

аэрозольном состоянии / П.Н. Рубченко // *Ветеринария*. – 1986. - № 1. – С. 38. 9. Способ получения препарата для иммунокоррекции из сальмонеллезных бактерий : пат. 11671 Респ. Беларусь, МПК<sup>6</sup> А 61К 35/66 / Зайцева А.В., Дремач Г.Э., Вербицкий А.А., Зайцева В.В.; заявитель УО ВГАВМ - № а 20070348 ; заявл. 04.04.07 ; опубл. 28.02.09 // *Афіцыйны бюл. / Нац. Цэнтр інтэлектуал. Уласнасці*. – 2009. - № 1. – С. 56. 10. Ураков, Н.Н. Функциональное состояние микроорганизмов в процессе приготовления бактериальных препаратов / Н.Н. Ураков, В.Я. Волков, Р.Б. Боровик // *Биотехнология*. – 1988. – Т. 4, № 4. – С. 420-432. 11. Ярцев, М.Я. Разработка технологии производства живых сухих вакцин против пастереллеза птиц, рожи свиней и бруцеллеза животных (экспериментальные исследования и внедрения) / М.Я. Ярцев. – Дисс. ... докт. биол. наук. – М., 1990. – С. 316.

Статья передана в печать 05.09.2012 г.

УДК 619:616.594

## ОПТИМИЗАЦИЯ ВЫРАЩИВАНИЯ ДЕРМАТОФИТОВ НА ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕДАХ РАЗНОГО СОСТАВА

Зайцева В.В., Красочко И.А.

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»,  
г. Минск, Республика Беларусь

*Предложен оптимизированный состав растворителя для подготовки посевного материала гриба трихофитон, позволяющий повысить выход целевого продукта в 1,65-1,87 раз.*

*We propose to optimize the composition of the solvent for the preparation of seed fungus Trichophyton, which increases the yield of the desired product 1,65-1,87 times.*

**Введение.** Основным элементом создания эффективной биотехнологической системы является питательная среда для оптимального биосинтеза целевого продукта, а важная стадия ее формирования – разработка способа выращивания микроорганизмов и их аппаратурно-техническое обеспечение [7, 8].

Среды должны быть по возможности воспроизводимыми и свободными от балластных веществ, ненужных для роста и размножения культур, а также веществ, затрудняющих процесс дальнейшей очистки и консервации препаратов.

Тест питательной потребности играет определенную роль при определении вида гриба, хотя и не отражает истинное питание дерматофитов в природных условиях в стадии сапрофитного роста.

Значение этого теста усиливается в связи с промышленным производством живых грибных вакцин, когда получение биомассы вакцинного штамма производится в стерильных условиях на питательных средах [1, 2, 5].

Как отмечают некоторые исследователи [3, 4], микроконидии дерматофитов полноценны в генетическом отношении, а полное отсутствие антагонистов – выращивание культуры в стерильных условиях на питательных средах – дает возможность проявляться изменчивости бесконечно.

Признак спорообразования, являющийся количественным, легко изменяется под воздействием внешних условий. Метод селекции штаммов дерматофитов по признаку спорообразования включает этапы:

- 1) приготовление разведений селекционируемой культуры с целью получения на чашках Петри отдельно выросших колоний;
- 2) перенос отдельно выросших колоний в отдельную пробирку с сусло-агаром;
- 3) доращивание культур до 20- дневного возраста;
- 4) приготовление смывов моноизолятов;
- 5) подсчет конидий в смывах, выбор наиболее продуктивных смывов;
- 6) высев взвесью продуктивного смыва – приготовление матричной культуры [3].

Жизнеспособность микроконидий, т.е. способность прорасти, не менее, чем интенсивность спорообразования, относится к категории основных качеств живой грибной вакцины.

Известны способы выращивания дерматофитов на разных агаризованных средах: сусло-агар, агар Чапека, агар Сабуро, агар Плаута, мясо-пептонный агар и агар с крахмалом [6].

Следует отметить, что известные способы выращивания дерматофитов не обеспечивают высокого выхода микроконидий дерматофитов, поэтому остается актуальной задачей поиск наиболее эффективных питательных основ и стимуляторов роста грибов.

Цель исследований – оптимизировать выращивание гриба трихофитона на питательных средах.

**Материалы и методы.** Использовали культуры: *Trichophyton verrucosum* ТФ-130 и *Trichophyton mentagrophytes*.

Для изготовления питательной среды и выращивания грибов использовали сусло-агар. Солод для получения сусла готовили из зерна, обработанного препаратами Флоравит, Фузарин, Бионорм В и водопроводной водой.

Эффект от использования стимуляторов состоит в повышении выхода целевого продукта, экстрактивности, его ферментативной активности и сокращении солодоращения.

Неохмеленное сусло готовили из мелкоизмельченного сухого солода. Для этого 2 кг солода ресуспендировали в 10 литрах очищенной воды. Температуру смеси доводили до 54°C и инкубировали далее в течение 20 минут (белковая пауза). Далее температуру смеси доводили до 63°C (за 1 мин

температура смеси должна повышаться на 1°С) и выдерживали при этой температуре 30 минут (мальтозная пауза).

Затем температуру смеси доводили до 70°С (за 1 минуту температура смеси должна повышаться на 1 °С) и выдерживали при этой температуре 1 час (осахаривание). После этого сусло выстаивали при комнатной температуре в течение 30 минут. Фильтрованное сусло прогревали при температуре 92-95°С в течение 40-60 мин. Перед изготовлением среды проводили контроль сусла.

Если произошло осахаривание, то сусло со спиртовым раствором йода давало желтое окрашивание, если осахаривание не произошло – синее.

Кислотное число по Тернеру определяли путем титрования 0,1н натрием гидроксидом.

Кислотное число (Кг) вычисляли по формуле 1:

$$Kr = \frac{a \times 5,61}{\delta} \quad (1)$$

где а – количество (см<sup>3</sup>) раствора едкого натрия, израсходованное на титрование сусла;

δ – количество исследуемого раствора, взятое для анализа в (см<sup>3</sup>);

5,61 – количество миллиграммов натрия гидроокиси, соответствующее 1 см<sup>3</sup> 0,1н раствора натрия гидроокиси.

Определение рН сусла и среды проводили потенциометрически в соответствии с прилагаемыми к нему правилами. Содержание углеводов по Баллингу проводили с помощью сахарометра, в соответствии с правилами, прилагаемыми к рН-метру.

Для приготовления сусло-агара пивное сусло разводили очищенной водой до содержания 7-8° углеводов по Баллингу, заливали в варочный котел, рН устанавливали до его значения 7,8-8,1, добавлением 4%-ого раствора гидроокиси натрия. После чего добавляли предварительно замоченный агар микробиологический (ГОСТ 17206-84) до 2,2-3,0%.

Смесь кипятили до полного растворения агара, фильтровали через капроновое сито № 27-29, разливали в стерильные плоские стеклянные емкости по 300 см<sup>3</sup>, флаконы по 100 см<sup>3</sup> и пробирки по 8-10 см<sup>3</sup>. Емкости закрывали ватно-марлевыми пробками и стерилизовали путем автоклавирования в течение 40 мин при температуре 116-118°С. После стерилизации рН среды составил 6,6-6,7.

Культуру грибов выращивали на сусло-агаре при температуре 26-28°С. Далее культуру снимали скребком и ресуспендировали в 100 см<sup>3</sup> специального растворителя, гомогенизировали в течение 12 минут при 3-5 тыс. об/мин.

В культуре определяли общее количество микроконидий и их жизнеспособность. После чего смешивали гомогенат гриба и защитную среду в соотношении 4:1.

Контрольную питательную среду готовили путем включения в сусло-агар, содержащий сахаров 7° по Баллингу, 5 % нормальной сыворотки крови. Сыворотку добавляли в стерильный, расплавленный и охлажденный до 45°С сусло-агар и после перемешивания разливали в стерильные чашки Петри слоем 3-4 мм.

Среду для опытов готовили таким же образом, но сыворотку из ее состава исключали.

Для постановки контроля грибную суспензию ресуспендировали в физиологическом растворе до 100 млн. микроконидий в см<sup>3</sup>. Посев производили из расчета 1,5 млн. спор на 1 см<sup>3</sup> среды.

Для постановки опыта готовили следующие варианты разбавителя:

№ 1 – экстракт дрожжевой - 0,8 %; сыворотка крови - 3,0 %; 0,1 % раствор натрия хлорид - до 100,0 %.

№ 2 – экстракт дрожжевой - 0,5 %; сыворотка крови - 5,0 %; 0,1 % раствор натрия хлорид - до 100,0 %.

№ 3 – экстракт дрожжевой - 0,8 %; сыворотка крови - 6,0 %; 0,1 % раствор натрия хлорид - до 100,0 %.

№ 4 – экстракт дрожжевой - 0,8 %; гидролизат белков крови - до 100 %.

№ 5 – экстракт дрожжевой - 0,2 %; сыворотка крови - 2,0 %; 0,1 % раствор натрия хлорид - до 100,0 %.

№ 6 – экстракт дрожжевой - 0,9 %; сыворотка крови - 7,0 %; 0,1 % раствор натрия хлорид - до 100,0 %.

Для решения поставленной цели специальным скребком снимали грибную массу с поверхности сусло-агара. Грибную массу, снятую с каждой в отдельности поверхности среды, ресуспендировали в гомогенизаторе с одним из разбавителей, до содержания 100 млн/см<sup>3</sup> спор. Посев проводили из расчета 1,5 млн. спор/см<sup>3</sup> среды. Емкости, засеянные разным посевным материалом гриба, инкубировали в термостате при температуре 28°С в течение 12 суток. Выращенные культуры гриба снимали с поверхности среды, ресуспендировали в соответствующих разбавителях.

Общее количество микроконидий определяли в пробе после разведения ее в 10 раз стерильным физиологическим раствором. Разведенной культурой заряжали две камеры Горяева и подсчитывали количество микроконидий. При этом содержание макроконидий и грибных элементов не учитывали. Подсчет вели в каждой сетке в пяти квадратах (четыре по углам и один в центре или в пяти квадратах, расположенных по диагонали сетки).

Расчет количества микроконидий содержащихся в пробе, рассчитывали по формуле 2:

$$K = \frac{П + В}{2} \times \rho \times 10^4 \times 5 \quad (2)$$

где К - количество микроконидий в 1 см<sup>3</sup> испытуемой культуры;

П - количество микроконидий в пяти квадратах первой сетки;

В – количество микроконидий в пяти квадратах второй сетки;

Р – разведение исходной культуры.

Для определения количества жизнеспособных микроконидий готовили разведения вакцины и высевали на сусло-агар. Посевы вакцины инкубировали в термостате при температуре 26-28°C в течение 8-9 суток и проводили визуальный подсчет колоний.

Для определения количества жизнеспособных микроконидий предварительно в шесть пробирок помещали по 4,5 см<sup>3</sup> одного из испытуемых растворителей. Пипеткой брали 0,5 см<sup>3</sup> суспензии культуры и вносили в первую пробирку, перемешивали содержимое пробирки и новой пипеткой брали 0,5 см<sup>3</sup>, переносили во вторую пробирку и т.д., то есть готовили разведения от 10<sup>-1</sup> до 10<sup>-6</sup>.

Из разведения вакцины 10<sup>-6</sup> пипеткой набирали 0,5 см<sup>3</sup> суспензии гриба и засеивали в каждую из трех чашек Петри с сусло-агаром. Легким покачиванием чашки равномерно распределяли суспензию гриба по поверхности питательной среды. Засеянные чашки помещали в термостат при температуре 26-28°C на 10 суток.

Количество выросших колоний подсчитывали на 10 сутки визуально. Суммировали выросшие колонии в трех чашках Петри. Полученную сумму делили на 3 и умножали на 10<sup>6</sup> (степень разведения). Полученный результат соответствует количеству жизнеспособных микроконидий в см<sup>3</sup> гомогената гриба.

Концентрацию сухого мицелия определяли методом высушивания по ГОСТ 24060-89.

**Результаты исследований.** Нами выявлена зависимость мицелие- и спорообразования у дерматофитов от состава разбавителя посевного материала. Результаты исследований отражены в таблицах 37 и 38.

Таблица 37

**Влияние состава питательной среды на рост мицелия гриба**

Штамм гриба	Наименование компонента, включенного в разбавитель	Концентрация компонента, %	Концентрация сухого мицелия, млн/см <sup>3</sup> среды	Индекс Мицелиеобразования, %	Содержание Микроконидий, млн/мг сухого мицелия
1	2	3	4	5	6
Trichophyton verrucosum ТФ-130	Натрия хлорид (НХ)	0,1	9,2	150,8	18,1
	Сыворотка крови (СК)	3,0			
	Экстракт дрожжей (ЭД)	0,8			
	НХ	0,12	9,1	149,2	18,9
	СК	5,0			
	ЭД	0,5			
	НХ	0,1	9,1	149,2	19,9
	СК	6,0			
	ЭД	0,8			
	НХ	0,1	9,0	147,5	19,6
	ЭД	0,8			
	Гидролизат белков крови (ГБК)	96,2			
	НХ	0,1	5,1	83,6	16,1
	СК	2,0			
	ЭД	0,2			
	НХ	0,1	6,1	101,2	16,7
	СК	7,0			
ЭД	0,9				
НХ	0,85	6,1	100,0	16,5	
СК	-				
ЭД (контроль)	-				
Trichophyton mentagrophytes	НХ	0,1	8,1	155,8	18,9
	СК	3,0			
	ЭД	0,8			
	НХ	0,12	9,0	173,1	20,2
	СК	5,0			
	ЭД	0,5			
	НХ	0,1	9,2	176,9	18,4
	СК	6,0			
	ЭД	0,8			
	НХ	0,1	9,2	176,9	18,4
	ЭД	0,8			
	ГБК	96,2			
	НХ	0,1	5,1	98,1	15,9
	СК	2,0			
	ЭД	0,2			
	НХ	0,85	5,2	100,0	17,8
	СК	-			
ЭД (контроль)	-				

Из данных таблицы 1 видно, что при снижении концентрации сыворотки до 2,0 % и увеличении до 7,0 % в составе разбавителя соответственно индекс мицелиеобразования составляет для гриба *Tr. verrucosum* ТФ-130 83,6 % и 101,2 %, а индекс спорообразования 81,5 % и 101,2 %.

Схожие результаты были получены при культивировании культуры гриба *Tr. mentagrophytes*.

Сыворотка в концентрации 3,0-6,0 % стимулирует у всех исследованных штаммов грибов как рост мицелия, так и спорообразование. Так, индекс мицелиеобразования составляет 149,2-176,9 %, а спорообразования 165,0-186,9 %.

Особое внимание было уделено изучению изменчивости признаков мицелие- и спорообразования под влиянием экстракта дрожжевого. У всех изученных штаммов грибов установлена зависимость мицелие- и спорообразования от его концентрации в составе разбавителя посевного материала. Так, при концентрации 0,5-0,8 % экстракта дрожжевого в составе разбавителя отмечен высокий индекс как мицелиеобразования 149,2-176,9 %, так и спорообразования – 170,8-186,9 %.

Снижение концентраций сыворотки крови (2,0 %) и экстракта дрожжевого (0,2 %) в составе разбавителя посевного материала приводит к снижению индексов мицелиеобразования (83,6-98,1 %) и спорообразования (80,0-87,4 %). Повышение концентрации сыворотки крови (7,0 %) и экстракта дрожжей (0,9 %) в составе разбавителя приводит к такому уровню образования мицелия и спор, как и при использовании физиологического раствора.

Таблица 38

**Влияние состава питательной среды  
на спорообразование гриба**

Штамм гриба	Наименование компонента, включенного в разбавитель	Концентрация компонента, %	Концентрация микроконидий, млн/см <sup>3</sup> среды	Индекс спорообразования, %	Жизнеспособность микроконидий, %
<i>Trichophyton verrucosum</i> ТФ-130	Натрия хлорид (НХ)	0,1	166,8	165,5	91,37
	Сыворотка крови (СК)	3,0			
	Экстракт дрожжей (ЭД)	0,8			
	НХ	0,12	172,2	170,8	91,0
	СК	5,0			
	ЭД	0,5			
	НХ	0,1	181,4	180,0	90,4
	СК	6,0			
	ЭД	0,8			
	НХ	0,1	176,4	175,0	92,4
	ЭД	0,8			
	Гидролизат белков крови (ГБК)	96,2			
	НХ	0,1	82,2	81,5	64,0
	СК	2,0			
	ЭД	0,2			
	НХ	0,1	102,0	101,2	68,0
	СК	7,0			
ЭД	0,9				
НХ	0,85	100,8	100,0	74,0	
СК	-				
ЭД (контроль)	-				
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	НХ	0,1	152,8	165,0	90,6
	СК	3,0			
	ЭД	0,8			
	НХ	0,12	168,7	182,2	89,4
	СК	5,0			
	ЭД	0,5			
	НХ	0,1	173,1	186,9	89,6
	СК	6,0			
	ЭД	0,8			
	НХ	0,1	169,7	183,3	90,8
	ЭД	0,8			
	ГБК	96,2			
	НХ	0,1	80,9	87,4	66,8
	СК	2,0			
	ЭД	0,2			
	НХ	0,85	92,6	100,0	81,5
	СК	-			
ЭД, (контроль)	-				

Следует отметить, что использование в качестве растворителя гидролизата белков крови и исключение сыворотки крови позволяет даже несколько повысить индекс образования спор.

Таким образом, предлагаемый способ выращивания грибов на основе разработанного состава разбавителя дает возможность без дополнительных затрат питательных сред и энергоносителей существенно снизить производственные затраты на изготовление вакцины и увеличить ее выход на 165,0-186,9 %.

**Заключение.** Предложен растворитель для подготовки посевного материала грибов, включающий 0,3-0,8 % экстракта дрожжей и 3,0-6,0 % сыворотки крови. Использование вместо физиологического раствора предлагаемого растворителя обеспечивает повышение выхода вакцины в 1,65-1,87 раза.

**Литература.** 1. Головина, Н.П. Культурально-морфологические и биологические свойства возбудителя трихофитии овец / Н.П. Головина // Тр. ВИЭВ. – 1987. – Т. 65. – С. 41-50. 2. Головина, Н.П. Патогенность и иммуногенность штаммов *Trichophyton verrucosum* разного зоологического происхождения / Н.П. Головина, Л.Г. Иванова // Бюлл. ВИЭВ. – 1983. – вып. 49. – С. 59-62. 3. Головина, Н.П. Разработка и использование метода селекции по признаку спорообразования у трихофитонов при изготовлении вакцины ТФ-30 ВИЭВ / Н.П. Головина // Бюлл. ВИЭВ. – 1984. – вып. 54. – С. 14-17. 4. Головина, Н.П. Специфические особенности возбудителя трихофитии овец (питательные потребности, культурально-морфологические свойства, патогенность) / Н.П. Головина // Актуальные вопросы медицинской микологии: Тез. докл. Международного симпозиума. – Л., 1987. – С. 42-44. 5. Головина, Н.П. Углеводное питание и культурально-морфологические свойства штаммов *Microsporum canis*, выделенных от собак и кошек / Н.П. Головина // Бюлл. ВИЭВ. – 1989. – № 72. – С. 22-32. 6. Летягин, К.П. Влияние температуры на спорогенез дерматофитов / К.П. Летягин, Т.Н. Мохина // Контроль качества и стандартизация биопрепаратов, фармакологических средств, кормовых добавок, применяемых в ветеринарии и животноводстве / Сб. науч. трудов. – М., 1984. – С. 74-79. 7. Самуйленко, А.Я. Научное обеспечение высокоэффективного производства ветеринарных биологических препаратов / А.Я. Самуйленко // Ветеринария. – 1996. – №8. – С. 26-29. 8. Самуйленко, А.Я. О разработке промышленных технологий производства биопрепаратов / А.Я. Самуйленко, Е.А. Рубан, Т.А. Авдеева // Вестник Российской академии сельскохозяйственных наук. – 1999. – № 6. – С. 75-78.

Статья передана в печать 20.09.2012 г.

УДК: 619:615.371:616.98:578.822.2:636.2

## ИММУННЫЙ ОТВЕТ У ТЕЛЯТ, ВАКЦИНИРОВАННЫХ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВИРУС-ВАКЦИНОЙ ПРОТИВ ПАРВОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АНТИГЕНА С РАЗЛИЧНОЙ АКТИВНОСТЬЮ С РАЗЛИЧНЫМИ АДЪЮВАНТАМИ

Красочко П.А., Авласко Н.М.

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», г. Минск, Республика Беларусь

В статье представлены данные по изучению иммунного ответа у телят при иммунизации их в 3-5-месячном возрасте против парвовирусной инфекции с использованием парвовируса с различной активностью (от 9 до 11 log<sub>2</sub>) и при применении адъювантов ИЗА 15, эмульсигена и гидроксала. Поствакцинальный титр антител был достаточно высок при любой активности антигена, а наиболее целесообразным оказалось использование вакцины, в состав которой входит монтанид ИЗА 15 или эмульсиген.

Immune response of calves, vaccinated at 3-5 month against parvovirus infection with parvovirus activity 9-11 logand different adjuvants – ISA 15, emulsigen and hydroxal was investigated. Post-vaccinal antibody titer was high enough at any antigen activity. Application of vaccine with adjuvant ISA 15 or emulsigen appeared most rational.

**Введение.** Современное развитие промышленного животноводства требует высоких объемов продукции, что напрямую зависит от благополучия того или иного хозяйства, района, области и республики в целом по инфекционным заболеваниям. Последствиями переболевания животных является ухудшение качества и недополучение продукции. Наиболее часто среди поголовья крупного рогатого скота регистрируются заболевания полового аппарата, следствиями которых являются аборт, эндометриты, вагиниты, маститы, баланопоститы, а молодежь, рожденная от таких животных, подвержена риску заражения инфекциями, которые у новорожденных телят проявляются в виде пневмоний и тяжелых гастроэнтероколитов, зачастую заканчивающихся летально [1].

В этиологии такой симптоматики в хозяйствах Республики Беларусь первенство принадлежит парвовирусной инфекции крупного рогатого скота. В стадах с высокой степенью инфицированности возбудителем парвовирусной инфекции у животных значительно снижается оплодотворяемость, вирус проникает через плацентарный барьер, нарушая трофику плода обуславливает аборт у коров и поражение органов пищеварения у телят. У новорожденных телят инфекция протекает латентно, с признаками поражения желудочно-кишечного тракта. Заболевание проявляется в виде незначительного подъема температуры тела, профузного поноса, фекалии светло-серого цвета со значительным количеством слизи. При наслоении апатогенной микрофлоры (пастереллы, сальмонеллы, стафилококки) у телят выявляются признаки поражения органов дыхания и пищеварения. Патологоанатомически обнаруживают церебральную гипоплазию, кортикоцеребральный некроз и катарально-геморрагическое воспаление кишечника [3, 6].