

Ученые записки УО ВГАВМ, том 44, выпуск 2

2-ой группе 49,7 г, что больше на 13,3%, в 3-ей – 46,3 г, больше на 5,5%, в 4-ой 53,8 г, больше на 22,7%, чем в контрольной.

С возрастом отмечалось усиление гемопоэза, достоверно увеличивалось количество эритроцитов и уровень гемоглобина у цыплят-бройлеров, получавших про- и пребиотик одновременно.

Заключение. Следовательно, про- и пребиотики при совместном применении оказывают выраженное ростостимулирующее действие, способствуют высокой сохранности молодняка, снижению заболеваемости, увеличению прироста массы, повышают показатели общей и местной защиты, стимулируют гемопоэз и обменные процессы в наиболее напряженные периоды выращивания птицы.

При раздельном применении про- и пребиотиков эти показатели были несколько ниже, но достоверно выше, чем у цыплят контрольной группы.

Литература. Алямкин, Ю.Л. Пробиотики вместо антибиотиков – это реально / Ю.Л. Алямкин // *Птицеводство*. – 2005. – №2. – С.17 – 18. Аманов, Н.О. Микробиологическая экология кишечника и ее изменение под влиянием иммунодепрессантов / Н.О. Аманов, Ф.Ю. Гариб, Я.А. Умаров // *Антибиотики и химиотерапия*. – 1989. – Т.34, № 8. – С.453. Андреева, Н.Л. Разработка фармакологических средств и методов, повышающих продуктивность птиц : автореф. дис. ... д-ра биол. наук: 03.00.04, 16.00.04 / Н.Л. Андреева ; Санкт-Петербургский ветеринарный институт. – СПб., 1992. – 36 с. Антипов, В.А. Использование пробиотиков в животноводстве / В.А. Антипов // *Ветеринария*. – 1991. – №4. – С.55 – 58. Антипов, В.А. Использование пробиотиков в животноводстве / В.А. Антипов // *Ветеринария*. – 1991. – №4. – С.55 – 58. Антипова, Л.В. Применение молочнокислых бактерий при производстве мясных изделий из мяса птицы / Л.В. Антипова, А.Я. Гизатов, О.Р. Антошкина // *Современные проблемы устойчивого развития агропромышленного комплекса России : материалы 2 Всероссийской дистанционной научно-практической конференции студентов, аспирантов и молодых ученых, пос. Персиановский, 2004. – Персиановский, 2004. – С. 177 – 178.* Артюхова, С.И. Значение нормальной микрофлоры желудочно-кишечного тракта / С.И. Артюхова, А.В. Лашин // *Межеузковский сб. науч. тр. / Омский государственный аграрный университет. – Омск, 2004. – С. 21 – 24.* Артюхова, С.И. Использование пробиотиков в питании животных и птиц / С.И. Артюхова, А.В. Лашин // *Межеузковский сб. науч. тр. / Омский государственный аграрный университет. – Омск, 2004. – С. 25 – 31.* Бабина, М.П. Иммунная реактивность цыплят-бройлеров в онтогенезе и ее коррекция микробными препаратами / М.П. Бабина. – Витебск, 2002. – 114 с. Бабина, М.П. Иммунная реактивность цыплят-бройлеров в онтогенезе, разработка средств для ее коррекции и профилактики кишечных болезней и гиповитаминозов : автореф. дис. ... докт. вет. наук : 16.00.01. / М.П. Бабина ; ВГАВМ. – Витебск, 2003. – 40 с.

УДК 619:616.98:579.843.95:615.371:636.4

РЕЖИМЫ ИНАКТИВАЦИИ И СООТНОШЕНИЕ КОМПОНЕНТОВ ПРИ ИЗГОТОВЛЕНИИ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ПАСТЕРЕЛЛЕЗА СВИНЕЙ

Вербицкий А.А., Гвоздев С.Н.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины, г. Витебск, Республика Беларусь, 210026

В статье идет речь о разработке схемы инактивации возбудителя для изготовления инактивированной вакцины, а также о выборе соотношения антигена и адьюванта.

The article features the data on an inactivation scheme for the agent of porcine pasteurellosis, development of a killed vaccine and ratio of the antigen and adjuvant.

Введение. Пастереллез относится к числу наиболее широко распространенных инфекционных заболеваний животных, регистрируемых во многих странах мира. Экономический ущерб, наносимый этим заболеванием, складывается из потерь от падежа, вынужденного убоя больных животных и затрат на проведение профилактических и оздоровительных мероприятий [5]. Инфекционная природа болезни была установлена в конце XIX века.

В семейство, к которому относится возбудитель, входит три рода. Род *Pasteurella* включает 15 видов, два из которых: *P. multocida* и *P. haemolytica* являются возбудителями пастереллезозов животных. У свиней ведущее место в этиологии развития пастереллеза отводится *P. multocida*. Все штаммы *P. multocida*, циркулирующие в природе, подразделяются на 5 серогрупп (классификация Carter - Heddleston) по капсольному антигену, которые обозначаются латинскими буквами А, В, D, Е и F. При этом серовары В и Е вызывают острое течение болезни (геморрагическую септицемию), а серовары А и D – затяжное течение (инфекционную анемию). Серовариант F в этиологии пастереллеза свиней не имеет существенного значения.

Одним из основных звеньев в системе мер борьбы с пастереллезами является иммунопрофилактика [1,2,3,4]. В настоящее время для борьбы с данным заболеванием применяют как живые, так и инактивированные вакцины. Причем используют как поливалентные, так и моновалентные препараты. Однако, несмотря на обилие биопрепаратов, проблема заболевания свиней пастереллезом остается актуальной и по настоящее время.

В настоящее время все большее применение получают инактивированные вакцины, которые не обладают остаточной реактогенностью и вирулентностью. Известны также недостатки инактивированных вакцин, к главным из них относят высокую реактогенность масел и низкую иммуногенность, которая обусловлена разрушением клеточных структур возбудителя, отвечающих за формирование иммунного ответа у макроорганизма. С этой целью ученые ведут исследования по снижению реактогенности масел, а также разрабатывают новые способы инактивации возбудителя, которые позволяют получать более высококачественную биомассу антигена.

В мировой ветеринарной практике широкое распространение для приготовления инактивированных вакцин получили адьюванты фирмы Seppic [1,6,7,8,9,10].

Ученые записки УО ВГАВМ, том 44, выпуск 2

Исходя из вышеперечисленного, изготовление инактивированной вакцины против пастереллеза свиней, отвечающей всем требованиям, является актуальной. Кроме того, необходимость в изготовлении отечественного препарата обусловлена также программой государства по импортозамещению.

Изучение вышеперечисленных вопросов позволит изготовить полноценный препарат отечественного производства, не уступающий в качестве мировым аналогам.

Цель работы – отработка схемы инаktivации пастерелл и приготовление новой серии вакцины против пастереллеза свиней с адьювантом ISA 206 и изучение ее свойств.

Материалы и методика исследований. Для приготовления инаktivированной вакцины против пастереллеза свиней в качестве антигенной фракции (водной фазы) были использованы штаммы *P. multocida* серовариантов А, В и D. В качестве эмульсионной основы (масляной фазы) использован французский адьювант производства фирмы Seppic ISA 206. Для проверки стерильности образцов вакцины использовали МПА, МПБ, среда Сабуро и Кита-Тароцци. Для выращивания первоначальной биомассы антигена использовали сывороточный МПА.

Первоначально, мы отработали схему инаktivации суточных культур *P. multocida*, которые будут использоваться в качестве антигена для приготовления вакцины. С этой целью мы вносили инаktivант, в качестве которого выступил формалин, в концентрациях 0,25%, 0,5%, 1%, 2% и 4% в пробирки с пастереллой (по 4 пробирки на каждую концентрацию). Концентрация микробных клеток в каждой пробирке составляла 10 млрд.м.к./мл. Концентрацию устанавливали по стандарту мутности. Пробирки поместили в термостат и выдержали 24 часа. При этом через 1, 2, 3, 6, 12 и 24 часа экспозиции из пробирок отбирали по 0,1 мл образца и делали посев на сывороточный МПА. Результат инаktivации учитывали через 48 часов инкубирования в термостате при 37°C.

Затем нами была получена вакцина, в состав которой в качестве масляной фазы был использован адьювант ISA 206, а в качестве антигена использовали штаммы *P. multocida* серовариантов А, В и D в соотношении 1:1:1. При этом общее количество микробных клеток в 1 мл препарата составила 7,5 млрд. (по 2,5 млрд.м.к. каждого сероварианта). Нарращивание биомассы провели на сывороточном МПА. После суточной инкубации при 37°C в условиях термостата делали смыв культур и по стандарту мутности доводили концентрацию микробных клеток до 2,5 млрд в 1 мл. суспензии.

Кроме того, при изготовлении вакцины нами были учтены несколько параметров. Эти параметры учитываются исходя из нормативно-технической документации фирмы Seppic по отношению к адьюванту. Для приготовления бактериальной вакцины с адьювантом ISA 206 существует ряд позиций, соблюдение которых позволяет добиться получения стабильной однородной эмульсии. Тип получаемой эмульсии вода/масло/вода. С этой целью для получения вакцины 2 фазы нагревали до температуры 30°C и смешивали при 2500 об/мин в течение 10 минут. В результате была получена однородная эмульсия, физические и иммунологические свойства которой в дальнейшем и проверили.

В ранее проведенных исследованиях, когда сравнивались реактогенность и иммуногенность опытных образцов вакцин с различными адьювантами (ISA 70, ISA 206 и продукт 139) на белых мышах, нами было установлено, что наименьшей реактогенностью и в то же время наибольшей иммуногенностью обладает вакцина с адьювантом ISA 206.

В данном опыте для производства вакцины мы использовали ISA 206, но на этот раз мы взяли различные соотношения антигена и масла – 50:50, 40:60 и проверили физические свойства полученных образцов, а также реактогенность, иммуногенность, стерильность и безвредность.

Из физических свойств проверили: стабильность, легкость шприцевания, гранулометрию (размер частиц и распределение), а также тип эмульсии (тест каплей).

Стабильность полученных образцов определяли при двух температурных режимах – при 20 и 37°C. При этом стабильной эмульсия считалась, если не происходило разделение фаз. Однако допускалось незначительное расслоение эмульсии с образованием беловатой фазы сверху и голубоватого цвета внизу.

Легкость шприцевания проверил при помощи 10 мл шприца с инъекционной иглой и грузика. При этом шприц с 10 мл вакцины зафиксировали в штативе. На поршень поместили грузик весом в 100 г и замерили время выпуска эмульсии из шприца под давлением груза.

Размер частиц и их распределение изучили под микроскопом при увеличении 1x1600. С этой целью произвели подсчет количества клеток в камере Горяева в малом квадрате и посмотрели равномерность их распределения. Зная размеры квадрата, вычислили средний размер частиц.

При определении типа эмульсии в мерный стакан налили 50 мл дистиллированной и добавили каплю вакцины.

Реактогенность вакцины, в которой масло с антигеном было в соотношении 50:50, проверили по методу Гарцета в модификации Е.В Гусевой и А.И. Дудникова. Для этого сформировали 2 группы животных (по 5 мышей в каждой). Одну группу животных после введения им 0,05 мл препарата в пяточную поверхность задней лапки через 24 часа после введения усыпили. Вторую группу животных, которым препарат вводили в то же место и в том же количестве, усыпили на 10 сутки с момента введения. Вторая задняя лапка, в которую вакцину не вводили, служила контролем. После усыпления хлороформом лапки отрезали на уровне скакательного сустава. Затем брали общие пробы – пять опытных и пять контрольных лапок – и взвешивали. Реактогенность учитывали по разнице в весе лапок. Такие манипуляции были проведены с мышами всех групп.

Реактогенность образца вакцины, в которой соотношение антигена к маслу было соответственно 40:60 нами была проверена в предыдущих опытах [1]. Ее и брали за эталон.

Иммунную активность препаратов проверили на лабораторных животных. В качестве последних использовали белых мышей массой 18-20 г. С этой целью сформировали 5 групп мышей по 10 животных в каждой. Животных первой группы иммунизировали подкожно в дозе 0,025 мл вакцины на животное. Мышей второй, третьей и четвертой групп иммунизировали соответственно в дозах 0,05; 0,1 и 0,2 мл подкожно. Пятая группа мышей служила контролем. Животным этой группы вводили изотонический раствор натрия хлорида. Затем за

Ученые записки УО ВГАВМ, том 44, выпуск 2

мышьями вели наблюдение. Через 21 день после вакцинации животных всех групп подвергли экспериментальному заражению.

Для заражения в качестве антигена использовали суточную культуру пастерелл, выращенную на глюкозо-сывороточном агаре. Суспензию, содержащую в 1 мл 100 тыс. микробных клеток, вводили подкожно мышам в дозе 0,2 мл. Затем в течение 2-ух недель за мышьями велось наблюдение. Трупы павших животных подвергли вскрытию. Из внутренних органов делали посеы и мазки отпечатки.

Таким образом, мы проверили образец вакцину, соотношение компонентов в которой было 50:50.

Иммуногенность вакцины, в которой соотношение антигена к маслу было 40:60, проверили в ранее проведенных опытах и брали показатели за эталон [1].

Стерильность полученных препаратов проверяли путем посева на МПА, МПБ, среду Сабуро и Кита-Тароцци.

Безвредность определили на белых мышьях путем подкожного введения им вакцин в дозе 0,5 мл на животное.

Результаты исследований и их обсуждение. При определении концентрации формалина, которая инактивирует 100% пастерелл, были получены следующие результаты, которые можно наблюдать в таблице 1.

Как видно из таблицы 1, концентрация 0,25% формалина дает полную инактивацию пастерелл лишь при экспозиции 12 часов. Экспозиция в такой концентрации в течение 1 часа предотвращает рост пастерелл лишь в половине проб – в двух из четырех. Дальнейшая экспозиция в 3 часа вызывает инактивацию трех из четырех проб. В то же время концентрация формалина 0,5% предотвращает рост бактерий на агаре при экспозиции в 1 час. И при увеличении экспозиции и концентрации рост на агаре не наблюдается.

На следующем этапе были изготовлены две серии вакцины, отличающиеся соотношением антигена и масла соответственно 50:50 и 40:60. С образцами был проведен ряд исследований, в результате которых были получены следующие результаты.

Таблица 1. Влияние концентрации формалина на продолжительность инактивации *P. multocida*

Концентрация формалина (%)	Продолжительность инактивации (час)					
	1	2	3	6	12	24
0,25	++-	++-	+--	+--	----	----
0,5	----	----	----	----	----	----
1,0	----	----	----	----	----	----
2,0	----	----	----	----	----	----
4,0	----	----	----	----	----	----

Примечание: «+» - наличие роста

«-» - отсутствие роста на агаре.

При определении стабильности обе вакцины при 20°C оставались стабильными в течение 6 месяцев, а при 37°C в течение 1 недели. При этом происходило незначительное расслоение, не имевшее критического значения. При интенсивном встряхивании у двух образцов наблюдалось восстановление до однородной эмульсии. Значительных различий не наблюдалось.

При определении легкости шприцевания оба образца показали время соответственно 9 и 10 сек. ($P > 0,05$). Причем незначительное преимущество было за образцом, в котором соотношение антигена к маслу было 40:60.

Размер получившихся частиц не имел значительных отличий и лежал в пределах 10 – 12 мкм. У обоих образцов эмульсия была гомогенна с равномерным распределением капелек одинакового размера.

Тест каплей показал, что полученная эмульсия соответствует типу вода/масло/вода, так как при нанесении на воду капли эмульсии часть ее осталась на поверхности в виде белого круга, а вторая часть распределилась в воде.

При определении реактогенности у образца с соотношением антигена с маслом 40:60 (образец 1) были получены следующие результаты. Через 24 часа после введения препарата, разность в лапках, в которые вводили препарат (реактогенные), к лапкам, в которые препарат не вводили (контрольные) составила 0,7346 г, а на 10 суток – 0,4341 г. У образца вакцины, у которого соотношение антигена и адьюванта было 50:50 (образец 2) разность составила соответственно 0,6548г (через 24 часа) и 0,3984 г (через 10 суток с момента введения). Снижение реактогенности, вероятно, обусловлено меньшей долей адьюванта.

Результаты определения иммунной активности можно наблюдать из следующей таблицы 2.

Как видно из таблицы, образец 1 и образец 2 дают 100% сохранность животных (белых мышей) в дозах 0,1 и 0,2 мл/животное. Применение вакцин в меньших дозах не обеспечивает полной сохранности мышей как у образца 1, так и у образца 2. Образец 1 в дозах 0,025 и 0,05 мл/животное обеспечил сохранность лишь 50% и 60% животных соответственно. В то же время образец 2 обеспечил сохранность 60% и 80% животных.

Таблица 2. Процент выживания белых мышей в зависимости от дозы вакцины

Вакцины	Доза (мл/животное)			
	0,025	0,05	0,1	0,2
Образец 1	50	60	100	100
Образец 2	60	80	100	100

При определении стерильности двух образцов путем посева на МПА, МПБ, среду Сабуро и Кита-Тароцци, рост на последних отсутствовал. Это свидетельствует о стерильности обоих образцов вакцины.

После подкожного введения белым мышам образцов вакцин в дозе 0,5 мл на животное все мышки на протяжении опыта оставались живы. Это свидетельствует о безвредности полученных образцов.

В результате проведенных исследований было установлено, что образец 1 – вакцина, в которой соотношение антигена с адьювантом было 40:60, ни чем не отличалась от образца 2 (соотношение компонентов 50:50) по стабильности, размеру получившихся частиц и однородности их распределения. Оба образца представляли собой эмульсию типа вода/масло/вода, и были безвредны и стерильны. В то же время образец 1 незначительно уступил по легкости шприцевания образцу 2.

Что касается реактогенности, то образец 1 обладал большей реактогенностью, чем образец 2. Причем эта разница была при исследовании через 24 часа в 1,12 раза больше (на 10,86%). При исследовании на 10 сутки реактогенность первого образца превышала реактогенность второго уже в 1,09 раза, или на 8,22%.

При определении иммуногенности оба образца обеспечили 100% сохранность животных только начиная с дозы 0,1 мл/животное, в то время как при введении в дозах 0,025 и 0,05 мл/животное сохранность составила для образца 1 соответственно – 50% и 60%, а для образца 2 – 60% и 80%.

Заключение. В результате проведенных исследований было установлено, что для инактивации пастерелл следует использовать формалин в концентрации 0,5% при экспозиции в 1 час.

При изготовлении вакцины необходимо применять соотношение антигена к адьюванту 50:50, так как полученная вакцина не уступает по всем параметрам вакцине, в которой соотношение компонентов соответственно 40:60. При этом полученная вакцина обладает меньшей реактогенностью и большей иммуногенностью. Одним из основных условий получения однородной стабильной эмульсии является подогревание водной и масляной фаз до температуры 30°C ($\pm 1^\circ\text{C}$).

Список использованной литературы. 1. Вербицкий, А.А. Влияние адьювантов на реактогенность и иммуногенность вакцины против пастереллеза свиней / А.А. Вербицкий, С.Н. Гвоздев // Проблемы зооинженерії та ветеринарної медицини: збірник наукових праць / ХДЗВА. – Харків, 2008. – Вып. 16, ч. 2, т. 3. – С. 80 – 86. 2. Иммуногенность вакцин против пастереллеза свиней / Р.В. Душук [и др.] // Ветеринария. – 1997. - №10. – С. 18 – 20. 3. Профилактика пастереллеза сельскохозяйственных животных на современном этапе / Н.Н. Андросик, Ю.Г. Лях // Весці акадэміі аграрных навук Рэспублікі Беларусь. – 2000. – №4. – С. 62 – 64. 4. Совершенствование специфической профилактики пастереллеза / В.Е. Заерко, В.И. Ситков, И.К. Тутов // Ветеринария. – 2000. – №6. – С. 20 – 22. 5. Эпизоотическая ситуация и прогноз по пастереллезу свиней в Республике Беларусь / Ю.Г. Лях // Ветеринарная патология. – 2003. – №1. – С. 137 – 139. 6. Assessment of the new set of adjuvant for infectious atrophic rhinitis / A. Laval, [et al] // Proceedings of the 15th IPVS congress, Birmingham, England, 5-9 July. – Birmingham, 1998. – P. 20 – 23. 7. Aucouturier, J. Efficiency and safety of new adjuvants / J. Aucouturier, V. Ganne, A. Laval // Ann N Y Acad Sci. – 2000. – Vol. 9. – P. 4 – 6. 8. Efficiency and safety of new adjuvant substances for Pasteurella multocida inactivated exotoxins containing vaccines / A. Laval [et al] // Proceeding of the 14th I.P.V.S. Congress, Bologna, Italy, 7-10 July. – Bologna, 1996. – P. 16 – 18. 9. Ganne, V. New generation of oil adjuvants for animal vaccines / V. Ganne, A. Laval, Ph. De La Faire // Proceedings - 13th International Pig Veterinary Society Congress, Bangkok, Thailand, 26-30 June. – Bangkok, 1994. – P. 261. 10. Probing of the experimental model for the new adjuvants efficacy / A. Laval, [et al] // Proceedings of the 15th IPVS congress, Birmingham, England, 5-9 July. – Birmingham, 1998. – P. 23 – 25.

УДК 619:616.579.841.94:636.4

ЗАБОЛЕВАЕМОСТЬ СВИНЕЙ ПНЕВМОНИЯМИ И РОЛЬ БОРДЕТЕЛЛ ПРИ ИХ ВОЗНИКНОВЕНИИ

Вербицкий А.А., Стомма С.С.

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

В статье изложены данные об изучение эпизоотической ситуации по болезням органов дыхания в хозяйствах Республики Беларусь и этиологическая роль бордетелл в заболевании свиней пневмониями.

The article features the epizootological data on respiratory diseases in domestic farms and etiological role of bordetellae in swine respiratory pathology.

Введение. Удовлетворение потребности населения продуктами животного происхождения, а промышленности сырьём возможно лишь в случае интенсивного ведения животноводства. Одной из наиболее рентабельных отраслей животноводства является свиноводство. Производство свинины играет значительную роль в обеспечении населения мясными продуктами. Перевод свиноводства на промышленную основу наряду с интенсификацией производства свинины, принес с собой ряд неизвестных или ранее редко встречавшихся заболеваний.

Проблема респираторных заболеваний молодняка сельскохозяйственных животных за последние годы приобрела особую актуальность. Данные литературы [7] и результаты собственных исследований свидетельствуют, что респираторную патологию поросят провоцируют:

неблагоприятные условия микроклимата (избыток влаги, пыли, аммиака, сероводорода, углекислоты, высокая или низкая температура);

повышенный микробный фон окружающей среды, что приводит к снижению общей неспецифической резистентности и местной устойчивости органов дыхания;

дисбаланс питательных веществ в рационах, несоблюдение (нарушение) разработанного полноценного сбалансированного питания, чаще всего это: дефицит в рационе белка, углеводов, липидов и особенно витаминов, макро- и микроэлементов;

большая концентрация животных на ограниченных производственных площадях, постоянное скученное стойловое содержание, отсутствие активного моциона, ультрафиолетового облучения;

нарушение технологии комплектования специализированных ферм (комплексов), заключающееся в уве-