях, позволяет лишь приближенно определить, соответствует или нет препарат установленным минимальным требованиям в отношении иммуногенности.

Поэтому нами разработан простой и достаточно надежный способ контроля превентивной

активности гипериммунной сыворотки против сальмонелллёза животных, позволяющий выявить препарат неактивных серий. Тридцати белым мышам массой 18–20 г вводят подкожно сыворотку проверяемой серии по 0,004 см³. Спустя 2–3 часа 10 мышей заражают смертельной дозой *S. dublin*, 10 - *S. typhimurium* и 10 особей - *S. abortusovis*. Одновременно заражают мышей, не получивших сыворотку (контроль), используя на каждый серovar сальмонелл не менее 10 белых мышей. Сыворотку считают активной в отношении каждого серовара сальмонелл в случае выживания не менее 8 из 10 иммунизированных мышей при гибели 8–10 контрольных животных.

Литература. 1. Ашмарин, И. А. Статистические методы в микробиологии / И. А. Ашмарин, А. А. Воробьев. – Ленинград : Медгиз, 1962. – 180 с. 2. Медведев, А. П. Производство и контроль гипериммунных сывороток и иммуноглобулина против сальмонелллёза животных : автореф. дис. ... д-ра вет. наук : 16.00.03 / А. П. Медведев. – Москва, 1998. – 31 с.

Статья передана в печать 13.04.2016 г.