

На правах рукописи



003054 152

ЕВГЛЕВСКИЙ Дмитрий Анатольевич

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ПИТАТЕЛЬНЫХ СРЕД
ДЛЯ ВЫРАЩИВАНИЯ И ИЗУЧЕНИЯ
БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ СТАФИЛОКОККОВ
И ПОЛУЧЕНИЯ АНАТОКСИН-ВАКЦИНЫ**

16.00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'D. Evl' with a long horizontal stroke extending to the right.

Курск – 2007

Работа выполнена в ФГОУ ВПО “Курская государственная сельскохозяйственная академия имени профессора И.И. Иванова” и в лаборатории ветеринарной медицины ГНУ Курский государственный научно-исследовательский институт агропромышленного производства Российской академии сельскохозяйственных наук

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук,
профессор Буткин Евгений Иванович

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Мищенко Владимир Александрович

кандидат ветеринарных наук
Лебедева Марина Георгиевна

Ведущая организация: ФГОУ ВПО “Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина”

Защита состоится «30» марта 2007 г. в «11» часов
на заседании диссертационного совета Д 220.040.03 при ФГОУ ВПО
“Курская государственная сельскохозяйственная академия имени про-
фессора И.И. ИВАНОВА” по адресу: 305021, г. Курск, ул. К. Маркса,
70, КГСХА.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Курской госу-
дарственной сельскохозяйственной академии имени профессора
И.И. Иванова.

Автореферат разослан «22» февраля 2007 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Рыжкова Г.Ф.

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Стафилококки – грамположительные кокки, располагаются в виде гроздьев винограда из-за их деления в разных плоскостях, не образуют спор, не имеют жгутиков, способны расти в присутствии высоких концентраций хлористого натрия, желчи и сильнощелочной среде, содержат два вида тейхоевых кислот, образуют экзотоксин, ряд ферментов (коагулазу и др.), способные разрушать эритроциты, лейкоциты и коагулировать, свертывать сыворотку крови впервые обнаружены в 1878 г. Р. Кохом и в 1880 г. Л. Пастером (А.И. Коротяев и др., 1998; Я.С. Шапиро, 2003; Д.Г. Дерябин, 2000; В.Г. Герман и др., 2002).

Род стафилококков включает более 20 видов и свыше 50 разновидностей антигенов, способные поражать любую ткань или орган и вызывать более 100 различных заболеваний – маститы дерматиты, пневмонии, артриты, гнойные и раневые инфекции, пищевые отравления, сепсис, а их энтеротоксины как суперантигены стимулируют избыточный синтез Т-лимфоцитов, которые через образуемый интерлейкин – 2 реализуют отравляющее действие (А.А. Тотолян и др., 2001; Е.Ю. Яхимова и др., 2002; W. Karacawa et al., 1995; J. Kline et al., 1999; Y. Vandepitte, 2005).

Основными видами стафилококков являются золотистый (*S. aureus*), эпидермальный, кожный (*S. epidermatis*) и сапрофитный (М.О. Биргер, 1982; В.Б. Хватов и др., 2003; В.Д. Беляков и др., 1998; G. Amstberg, 1999).

Применение лекарственных препаратов и влияние ряда факторов внешней среды усилили молекулярные и генетические механизмы (плазмиды, хромосомные гены) на образование антибиотикоустойчивости у стафилококков, синтез ферментов, разрушающих антибиотики и образование структур, нарушающих проницаемость клеточной стенки бактерий (И.Н.Маланчин, 2000; В.Г. Петровская и др., 2002).

Стафилококки существенно увеличивают репродукцию ВИЧ в иммунокомпетентных клетках и тем самым обуславливают прогрессирование ВИЧ – инфекции (Д.Г. Дерябин, 2000; L. Cone et. al., 1992).

Золотистый стафилококк используют в качестве тест – объекта при испытании активности антибиотиков (К.И. Матвеев, 1973; В.И. Покровский и др., 1999; Г.Г. Онищенко, 2002; В.К. Таточенко и др., 2001).

Постинфекционный иммунитет при стафилококкозах обусловлен гуморальными и клеточными факторами, но особая роль принадлежит иммунотоксинам, антитоксинам, антителам против ферментов, токсинов.

В целом напряженность и длительность иммунитета против стафилококков изучена недостаточно, так как у них слишком разнообразна антигенная структура (А.П. Пехов, 1997; Н.Б. Егорова, 2001; Y. Alber et. al., 1999). Анатоксины и вакцины из убитых стафилококков хотя и приводят к образованию антител, но в основном только против тех серовариантов, из которых изготовлена вакцина или анатоксин (А.А. Воробьев, 1999; и др., 2004; В.В. Герман и др., 2003).

В этом плане актуальны исследования в изучении воздействия региональных факторов внешней среды, в том числе геомагнитных на стафилококки, разработка более современных методов и средств подавления посторонней микрофлоры, элективных и накопительных пита-

тельных сред для экспресс – выделения и накопления стафилококков и изучения их биологических свойств, получения биопрепаратов и определения их протективных и иммуногенных свойств.

Актуальность вышеизложенного определило выбор темы, цели и направления наших исследований.

Цель и задачи исследований. Целью работы явилось совершенствование методов и средств индикации стафилококков и питательных сред для их выращивания и получения токсинов и анатоксинов и изучение влияния экологических факторов на их биологические свойства.

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Разработать синтетические питательные среды для выращивания стафилококков, изучения биологических свойств и получения анатоксин - вакцины;

2. Изыскать способ подавления посторонней микрофлоры при выделении чистой культуры стафилококков;

3. Изучить влияние электромагнитного воздействия на биологические свойства стафилококков;

4. Изыскать возможность получения стафилококковой анатоксин - вакцины (СAB), обладающей эффективными лечебными и профилактическими свойствами.

Научная новизна и теоретическая значимость работы заключается в подборе химических ингредиентов при разработке плотной селективной питательной среды с агаром для индикации и жидкой среды для выращивания стафилококков и эффективности 3 % раствора лимонной кислоты с 3 % раствором перекиси водорода для подавления посторонней микрофлоры. Установлено, что стафилококки, выделенные от больных животных, точных вод из регионов повышенного геомагнитного воздействия проявляли увеличение термо- и антибиотикоустойчивости на 12-15%.

Практическая ценность. Разработанная селективная плотная минеральная среда с 7,5% хлористого натрия и способ подавления посторонней микрофлоры 3% раствором перекиси водорода с 3% раствором лимонной кислоты в течение 30-40 минут могут быть использованы при бактериологическом исследовании, а жидкая минеральная питательная среда, обеспечивающая накопление стафилококков до $9,0 \pm 1,0$ млрд/мл микробных тел в 2-х литровых биобутылях с объемом среды равной 1 литру при выращивании в течение 10-12 дней для изготовления инактивированной 0,6 % раствором формалина при $42-45^{\circ}\text{C}$ в течение 15 суток анатоксин – вакцины.

Установленное повышение устойчивости стафилококков к действию температуры и антибиотиков необходимо учитывать при проведении ветеринарно-санитарных мероприятий и лечения животных, больных стафилококкозом.

Основные положения, выносимые на защиту:

Материалы разработки жидкой и плотной синтетических питательных сред для выделения, выращивания и изучения биологических свойств стафилококков и получения анатоксин - вакцины (СAB);

Результаты изыскания способа подавления посторонней микрофлоры при выделении чистой культуры стафилококков из патологического материала и объектов внешней среды;

Биологические свойства стафилококков, подвергнутых электромагнитному воздействию;

Материалы получения стафилококковой анатоксин-вакцины и изучение ее лечебных и профилактических свойств.

Апробация работы. Основные материалы диссертации доложены и обсуждены на 3-х научных конференциях – международной конференции, посвященной 300-летию Санкт-Петербурга (2003 г.), международной конференции г. Харьков (2003 г.) Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 120-летию ветеринарной службы Курской области (2005 г.).

Публикации результатов исследований. По материалам диссертации опубликовано 13 научных статей, в том числе получен 1 патент на изобретение № 2239422 «Способ профилактики мастита» - 10 ноября 2004 г.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 114 страницах компьютерного текста и включает введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований и их обсуждение, выводы и практические предложения и приложения. Работа иллюстрирована 11 таблицами и 4 рисунками. Список литературы включает в себя 207 источников, в том числе 88 иностранных авторов.

2. МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводились на кафедре эпизоотологии и паразитологии ФГОУ ВПО «Курская государственная сельскохозяйственная академия имени профессора И.И. Иванова» и в Курском ГНУ НИИ АПП в период с 2001 по 2006 гг.

Объектом исследования служили стафилококки, выделенные из трупов павшей птицы, поросят, телят, молоко от коров, смывы с доильных аппаратов, кожные поражения при дерматитах у собак, гнойные выделения при ожогах кожи, а также лабораторные культуры микроорганизмов.

Определение концентрации стафилококков в бульонной культуре в пробирках, биобутылях, флаконах проводили путем сравнения с бактериологическим стандартом мутности в пробирках, с концентрацией микробных тел 1,0; 10,0; 100,0 млн/мл и 1,0 и 2,0 млрд/мл путем визуального просмотра.

В основе изыскания питательных сред положено использование различных концентраций лимонной, яблочной, янтарной кислот, цитрата аммония, фосфорнокислого калия, сернокислого железа, сернокислого цинка, хлористого натрия, аспарагина, гликокола, глицерина, аммиака. Контролем служили МПГБ, МПГА и перевар Хоттингера.

Разработка питательных сред на минеральной основе была направлена на создание плотной среды с 2,5% агара и 7,5% поваренной соли для выделения стафилококков из патологического материала (биоматериала) – органы и ткани павших телят, поросят, кур, кошек и собак. В основе изготовления агаровой среды использована солевая основа жидкой синтетической среды (СПС).

Для подавления посторонней микрофлоры загрязненные кусочки пораженной кожи, печени, сердца, лимфатических узлов, ран с гнойным поражением проводили испытание бактерицидной и бактериостатической эффективности смеси растворов перекиси водорода с лимонной кислотой, чтобы создать в 1-4% растворе перекиси водорода кислую среду, а затем нейтрализацию проводили 5-10% раствором аммиака до pH 7,5.

Исследования проводили как с чистой культурой стафилококков, так и в смеси с различными микроорганизмами – кишечной палочкой, сальмонеллами, протеем, синегнойной палочкой, сарцинами и стрептококками.

Электромагнитное воздействие на суспензию стафилококков при выращивании в жидкой синтетической питательной среде в течение 12-15 суток проводили ежедневно с помощью магнитной мешалки и электромагнитного излучения с использованием прибора ПОРТ – ЭЛМ/НН завода «Микромедбиотех» при разных временных экспозициях. Для контроля использовали стафилококки, выделенные из регионов с повышенным геомагнитным полем.

Определение изменений биологических свойств стафилококков проводили в отношении чувствительности к антибиотикам с помощью бумажных дисков и разведений растворов антибиотиков к определенной концентрации в питательной среде от 100 тысяч до 1 млн микробов в 1 мл (см^3), определяемых по оптическому стандарту мутности. Изучение чувствительности стафилококков к температуре и сохранности в пробирках, флаконах с питательной средой после температурного воздействия на определенную концентрацию микроорганизмов проводили путем посева суспензии стафилококков на МПА, МПБ и синтетическую жидкую и агаровую среды.

Получение стафилококкового токсина проводили путем выращивания свежевыделенных патогенных стафилококков на жидкой синтетической среде в 2-х литровых биобутылях с объемом среды равной 1 литру в течение 15 дней до 9-10 миллиардной концентрации стафилококков в 1 мл. Стерилизацию выращенных стафилококков проводили при 120°C в течение 1 часа, а затем отделяли микробную массу от культуральной жидкости путем фильтрации через бактериальный фильтр.

К полученному фильтрату добавляли формалин до конечной концентрации 0,4; 0,5; 0,6; и 1,0% в растворе. Детоксикацию проводили при 45°C в течение 12-15 суток. В последующем с учетом того, что формалин как альдегид муравьиной кислоты соединяется, связывается с белками токсина, добавление проводили в два этапа с интервалом 7 суток.

Контроль полноты детоксикации стафилококкового токсина проводили на остаточную возможность гемолизировать эритроциты кролика, образовывать некроз на спине кролика и белых мышах (К.И. Матвеев, 1973; М.О. Биргер, 1982).

Кроме стафилококкового анатоксина изготавливали стафилококковую анатоксин-вакцину, состоящую из взвеси убитых нагреванием стафилококков с разной концентрацией от 2-х до 10 миллиардов микробных тел в 1 мл. растворимых токсинов.

Изготовленные стафилококковый анатоксин и анатоксин – вакцину использовали для лечения коров, больных катаральным и гнойнокатаральным маститом путем ежедневного интрацестерального введения препаратов в сосок по 4,0 мл отдельно и с диметилсуль-

фоксидом (ДМСО), при лечении ожоговых ран у свиней путем орошения и примочек и профилактики стафилококкоза птиц. В целом исследования проводили по трем основным разделам, которые представлены на рис. 1.



Рис. 1. Общая схема исследований

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Разработка элективных синтетических средств для выращивания и выделения стафилококков

На современном этапе борьбы со стафилококкозом особое внимание уделяется разработке синтетических питательных сред для выращивания стафилококков, изучения биологических свойств и получения анатоксин-вакцины. Серия поставленных опытов позволила отработать состав жидкой синтетической питательной среды и на ее минеральной основе плотный вариант с 2,5% агаром.

В отличие от мясных бульонов, гидролизатов мяса, рыбы, казеина разработанная среда отличается стабильностью состава, хорошей растворимостью ингредиентов. Состав синтетической питательной среды представлен в табл. 1.

Реакцию среды из кислого показателя pH 3,5 устанавливали 5-10% раствором аммиака до слабощелочной $7,7 \pm 0,2$.

При этом объем питательной среды (СПС) при расфасовке должен составлять половину емкости пробирки, флакона или колбы, а автоклавирование проводится при 1,0 атм ($1,0 \pm 0,2 \cdot 10^5$ Па), 120°C в течение 30 минут.

Таблица 1

Состав синтетической среды для выращивания стафилококков

№ п/п	Наименование ингредиентов	Количество г/л
1	Лимонная кислота	8,0
2	Цитрат аммония	4,0
3	Аспарагин	1,0
4	Гликокол	2,0
5	Хлористый натрий	7,0
6	Сернокислый цинк	0,2
7	Сернокислый магний	0,4
8	Сернокислое железо	0,2
9	Фосфорнокислый калий – 2-замещенный	3,0
10	Глицерин	40 мл
11	Дистиллированной воды	до 1 л
12	Установление реакции среды до $7,7 \pm 0,2$ – 10% раствором аммиака	

На предлагаемой среде рост стафилококков не имел различий, как для адаптивных, так и свежевыделенных микроорганизмов.

Предложенная синтетическая питательная среда (СПС) содержит все необходимые органические и неорганические соединения, основные и дополнительные метаболиты на фоне физиологически сбалансированного стабильного солевого раствора. Входящая в состав СПС лимонная кислота обеспечивает полное растворение ингредиентов и образование растворимых компонентов ценных для роста стафилококков, что благоприятствовало решению поставленной задачи.

Питательные свойства предложенной синтетической среды и растворимость вносимых ингредиентов не изменяются как при последовательном растворении химических соединений, так и после предварительного смешивания их в сухом виде. Концентрация стафилококков в процессе роста на СПС в течение 12-15 суток достигала $9,0 \pm 0,5$ млрд/мл микробных тел при выращивании в 2-х литровых биобутылях с объемом среды равной 1 литру, которая иллюстрирована в динамике на рис. 2.

Полученные результаты по изысканию и апробации СПС для выращивания стафилококков позволяют использовать предложенный вариант для стабильного и достаточного накопления микробной массы. Однако жидкий вариант СПС менее удобен для выделения и изучения биологических свойств микроорганизмов. Поэтому еще Р.Кохом в 1882 г. были предложены плотные питательные среды с 2,5% агаром для выделения возбудителей туберкулеза, холерного вибриона, сибирской язвы с использованием мясного бульона

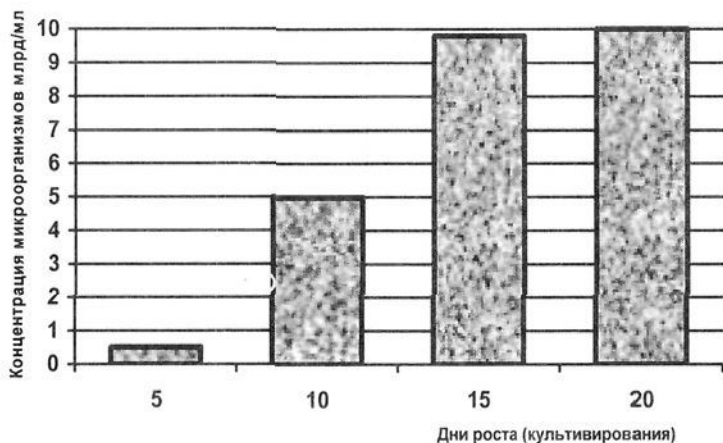


Рис. 2. Динамика накопления стафилококков на жидкой СПС

В связи с вышеизложенным и с учетом результатов, полученных при изыскании и апробации жидкой СПС для выращивания стафилококков была предпринята попытка выяснить питательную ценность плотной среды и ее возможность, для выделения стафилококков из трупов павших животных в цельном виде и в разведениях 1:1, 1:2, и 1:3 с 2,5% содержанием агара. Оптимальные результаты по скорости роста и заполнения всей агаровой поверхности в чашках Петри и в пробирках колониями стафилококков происходит на втором варианте среды, т.е. при разведении СПС в соотношении 1:1. Реакция среды устанавливается аммиаком до $7,7 \pm 0,2$, а автоклавирование производится при 1,0 атм. в течение 30 минут. Среда в стерильных условиях, в горячем виде разливается по пробиркам и в чашки Петри. Образование сплошного слоя культуры стафилококков происходило на 3-5 сутки на минеральной среде с агаром.

3.2. Разработка способа подавления посторонней микрофлоры при выделении чистой культуры стафилококков

Обработку суспензии из органов и тканей павших животных, смывов из доильных аппаратов проводили 1-3% растворами серной и уксусной кислот, перекиси водорода с лимонной кислотой в течение 30 и 60 минут. Кроме того, в исследованиях использовали суспензии из печени, селезенки, легких и лимфатических узлов павших животных (телят, поросят, птицы), гнойных ран, предварительно обсемененных кишечной палочкой, сальмонеллами, стрептококками, протеем и стафилококками из расчета 100-200 тысяч каждого вида микробов на 1 мл суспензии.

Нейтрализацию суспензии патологического материала после соответствующей обработки перекисью водорода с лимонной кислотой проводили 5,0% раствором аммиака до pH $7,7 \pm 0,5$.

Высевы из каждой пробы суспензии проводили в пять пробирок с жидкой и плотной СПС. Результаты исследований представлены в табл. 2.

Таблица 2

Результаты выделения стафилококков из суспензии патологического материала, обсемененными микроорганизмами.

№ п/п	Испытуемая концентрация компонентов	Микроорганизмы с концентрацией до 100 тыс/мл каждого вида				
		стафи- лококки	стреп- тококки	эшерихии	сальмо- неллы	протей
1	1,5% раствор перекиси водорода с 1,5% раствором лимонной кислоты	+	+	+	+	+
2	2,0% раствор перекиси водорода с 2,0% раствором лимонной кислоты	+	+	+	+	+
3	2,5% раствор перекиси водорода с 2,5% раствором лимонной кислоты	+	нет роста	нет роста	+	нет роста
4	3,0% раствор перекиси водорода с 3,0% раствором лимонной кислоты	+	нет роста	нет роста	нет роста	нет роста
5	2,5% раствор едкого натрия	нет роста	нет роста	нет роста	нет роста	нет роста
6	2,5% раствор серной кислоты	нет роста	нет роста	нет роста	нет роста	нет роста
7	2,5% раствор уксусной кислоты	слабый рост	слабый рост	нет роста	нет роста	нет роста

В результате исследований было установлено, что наиболее оптимальным средством, позволяющим подавлять постороннюю микрофлору до 100 тысяч микроорганизмов в 1 мл суспензии измельченной гомогенной массы патологического материала в течение 30-60 минут является смесь, состоящая из 3% раствора перекиси водорода с 3% раствором лимонной кислоты при последующей нейтрализации суспензии 5% раствором аммиака до pH 7,7±0,5.

Предлагаемый способ подавления посторонней микрофлоры при выделении чистой культуры стафилококков основан на реакции разложения перекиси водорода по следующей схеме: $H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$, а растворяющая способность лимонной кислоты для проникновения бактерицидных веществ внутрь микробной клетки. Полученные результаты согласуются с тем, что кишечная палочка, сальмонеллы, протей, стрептококки более чувствительны к дезвеществам, т.к. они относятся к 1-й группе, а стафилококки ко 2-й группе, к 3-й группе микобактерии туберкулеза, а образующие споры микроорганизмы к 4-й группе устойчивости.

3.3. Биологические свойства стафилококков, подвергнутых электромагнитному воздействию

Явление магнетизма известно давно, а свое название оно получило от города Магнитис в Малой Азии, где впервые были обнаружены залежи магнитного железняка – «камня притягивающего железа».

Магнетизм – всеобъемлющее, глобальное свойство природы – воды, почвы, живых организмов и они намагничиваются при введении в магнитное поле. При этом реакция клеток живого организма непрерывно меняется из-за изменения проницаемости клеточных мембран, определяющих гомеостаз живых систем.

Под воздействием электрического тока, космического пространства и особенно под влиянием солнечной активности происходят сильные изменения ГМП, получившие название магнитные бури. Особенно это проявляется в зоне железорудных залежей.

Установление влияния магнитного воздействия на биологические свойства стафилококков позволит лучше понять патогенез стафилококковых инфекций, освоить новые методы диагностики, прогнозирования и профилактики заболеваний и с этих позиций добиться более существенного прогресса в борьбе с ними.

Электромагнитное воздействие и излучение проводили с помощью электромагнитной мешалки и прибора ЭМИ КВЧ в отношении свежeweделенных и лабораторных культур стафилококков по следующей последовательности, представленной на рис. 3.

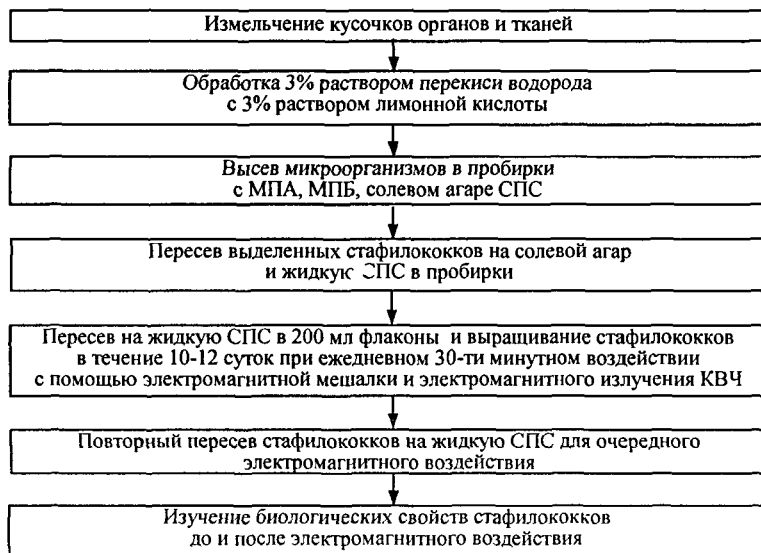


Рис. 3. Этапы выделения, выращивания и электромагнитного воздействия на стафилококки

3.3.1. Результаты определения гемолитической активности стафилококков и их токсинов

Показатель титра гемолитической активности характеризует патогенность стафилококковой культуры в частности в способности вырабатывать токсин различной силы. Для исследования использовали культуральную жидкость после выращивания стафилококков в 200 мл флаконах на СПС в течение 10-12 суток до $9,0 \pm 1,0$ миллиардной взвеси в 1 мл до и после электромагнитного облучения, и также обработанных 0,5% раствором формалина при 42°С в течение 12 суток.

Постановку реакции гемолиза эритроцитов кролика проводили в пробирках, в которые вносили по 2,5 мл суспензий стафилококков или культуральную жидкость с содержанием $0,86 \pm 0,04$ мг/мл белка-токсина без микроорганизмов и анатоксин, полученный детоксикацией с помощью 0,5% раствора формалина. Контролем служили стафилококки и их культуральная жидкость не подвергавшиеся электромагнитному воздействию. Суспензию стафилококков и образцы токсина и анатоксина использовали в разведении 1:400; 1:600; 1:800; 1:1000. В каждую пробирку вносили по 3-5 капель 2,5% взвеси эритроцитов кролика.

Содержимое пробирок после смешивания помещали в термостат на 1 час при 37°С. Учет реакции проводили по степени растворения (лизиса) эритроцитов и окраски в красный цвет содержимого пробирок.

Результаты определения гемолитической активности стафилококков и их токсинов представлены в табл. 3.

Таблица 3

Сравнительная оценка гемолитической активности стафилококков
и их токсинов

№ п/п	Наименование препарата и его разведения	% гемолиза
1	Суспензия стафилококков с токсинами без электромагнитного воздействия (контроль) 1:400 1:600 1:800 1:1000	 100 100 75 25
2	Суспензия стафилококков с токсинами после электромагнитного воздействия в процессе 12-ти дневного выращивания 1:400 1:600 1:800 1:1000	 100 100 100 50
3	Суспензия стафилококков с токсинами, выделенными из региона с повышенным геомагнитным полем (Железногорский район) 1:400 1:600 1:800 1:1000	 100 100 100 50
4	Суспензия стафилококков с токсинами после детоксикации 0,5% раствором формалина в течение 12 суток при 42°С 1:10 1:100	 Гемолиз эритроцитов отсутствует Гемолиз эритроцитов отсутствует

Сравнительная оценка полученных данных дает основание считать, что суспензия золотистых стафилококков и их токсины после гео- и электромагнитного воздействия проявляли повышенную на 25% гемолитическую активность в разведении 1:800 и полностью утратили эту способность после детоксикации 0,5% раствором формалина.

3.3.2. Влияние магнитных полей на чувствительность стафилококков к температуре, антибиотикам и дезвеществам

В качестве эпизоотологических маркеров стафилококков проводят изучение чувствительности к температуре, антибиотикам и дезвеществам в отношении определенных концентраций микроорганизмов.

При изучении электромагнитного воздействия на чувствительность стафилококков к температуре и антибиотикам использовали концентрацию микроорганизмов равной 1 млн/мл в жидкой СПС в объеме 10 мл при хранении при 20°C, 80°C и 100°C с периодическим высевом содержимого пробирок на свежую жидкую СПС и плотную с 2,5% агаром. Полученные результаты представлены в табл. 4.

Таблица 4

Результаты определения чувствительности стафилококков к температуре до и после электромагнитного воздействия

№ п/п	Характеристика региона, источник ЭМИ	Оптимальные сроки гибели (инактивации) в термостате стафилококков в пробирках с жидкой СПС с концентрацией 1 млн/мл		
		20°C	80°C	100°C
1	Железнорудный регион	180±10 суток	15±2 мин	8 мин
2	Электромагнитное излучение (ЭМИ КВЧ) на расстоянии 10 см от пробирки	180±10 суток	15±2 мин	8 мин
3	Электромагнитное воздействие с помощью электромагнитной мешалки	180±10 суток	15±2 мин	8 мин
4	До электромагнитного воздействия (контроль)	160±10 суток	12±2 мин	6,5 мин

Из полученных данных, представленных в таблице следует, что в целом геомагнитное излучение (ЭМИ) и электромагнитное воздействие с помощью электромагнитной мешалки повышает устойчивость стафилококков к температуре на 5-8% в сравнении с контролем.

Бактерицидное действие антибиотиков, хлорамина и фенола определяли путем периодического посева содержимого пробирок на жидкую СПС, МПБ и плотную агаровую среду. Результаты исследований представлены в табл. 5.

Из данных, представленных в табл. 5 следует, что золотистые стафилококки под влиянием гео- и электромагнитного воздействия проявили повышенную устойчивость к антибиотикам, хлорамину и фенолу, чем контрольные.

Таблица 5

Результаты определения чувствительности стафилококков к антибиотикам и дезсредствам до и после электромагнитного воздействия

№ п/п	Характеристика региона и источник ЭМИ	Бактерицидное действие на стафилококки в пробирках с жидкой СПС (1млн/мл)					
		Пенициллин, мкг/мл (ед)	Тетрациклин, мкг/мл (ед)	Гентамицин, мкг/мл	Линкоспектин, мкг/мл	Хлорамин, 1% раствор	Фенол, 3% раствор
1	Железорудный регион	100	80	70	70	10 мин	4,5 мин
2	Электромагнитное излучение КВЧ на расстоянии 10 см от пробирки	100	80	70	70	10 мин	4,5 мин
3	Электромагнитное воздействие с помощью электромагнитной мешалки	100	80	70	70	10 мин	4,5 мин
4	Нормальное геомагнитное поле	90	70	60	60	8 мин	3,5 мин

Последующий пересев стафилококков с антибиотиками и хлораминном и фенолом на свежую жидкую СПС и плотную с агаром не выявил роста микроорганизмов.

В результате исследований установлено, что стафилококки, выделенные из региона с повышенным геомагнитным полем или подвергнутые искусственному электромагнитному воздействию проявляли задержку роста в диаметре 15-20 мм и вокруг бумажного диска, пропитанного антибиотиком, т.е. проявили повышенную устойчивость на 7-10%.

В то же время стафилококки, выделенные от трупов животных, гнойных ран из региона с нормальным геомагнитным полем оказались менее чувствительными к антибиотикам, т.е они не давали роста вокруг бумажного диска, пропитанного антибиотиками на расстоянии 25 мм и более.

Из полученных данных следует, что воздействие гео- и искусственного электромагнитного поля на стафилококки вызывает у них повышенную устойчивость к антибиотикам, хлорамину, фенолу и температуре. Установленные результаты могут быть использованы в качестве эпизоотологических маркеров и в выборе средств лечения больных животных и проведения ветеринарно-санитарных мероприятий.

3.4. Материалы по получению стафилококковой анатоксин – вакцины

Несмотря на значительную эффективность антибиотиков специфические биологические препараты – анатоксины и иммуноглобулины

не утратили своего значения при профилактике и лечении болезней животных кокковой этиологии.

Основными факторами патогенности стафилококков являются микрокапсулы, компоненты клеточной стенки (тейхоевые кислоты), ферменты и токсины.

Полученные результаты по максимальному накоплению стафилококков на предложенной жидкой синтетической среде до $9,0 \pm 0,5$ млрд/мл при содержании до 0,86 мг/мл белка, являющейся основной субстанцией стафилококкового токсина были положены в основу изготовления анатоксин-вакцины путем детоксикации формалином токсина и других компонентов факторов патогенности.

При изготовлении анатоксин-вакцины исключалась фильтрация для отделения токсина от бактериальной массы через асбестовые пластины. Для восстановления исходной концентрации формалина до 0,4% из-за его связывания с аминогруппами проводили дополнительное внесение раствора формалина до 0,2% концентрации, а для подкожного введения анатоксин-вакцины проводили ее сорбцию на гидроксид (гидрате) алюминия из расчета 1-3 мг окиси алюминия на 1 мл препарата. Основные технологические этапы изготовления анатоксин-вакцины представлены на рис. 4.

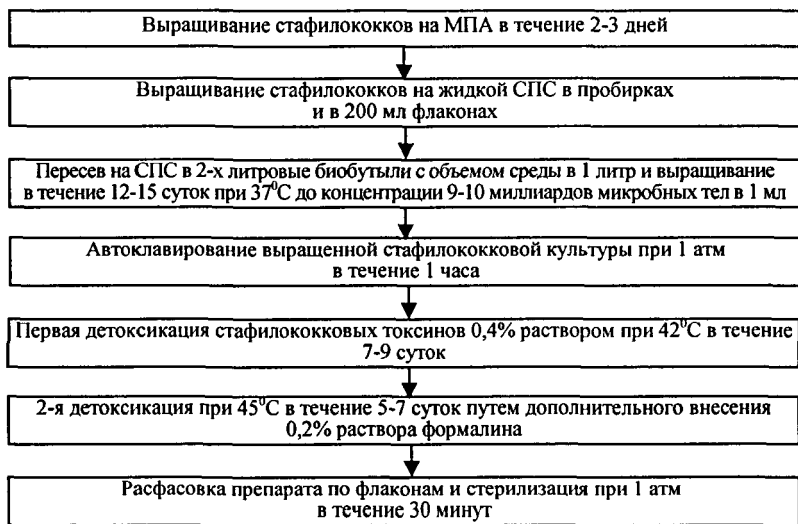


Рис. 4. Этапы получения стафилококковой анатоксин - вакцины

Предлагаемая оптимизированная технология изготовления стафилококковой анатоксин-вакцины легко осуществима и основана на общем принципе детоксикации токсинов 0,6-0,8% раствором формалина при получении анатоксинов.

3.5. Сравнительная эффективность лечения анатоксин–вакциной ожоговых ран у свиней

Стафилококковую анатоксин-вакцину с успехом применяли при лечении ожоговых ран у свиней, бронхопневмонии телят и поросят, стафилококкоза птиц путем аэрозольного распыления в птичнике, коров, больных маститом и дерматитов у собак.

Эффективность лечения свиней с ожоговыми некротическими ранами химической природы проводили с использованием примочек САВ, барсучьего жира с порошками антибиотиков. Ожог кожи в размере 7-10 см получали путем приложения нескольких слоев марли, смоченных 3-5% раствором фенола и 3-5% раствора едкого натрия и 10% раствора перекиси водорода в течение 2-3 минут к внешней стороне тазовой конечности.

Полученные результаты представлены в табл. 6. Из данных представленных в таблице следует, что эффективность лечения ожоговых ран химической природы у свиней с помощью САВ, повязок с барсучьим жиром без антибиотиков немного уступает применению повязок с барсучьим жиром с антибиотиками.

Таблица 6

Сравнительная эффективность лечения ожоговых ран у свиней с помощью САВ и барсучьего жира с антибиотиками

№ п/п	Способ и средство лечения	Характер и сроки заживления
1	САВ в виде примочек 2 раза в день	Грануляционная ткань появлялась на 7-10 день лечения и покрывала всю раневую поверхность к 27-30 дню
2	Барсучий жир без присыпки антибиотиков и стрептоцида	Грануляционная ткань появлялась на 10-12 день лечения и покрывала всю раневую поверхность к 27 дню
3	Барсучий жир с антибиотиками и стрептоцидом через день	Грануляционная ткань появлялась на 7-10 день лечения и покрывала всю раневую поверхность к 25 дню
4	САВ в смеси с диметилсульфоксидом в соотношении 1:1 - ежедневно	Грануляционная ткань появлялась на 7-9 день лечения и покрывала всю раневую поверхность к 23- 25 дням

Наиболее эффективным средством лечения ожоговых ран у свиней оказалось применение анатоксин – вакцины с диметилсульфоксидом в соотношении 1:1. Процесс заживления ран проявлялся на 2-3 дня раньше, чем при использовании барсучьего жира или отдельно диметилсульфоксида без анатоксин – вакцины.

3.4. Сравнительная эффективность анатоксин–вакцины при лечении коров, больных маститом

В исследованиях использовано 50 коров, больных катаральным и гнойно-катаральным маститом (от греч. *mastos* – грудь, сосок, воспаление молочной железы и *cattarthe* – воспаление слизистой оболочки, серозное истечение).

При бактериологическом исследовании молока коров были выделены культуры золотистого стафилококка – *S. aureus*. Для лечения использовали анатоксин – вакцину отдельно и в смеси с диметилсульфоксидом в соотношении 1:1. В качестве контрольного препарата был взят мастисан – А.

Таблица 7

Сравнительная оценка эффективности анатоксин–вакцины при лечении коров, больных маститом

№ п/п	Количество животных	Название препарата и способ лечения	Продолжительность лечения	Количество выздоровевших - животных	% выздоровления
1	10	Анатоксин-вакцина интрацистернально в сосок по 4-5 мл ежедневно в течение 5-6 дней	7-9	8	87,5
2	10	Анатоксин - вакцина в смеси с диметилсульфоксидом в соотношении 1:1	6-7	9	91,5
3	10	Мастисан –А ежедневно по 15 мл	9-11	6	62,5
4	10	Диметилсульфоксид в разведении 1:1 физраствором	9-10	6	60

Недостатком мастисана–А является содержание в его суспензии пенициллина и стрептомицина по 50000 ЕД, норсульфазола 0,35 г, масла подсолнечного 4,5 мл и эмульгатора (воск) – 0,05 г и соответственно необходимость ограничения использования молока после применения. Перед введением препаратов из вымени сдаивали молоко, сосок протирали 70% спиртом. Мастисан – А вводили интрацистернально по 15 мл, а анатоксин – вакцину по 4-5 мл.

Через 10 дней проводили контрольное исследование секрета вымени с мастидином и высевом на МПА, МПБ и солевой агар. Полученные результаты, представлены в табл. 7.

Из данных представленных в таблице следует, что САВ при лечении коров, больных катаральными и гнойно-катаральным маститом превосходит терапевтическую эффективность мастисана – А на 21%. При этом следует учитывать, что мастисан-А содержит антибиотики, которые выделяются с молоком в течение нескольких дней, особенно при подкожном применении в надвыменное пространство пораженной четверти вымени.

В то же время при применении САВ молоко можно использовать без ограничения. Более эффективным оказалось применение анатоксин - вакцины в смеси с диметилсульфоксидом в соотношении 1:1.

В последующем стафилококковая анатоксин-вакцина с успехом использована путем аэрозольного распыления из расчета 1,5 л на птичник для профилактики стафилококкоза птиц.

ВЫВОДЫ

1. Для выращивания стафилококков при получении анатоксин – вакцины и изучения биологических свойств разработана и апробирована жидкая синтетическая среда, содержащая в граммах на 1 л дистиллированной воды следующие ингредиенты: лимонной кислоты – 8,0; цитрата аммония – 4,0; аспарагина – 1,0; гликокола – 2,0; хлористого натрия – 7,0; сернокислого цинка – 0,2; сернокислого железа – 0,2; сернокислого магния – 0,4; фосфорнокислого калия 2-замещенного – 3,0; глицерина – 40 мл. Нейтрализация кислой реакции среды проводится 5-10% раствором аммиака до pH $7,7 \pm 0,2$, а автоклавирование при 1,0 атмосфере ($1,0 \pm 0,2 \times 10^5$ Па) в течение 30 минут. Питательная среда может быть приготовлена из предварительно смешанных ингредиентов в сухом виде.

2. Выращивание стафилококков в 2-х литровых биобутылях с объемом среды, равным 1 литру в течение 12-15 суток обеспечивает накопление микроорганизмов до $9,0 \pm 0,5$ млрд/мл.

3. Оперативное выделение стафилококков достигается на предположенной плотной агаровой среде путем разведения основного раствора синтетической среды дистиллированной водой в соотношении 1:1 и добавления 2,5% агара. Плотная агаровая среда на солевой основе СПС характеризуется постоянством состава в отличии от мясопептонного агара, зависящего от качества мясного бульона.

4. Обработка суспензии патологического материала 3% раствором перекиси водорода с 3% раствором лимонной кислоты в течение 30-40 минут с последующей нейтрализацией кислой среды 5% раствором аммиака обеспечивает подавление посторонней микрофлоры и рост стафилококков в первые 2-3 суток при высеве на агаровую среду с солевой основой синтетической питательной среды.

5. Электромагнитное воздействие по 30 мин. с помощью электромагнитной мешалки и ЭМИ КВЧ в течение 20-25 суток на свежeweделенные стафилококки в жидкой синтетической среде увеличивают их устойчивость на 10-15% к ряду антибиотиков, температуре и сохранность во внешней среде

6. Разработанный способ получения стафилококковой анатоксин – вакцины (САВ) включает выращивание стафилококков на жидкой синтетической питательной среде вместо гидролизатов мяса, рыбы или казеина и оптимальный режим детоксикации и инактивации 0,6% раствором формалина микроорганизмов и токсинов при $42-45^\circ\text{C}$ в течение 12-15 суток. При этом исключается отделение фильтрацией автоклавированных стафилококков от их экзо-и эндотоксинов и соответственно их возможную потерю из-за сорбции на фильтрующих асбестовых пластинах.

7. Повышение термо- и антибиотикоустойчивости и сохранности стафилококков после электромагнитного воздействия следует учитывать при выборе средств лечения заболеваний животных стафилококковой этиологии и разработке ветеринарно-санитарных мероприятий.

8. Стафилококковая анатоксин – вакцина отдельно и в смеси с диметилсульфоксидом в соотношении 1:1 при ежедневном орошении ускоряет заживление ожоговых ран и эффективна при лечении коров, больных катаральным и гнойно-катаральным маститом при ежедневном интрацестеральном введении в объеме 4-5 мл в каждый сосок в течение 5-6 суток.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Разработанная плотная элективная агаровая среда на солевой основе жидкой синтетической питательной среды с успехом может быть использована для экспресс-выделения стафилококков из патологического материала в сочетании с 3% раствором перекиси водорода и 3% раствором лимонной кислоты, необходимого для подавления роста посторонней микрофлоры.

2. Рекомендуем использовать жидкую синтетическую среду для выращивания стафилококков при изучении их биологических свойств и получения анатоксин – вакцины.

3. Установленное влияние магнитного воздействия на повышенную термо- и антибиотикоустойчивость, сохранность во внешней среде стафилококков необходимо использовать в качестве эпизоотологических маркеров в рамках комбинированной диагностической системы и при проведении лечебных и ветеринарно-санитарных мероприятий.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Евглевский, Д.А. Актуальные аспекты этиологии патогенеза, классификации и терапии пневмонии у животных / Д.А. Евглевский, И.Г. Швакова, А.В. Поздеев. Материалы XV международной научно-практической конференции и новые фармакологические средства в ветеринарии, посвященной 300-летию С-Петербурга. 2003, с. 65-66.

2. Евглевский, Д.А. Новые подходы в лечении и профилактике послеродовых эндометритов и маститов коров в сухостойный период. / В.В. Галкин, Н.В. Воробьева, Д.А. Евглевский // Материалы XV международной научно-практической конференции «Новые фармакологические средства в ветеринарии, посвященной 300-летию С. Петербурга. 2003 г.- С. 12-13.

3. Евглевский, Д.А. Научно-практические подходы получения имму-ноактивных препаратов при стафило-стрептококкозе плотоядных. / Д.А. Евглевский, И.Г. Швакова, А.В. Поздеев // Ветеринарная медицина. Международный межведомственный тематический збірник. Харьков - 2003, с. 225-227.

4. Евглевский, Д.А. Влияние состояния иммунной системы животных на формирование полирезистентных штаммов микроорганизмов. / Д.А. Евглевский, П.В. Калущий, А.В. Поздеев // Сборник научных трудов Курских вузов. Актуальные проблемы образования и медицины. Издательский центр. Курск, «ЮМЭКС», 2003 Г.-С.25-26.

5. Евглевский, Д.А. Современные подходы к отбору иммунопротективных штаммов стафилококков при изготовлении анатоксин-вакцины. / Д.А. Евглевский, Е.А. Тимкова, И.Г. Швакова.// Сборник научных трудов Курских вузов. Актуальные проблемы образования и медицины Курск: Издательский центр «ЮМЭКС», 2003 г.- С.23-25.

6. Евглевский, Д.А. Эффективность новых средств лечения коров, больных маститом. / Д.А. Евглевский, А.В. Поздеев // Сб.науч.тр.-Курск: Актуальные проблемы образования и медицины. Издательский центр «ЮМЭКС», 2003 г.- С.27-28.

7. Евглевский, Д.А., Поздеев, А.В., Швакова, И.Г. Актуальные проблемы этиологии патогенеза, профилактики и лечения пододерматитов у плотоядных. / Д.А. Евглевский, А.В. Поздеев, И.Г. Швакова. // Сб. науч. тр. Курских вузов. Курск: Актуальные проблемы образования и медицины. Издательский центр «ЮМЭКС», 2003 г.- С.28-30.

8. Результаты изучения факторов внешней среды на биологические свойства микроорганизмов. / А.Ю. Айдиев, Д.А. Евглевский, А.Н. Косилов // Современные проблемы ветеринарной медицины и животноводства. Сб. науч. тр. Издательство Курской ГСХА.-2006.- С. 6-8.

9. Евглевский, Д.А. Оптимизация, детоксикация и инактивация токсино-аллергенов./ Д.А. Евглевский, С.Н. Норец, О.Д. Печенин, Е.А.Тимова // Передовые технологии науки и образования. Сб. науч. тр., Курск- 2004 г.- С. 10-12.

10. Евглевский, Д.А. Получение и применение стафилококковых анатоксин-вакцин. / А.А. Евглевский, Д.А. Евглевский, В.В. Иванов.// Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 120-летию ветеринарной службы Курской области. Курск-2005г.-С.130-132.

11. Евглевский, Д.А. Научно-практические аспекты лечения и профилактики стафило-стрептококкозов у плотоядных // А.А. Евглевский, Д.А. Евглевский, В.В. Иванов. Там же С.122-123.

12. Евглевский, Д.А. Иммунопротективная активность анатоксинов / Д.А. Евглевский, В.М. Коломиец, Е.А. Тимова // Сб. научных трудов Курских вузов. Актуальные проблемы образования и медицины. Курск -2003, с. 26-27.

ИЗОБРЕТЕНИЕ

1. Пат. 2239422 Российская федерация, МПК 7 А 61. К 31/00, А 61 Р 31/00. Способ профилактики мастита. / Евглевский А.А., Воробьева Н.В., Евглевская Е.П., Евглевский Д.А.; Заявитель и патентообладатель Курская ГСХА. - №2003108277/13; заявл. 25.03.03.; опубл. 10.11.04. Бюл. №31 (1ч) – 5 с.: ил.

Формат 60×84 1/16 Бумага для множительных аппаратов
Печать на копировальном аппарате КГСХА.
Усл печ л 1,0 Уч -изд л 1,0 Тираж 100 экз