

Изобретение относится к отрасли ветеринарной микробиологии, а именно к питательным средам для выращивания микоплазм, и может быть использовано в ветеринарной медицине биотехнологии.

Известна питательная среда для выращивания микоплазм птиц, включающая в качестве основы белково-витаминный концентрат, сыворотку крови лошади в количестве 15-20% [Авт. св. № 704985, кл. С 12 К 1/06].

Разработана питательная среда для культивирования *Mycoplasma pneumoniae*, представляющая собой питательный бульон

на основе гидролизата β -глобулиновой фракции сыворотки крови человека и альбумина человека [Авт. св. № 560909, кл. С 12 К 1/06].

Недостатком известных питательных сред является недостаточная стандартность по биологически активным компонентам, наличие в их составе значительного количества белков, в том числе сывороточных, что затрудняет очистку микоплазменных антигенов от этих контаминантных белков, наличие которых сопряжено с появлением неспецифических иммунобиологических реакций при использовании целевого продукта.

Наиболее близкой по технической сущности к заявляемому объекту является питательная среда для выделения и культивирования микоплазм, содержащая триптиче-ский гидролизат говяжьего мяса, автолизат печени, автолизат пекарских дрожжей, натрий хлористый, пептон, глюкозу, сыворотку крови лошади, никотинамидадениннуклеотид [Методические рекомендации по диагностике, профилактике и лечению респираторных болезней птиц. Киприч В.В., Демченко А. В., Федотов Н.И., Шевченко П.Г.-Одесса, 1984.-50 с.].

Однако, в связи с тем, что эта питательная среда содержит в своем составе в качестве ростстимулирующего компонента 20% сыворотки крови лошади, представляется весьма сложным освободиться от сывороточных белков в процессе проведения в последующем процедуры очистки микоплазменных антигенов. При этом, имеющиеся сложности в элиминации контаминантных белков сопряжены со значительным снижением специфичности получаемых средств иммунопрофилактики и иммунодиагностики микоплазмозов.

Задачей предполагаемого изобретения является повышение специфичности получаемых микоплазменных диагностических биопрепаратов.

Поставленная задача достигается за счет того, что в качестве дополнительного компонента питательная среда содержит кровезаменяющий препарат "Геоссен" при следующем количественном соотношении компонентов, мас. %:

Автолизат печени	5-15
Дрожжевой экстракт	5-15
Сыворотка крови лошади	1-5
Геоссен	10-20
Глюкоза	0,5-1,0
Натрий хлористый	0,3-0,6
Натрий фосфорнокислый двузамещенный	0,5-1,0
Пептон ферментативный	0,5-1,0
Пенициллин	1000 ЕД/мл
Ферментативный гидролизат говяжьего мяса	Остальное

Существенным отличием предлагаемой питательной среды для культивирования микоплазм является введение дополнительно кровезаменителя "Геоссена", получаемого из видовонеспецифичной ткани оссеина, что обуславливает отсутствие антигенных свойств у данного препарата. По биохимическим свойствам "Геоссен" приближается к плазме крови и электрофоретически представляет собой гомогенный белок, имеющий подвижность в электрическом поле, аналогичную подвижности глобулинов сыворотки крови.

Предлагаемая нами питательная среда для культивирования микоплазм, с целью получения диагностикума, позволяет исключить неспецифические реакции, возникающие из-за наличия в питательной среде контаминантных белков сыворотки крови.

Питательную среду готовят следующим образом.

Пример 1. Для приготовления жидкой питательной среды триптический гидролизат говяжьего мяса разводили дистиллированной водой до содержания аминного азота 200 мг%, подогревали до температуры 40-60°C, добавляли 0,5% пептона ферментативного Винницкого мяскокомбината, доводили до кипения, прибавляли 0,3% хлористого натрия и кипятили 15 минут, после чего к бульону прибавляли 0,5% двухосновного фосфорнокислого натрия и варили еще 15 минут, после чего добавляли 10% кислотного автолизата печени. Затем питательную среду подщелачивали 20%-ным раствором едкого натрия до значения pH 8,0-8,2 и продолжали варку бульона в течение 30 минут. Затем бульон отстаивали в течение 15-30 минут и фильтровали через плотный ватно-марлевый фильтр.

Приготовленный бульон разливали в колбы и автоклавировали при 120°C в течение 30 минут. К остывшему до 40°C бульону прибавляли в асептичных условиях 10.% дрожжевого экстракта, 20% сыворотки крови лошади и 25%-ный раствор глюкозы до содержания сухого вещества 0,5%. Готовую среду расфасовывали в колбы или пробирки и проверяли на стерильность, помещая в термостат при 37°C на двое суток.

Для приготовления плотной питательной среды гидролизат разводили дистиллированной водой до содержания аминного азота 180-200мг%, прибавляли 0,5% пептона, 0,3% хлористого натрия, 0,5% двухосновного фосфорнокислого натрия, 1,5-2% агар-агара, 10% кислотного автолизата печени и подщелачивали 20%-ным раствором едкого натрия до значения pH 8,2-8,4. Агар варили в автоклаве при 120°C в течение 30 минут. После отстоя его фильтровали через плотный ватно-марлевый фильтр и разливали во флаконы. Агар стерилизовали автоклавированием при 120°C в течение 30 минут. К остывшей до 60°C питательной среде добавляли 10% дрожжевого экстракта, 20% сыворотки крови лошади и 25%-ный раствор глюкозы из расчета содержания 0,5% сухого вещества. Плотную питательную среду разливали в чашки Петри и пробирки и после застывания помещали в термостат при 37°C - на двое суток для проверки на

стерильность.

После этого к жидкой питательной среде добавляли 10% 24-часовой бульонной культуры референтного штамма *M.bovis*. Культивирование проводили в течение 4 суток при температуре 37°C. Интенсивность роста ми-коплазм определяли методом фотоэлектро-колориметрии посредством прибора ФЭК 56 ПМ (светофильтр сине-фиолетовый, длина волны света 420-440 нМ, кювета № 4). Контролем служили незасеянные питательные среды. Результаты учитывали через 24 часа, 48 часов, 72 часа, 96 часов.

На питательной среде вышеуказанного состава культивировали *M.bovis* для получения антигена. Полученную бактериальную массу в стерильных условиях суспендировали в небольшом объеме стерильного буферного физиологического раствора, содержащего мертиолят натрия в концентрации 1:8000, трижды промывали стерильным физиологическим раствором и доводили до густоты 20 млрд. микробных тел в 1 мл антигена по бруделлезному оптическому стандарту мутности.

Чистоту антигена *M.bovis* проверяли микроскопией мазков, окрашенных по методу Романовского-Гимзе и Граму. Активность и специфичность диагностикума проверяли в реакции агглютинации с микоплазменными и нормальными сыворотками, а также в реакции агглютинации с кроличьими антителами на нормальную лошадиную сыворотку крови.

Результат: по истечении 24 часов инкубации отмечена незначительная опалесценция, оптическая плотность составила 0,05 нМ, что соответствовало 200 млн. микробных тел в 1 мл, а на плотной питательной среде появился рост единичных колоний.

После 48 часов культивирования оптическая плотность составила 0,07 нМ, что соответствовало 230 млн. микробных тел в 1 мл, а при посеве на плотную питательную среду отмечался характерный рост нескольких десятков колоний.

Через 72 часа культивирования отмечена оптическая плотность 0,09 нМ, что соответствовало 260 млн. микробных тел в 1 мл, по истечении 96 часов инкубирования оптическая плотность достигла 0,12 нМ, т.е. 300 млн. микробных тел в 1 мл, а на плотной питательной среде по истечении того же срока появился характерный рост множества колоний.

Реакция агглютинации антигена *M.bovis*, полученного на питательной среде с добавлением 20% сыворотки крови лошади, к кроличьим антителам на нормальную сыворотку крови лошади, возникала в разведении сыворотки 1:16. Все поставленные при этом контроли были отрицательные.

Пример 2. Питательную среду готовят аналогично примеру № 1, за исключением того, что в состав питательной среды вводится кровезаменитель "Геоссен" в количестве 14%, сыворотка крови лошади 6%. Остальные компоненты находятся в следующем количественном соотношении: автолизат печени - 10%, дрожжевой экстракт - 10%, натрий хлористый - 0,3 %, натрий фосфорнокислый двузамещенный - 0,5%, пептон ферментативный - 0,5%, пенициллин -1000 ЕД/мл, ферментативный гидролизат говяжьего мяса - 57,7%.

Результат: по истечении 1-х суток инкубирования культуры микоплазма *bovis* оптическая плотность составила 0,04 нМ, что соответствует 180 млн. микробных тел в 1 мл. На плотной питательной среде рост отсутствовал.

Через 2-е суток инкубирования оптическая плотность составила 0,06 нМ, что соответствует 220 млн. микробных тел в 1 мл. На плотной питательной среде отмечен характерный рост отдельных колоний.

По истечении 3-х суток культивирования оптическая плотность составила 0,07 нМ, что соответствовало 230 млн микробных тел в 1 мл. При посеве на плотную питательную среду отмечен характерный рост множества колоний.

На 4-е сутки культивирования оптическая плотность составила 0,09 нМ, что соответствовало 260 млн. микробных тел в 1 мл. На плотной питательной среде отмечен сплошной рост колоний характерный для микоплазм.

При постановке реакции агглютинации антигена *M.bovis*, полученного на питательной среде с добавлением 14% кровезаменителя и 6% сыворотки крови лошади, к кроличьим антителам на нормальную лошадиную сыворотку, реакция агглютинации возникала в разведении сыворотки 1:2-1:4. Все поставленные контроли были отрицательные.

Пример 3. Среду готовят аналогично примеру № 1, за исключением того, что количество кровезаменителя составляет 16%, сыворотки крови лошади - 4%. Остальные компоненты находятся в количественном соотношении, как в примере № 1.

Результат: по истечении 24 часов культивирования отмечается незначительная опалесценция, оптическая плотность составляла 0,05 нМ, что соответствует 200 млн. микробных тел в 1 мл. На плотной питательной среде рост отсутствует.

После 48 часов культивирования оптическая плотность составила 0,1 нМ, что соответствовало 270 млн. микробных тел в 1 мл. На плотной питательной среде отмечен множественный рост характерных колоний.

По истечении 4-х суток культивирования оптическая плотность равнялась 0,13 нМ, что соответствовало 290 млн. микробных тел в 1 мл.

При постановке реакции агглютинации антигена *M.bovis*., полученного на питательной среде с добавлением 16% кровезаменителя и 4% сыворотки крови лошади, к кроличьим антителам на нормальную лошадиную сыворотку, реакция агглютинации возникала в разведении сыворотки 1:4. Контроль реакции был отрицательный.

Пример 4. Питательную среду готовят аналогично примеру № 1, за исключением того, что количество кровезаменителя составляет 18%, сыворотки крови лошади -2%. Остальные компоненты находятся в следующем количественном соотношении: автолизат печени - 10%, дрожжевой экстракт - 10%, натрий хлористый - 0,3%, натрий фосфорнокислый двузамещенный - 0,5%, пептон - 0,5%, пенициллин - 1000 ЕД/мл, ферментативный гидролизат говяжьего мяса-57,7%.

Результат: по истечении 1-х суток инкубирования культуры *M.bovis* оптическая плотность составила 0,05 нМ, что соответствовало 200 млн. микробных тел в 1 мл. На плотной питательной среде рост отсутствовал.

Через 2-е суток культивирования оптическая плотность составила 0,08 нМ, что соответствовало 250 млн. микробных тел в 1 мл. На плотной питательной среде отмечен рост единичных колоний.

После 3-х суток культивирования оптическая плотность составила 0,10 нМ, что соответствовало 270 млн. микробных тел в 1 мл. На плотной питательной среде отмечен характерный рост множества колоний.

После 4-х суток культивирования оптическая плотность среды составила 0,12 нМ, что соответствовало 300 млн. микробных тел в 1 мл. На плотной питательной среде определяется характерный рост множества колоний.

При постановке реакции агглютинации антигена *M.bovis*, полученного на питательной среде с добавлением 18% кровезаменителя и 2% сыворотки крови лошади, к кроличьим антителам на лошадиную сыворотку крови, реакция агглютинации не определялась ни в одном разведении сыворотки. Поставленные контроли были отрицательные.

Существующие методы диагностики микоплазмоза - клинический, патологоанатомический, гистологический и бактериологический - весьма сложны, трудоемки и длительны. Для проведения быстрой диагностики данного заболевания особое практическое значение представляют серологические методы. Применение сывороточной фракции крови животных, как компонента питательных сред при культивировании микоплазм, вызывает появление неспецифических реакций при серологической диагностике микоплазмоза.

Используя кровезаменитель "Геоссен" в качестве добавки к питательной среде, при выращивании микоплазм с целью получения диагностикума и при испытании его в РА с кроличьими сыворотками, содержащими антитела к сыворотке крови лошади, установлено, что неспецифические реакции агглютинации возникают в разведениях 1:16 при выращивании культур микоплазм на питательной среде с содержанием 20% сыворотки крови лошади. Антигены, полученные на питательной среде с добавлением 5% сыворотки крови лошади и 15% кровезаменителя при иммунизации кроликов, не вызывали выработку у них агглютинирующих антител к белкам сыворотки крови лошади или титр этих антител не превышал уровня 1:2-1:4.

Антигены, полученные на питательной среде с добавлением 2% сыворотки крови лошади и 18% кровезаменителя "Геоссена", у иммунизированных кроликов не вызывали выработку антител к белкам сыворотки крови лошади.

Снижением содержания сыворотки крови лошади и использованием кровезаменителя "Геоссена" в питательной среде при культивировании микоплазм с целью получения антигена, можно избежать возникновения неспецифических ложно-положительных реакций, основной причиной которых является появление антител на белковые компоненты сыворотки крови лошади, входящей в состав существующей питательной среды.

Предлагаемая питательная среда для культивирования микоплазм содержит минимальное количество сыворотки крови животных (1-5%) при добавлении 15-18% кровезаменителя "Геоссена", белок которого не обладает антигенными и токсическими свойствами и в электрическом поле имеет подвижность, аналогичную подвижности глобулинов сыворотки крови.

Сопоставимый анализ с прототипом позволяет сделать вывод, что заявляемая питательная среда отличается от известного

прототипа отсутствием антигенных белков сыворотки крови животных, вызывающих неспецифические реакции, что соответствует критерию "новизна".

Таким образом, использование питательной среды предлагаемой прописи при культивировании микоплазм позволяет исключить неспецифические ложно-положительные реакции, в то время как использование с этой целью известной среды (прототип), вызывает появление неспецифических реакций на сывороточные компоненты питательной среды и этим значительно затрудняет серологическую диагностику этого заболевания.

Предлагаемая питательная среда предназначена для культивирования микоплазм и может быть использована в научных и производственных учреждениях ветеринарной медицины с целью получения диагностикума.