

УДК 619:579.842.14:619:615.31

Г. Э. ДРЕМАЧ, А. В. ЗАЙЦЕВА

## СТАБИЛЬНОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ САЛЬМОНЕЛЛ ПРИ ИЗГОТОВЛЕНИИ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ

*Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины*

*(Поступила в редакцию 23.03.2004)*

Среди всех заболеваний молодняка сельскохозяйственных животных наиболее широко распространены желудочно-кишечные и респираторные болезни. При этом установлено, что они возникают в критические иммунологические периоды жизни молодняка. Для снижения негативных последствий возрастной и приобретенной иммунной недостаточности применяют различные стимуляторы, полученные из крови, костного мозга, тимуса и микроорганизмов [1]. Действие биологически активных веществ направлено на повышение неспецифической резистентности организма, обмена веществ, регуляции основных наиболее важных функций организма и снижение риска развития заболеваний.

В последние годы большое внимание уделяется изучению иммуномодулирующей активности микробных полисахаридов.

Липополисахариды (ЛПС) являются специфическими компонентами внешней мембраны грамотрицательных бактерий. Они покрывают большую часть наружной поверхности этих микроорганизмов, составляя по массе от 30 до 50% внешней мембраны. Бактериальные клетки могут существовать с различным уровнем комплектации молекул ЛПС. Наиболее вариабелен состав полисахаридной цепи *O*-антигена и структура олигосахаридной цепи ядра ЛПС. Нарушение синтеза *O*-специфических цепей ЛПС приводит к *R*-фенотипу.

Группа бактериальных ЛПС и их синтетических аналогов относятся к иммуномодуляторам природного происхождения.

Следует иметь в виду, что некоторые ЛПС неприемлемы для клинического использования, так как сложны в применении и оказывают ряд побочных воздействий. Однако широкий спектр иммунологического действия ЛПС вызывает необходимость постоянного поиска новых, менее токсичных препаратов на основе ЛПС. С этой же целью прилагаются усилия и для модификации молекулы ЛПС.

Цель наших исследований — изучение влияния солей нуклеиновых кислот на биологические и культуральные свойства сальмонелл, используемых для изготовления препаратов, предназначенных для проведения активной иммунизации животных.

**Материалы и методы исследований.** В работе использовали патогенные штаммы бактерий *Salmonella pullorum gallinarum* ЛБ, 24 КСТ, 10Б, 1480 и 353.

Для культивирования сальмонелл применяли микробиологические среды: бульон Хоттингера и разработанную нами питательную среду на основе гидролизата мясокостной муки (ГМКМ). Культуры сальмонелл выращивали в течение 8—16—24 ч при температуре 36—39 °С.

Морфологические, тинкториальные, культуральные, биохимические свойства бактерий изучали в соответствии с общепринятыми методиками, с учетом видовых особенностей микробов.

Вирулентные свойства сальмонелл определяли на 9—10-дневных куриных эмбрионах. Выращенные культуры сальмонелл инокулировали в аллантоисную полость эмбриона в объеме 0,1 см<sup>3</sup> при концентрации 240—400 млн микробных клеток. Учет результатов осуществляли путем определения ЛД<sub>50</sub> общепринятым методом.

Кроме того, в работе использовали металлокомплексы нуклеиновых кислот (нуклеинат натрия и нуклеинат кальция) с целью стабилизации биологических свойств сальмонелл.

Эксперименты сопровождали необходимыми измерениями и контролями, которые гарантировали достоверность полученных результатов.

Основное направление опытов заключалось в стимуляции размножения микроорганизмов, что сопровождается достоверным увеличением микробной массы, а также увеличением диаметра колоний на плотных средах, содержанием нуклеотида и белка в бактериальных клетках.

**Результаты и их обсуждение.** При анализе полученных результатов исследований нами было установлено, что вирулентные бактерии более активно реагируют на стимуляцию, чем слабовирулентные.

В предварительных опытах нами установлены оптимальные концентрации металлокомплексов нуклеиновых кислот для культивирования сальмонелл, которые составляют соответственно 8 и 10 мкг/см<sup>3</sup> питательной среды. При культивировании сальмонелл на бульоне Хоттингера (табл. 1) плотность баксуспензии микроорганизмов увеличилась от 0,35±0,04 млрд/см<sup>3</sup> после 8-часового выращивания до 0,9±0,08 млрд/см<sup>3</sup> после 24 ч инкубирования. Использование иммуностимуляторов в питательных средах позволило увеличить плотность баксуспензии до 1,4 млрд/см<sup>3</sup>. При этом удалось повысить вирулентность сальмонелл от 80 ЛД<sub>50</sub> при выращивании на бульоне Хоттингера до 42—28 ЛД<sub>50</sub> при использовании данных препаратов. Аналогичная динамика прослежена нами и при выращивании сальмонелл на ГМКМ, где вирулентность возросла в 2,1—3,0 раза. При этом нами установлено, что плотность баксуспензии сальмонелл и выход полисахаридсодержащей фракции значительно превышает аналогичные показатели при использовании бульона Хоттингера. Так, выход полисахаридсодержащих фракций из биомассы сальмонелл при пассировании на бульоне Хоттингера со стимуляторами повышался в 1,35—1,62 раза, а на ГМКМ — в 1,38—1,68 раза по сравнению с контрольными средами.

Т а б л и ц а 1. Вирулентность и продуктивность микробов на бульоне Хоттингера и среде ГМКМ

Состав питательной среды	Число микроорганизмов (млрд/см <sup>3</sup> ) в разные сроки инкубации (ч)			ЛД <sub>50</sub> млн м. к.	Выход полисахаридсодержащей фракции из биомассы (%) через 24 ч инкубации
	8	16	24		
Бульон Хоттингера	0,35±0,04	0,8±0,04	0,9±0,08	80±5	12,0±0,8
Бульон Хоттингера + 0,1% нуклеината натрия	0,45±0,03	1,0±0,08	1,4±0,10	42±3	15,0±1,1
Бульон Хоттингера + 0,1% нуклеината кальция	0,40±0,02	1,1±0,09	1,4±0,12	28±2	16,0±1,0
ГМКМ	0,50±0,06	1,2±0,08	1,6±0,11	68±6	13,4±0,7
ГМКМ + 0,1% нуклеината натрия	0,50±0,04	1,4±0,08	2,1±0,12	32±3	18,6±1,4
ГМКМ + 0,1% нуклеината кальция	0,60±0,06	1,3±0,06	2,0±0,08	26±3	21,0±1,5

Биохимические, культуральные и тинкториальные свойства пассированных сальмонелл не изменялись. Кроме того, результаты экспериментов показали, что введение стимуляторов в изучаемые питательные среды способствуют повышению жизнеспособности культур сальмонелл в 1,2—1,5 раза по сравнению с контролем.

Антигенные свойства сальмонелл изучали в РА на стекле с серогрупповой сывороткой группы Д. Результаты исследований представлены в табл. 2 и 3.

Т а б л и ц а 2. Биологические свойства сальмонелл при инкубации на бульоне Хоттингера различного состава

Наименование штаммов	Состав питательных сред (*)	Кол-во биологически активных клеток, %	Степень разведения сальмонелл и позитивной сыворотки (титр 1:400) при постановке РА на стекле	Кол-во диссацированных колоний (SR и R формы), %
ЛБ	1	64±0,24	1:12	4
	2	86±0,80	1:16	1
	3	88±1,10	1:16	0
10Б	1	63±0,20	1:8	6
	2	69±1,00	1:12	1
	3	72±1,40	1:12	1
24 КСТ	1	62±0,19	1:12	4
	2	88±1,00	1:16	1
	3	91±1,50	1:16	0
1480	1	65±0,18	1:10	5
	2	85±1,80	1:16	1
	3	89±1,50	1:16	1
353	1	65±0,24	1:10	3
	2	92±1,10	1:14	1
	3	85±1,30	1:16	0

\* 1 — бульон Хоттингера; 2 — бульон Хоттингера, содержащий 1 мг/см<sup>3</sup> нуклеината натрия; 3 — бульон Хоттингера, содержащий 1 мг/см<sup>3</sup> нуклеината кальция.

Т а б л и ц а 3. Биологические свойства сальмонелл при инкубации на питательных средах из ГКМ различного состава

Наименование штаммов	Состав питательных сред (*)	Кол-во биологически активных клеток, %	Степень разведения сальмонелл и позитивной сыворотки (титр 1:400) при постановке РА на стекле	Кол-во диссоциированных колоний (SR и R формы), %
ЛБ	1	64±0,80	1:12	5
	2	91±1,50	1:16	1
	3	90±1,80	1:16	1
10Б	1	65±0,60	1:12	5
	2	79±1,20	1:16	1
	3	84±1,00	1:16	0
24 КСТ	1	66±0,60	1:12	4
	2	90±1,60	1:14	1
	3	92±1,50	1:16	1
1480	1	68±0,12	1:12	4
	2	88±1,50	1:16	1
	3	93±1,80	1:16	1
353	1	69±0,18	1:12	5
	2	93±1,50	1:16	1
	3	97±1,30	1:16	1

\* 1 — ГКМ; 2 — ГКМ, содержащая 1 мг/см<sup>3</sup> нуклеината натрия; 3 — ГКМ, содержащая 1 мг/см<sup>3</sup> нуклеината кальция.

Как видно из табл. 2 и 3, введение в питательные среды солей рибонуклеиновой кислоты приводит к повышению агглютинабельности бактерий и снижению количества диссоциированных колоний в культуре сальмонелл по сравнению с контрольными штаммами, пассированными через питательные среды без иммуностимуляторов. Мы считаем, что соли рибонуклеиновой кислоты блокируют перекисное окисление мембран липидов бактерий, предохраняя их от действия перекисей и свободных радикалов, образующихся особенно часто в метаболически активных клетках и тем самым сохраняющих нормальную структуру и функцию мембран.

Позитивные результаты опытов позволяют рекомендовать для использования в биологической промышленности способ выращивания сальмонелл на питательной среде из непитевого сырья, содержащей соли рибонуклеиновой кислоты при изготовлении иммунобиологических препаратов.

**Выводы.** Использование в процессе культивирования сальмонелл солей нуклеиновых кислот существенно повышает их культуральную, репродуктивную и биологическую активность. Результаты исследований могут быть использованы в биологической промышленности для изготовления активной иммунизации против сальмонеллеза животных.

### Литература

1. Алехин Е. К., Лазарева Д. Н. // Экспериментальная и клиническая фармакология. 1994. № 4. С. 3—6.
2. Бабина М. П., Карпуть И. М. // Ветеринарная медицина Беларуси. 2001. № 1. С. 30—31.
3. Мастернак Т. Б., Малкина Е. Ю., Ларин А. С. и др. // Иммунобиология. 1998. № 1. С. 33—36.
4. Прошенко В. М. Микробный липополисахарид, как средство профилактики бактериальной инфекции // Молодежь, наука, аграрное образование и производство: Сб. тр. молод. учен. и препод. с.-х. учебн. и науч.-исслед. заведений. Витебск, 1999. С. 186—188.

*DREMACH G. E., ZAITSEVA A. V.*

### STABILITY OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF SALMONELLS AT PREPARATION OF IMMUNE-BIOLOGICAL MEDICATION

### Summary

Results of study of influence of nucleic acid salts onto biological, cultural and reproductive characteristics of salmonells used for producing active immune medication for animals have been discovered. It has been stated that use of nucleic acid salts at a process of salmonells cultivation enhances in large extent their biological, cultural and reproductive activity.