

живых вакцин вопрос ставится в иной плоскости. В живых вакцинах гарантией безопасности является стабильность вакцинного штамма. В этой связи, кроме проверки безвредности препаратов на лабораторных животных, проверяют еще идентичность и стабильность вакцинного штамма. Критериями определения идентичности и стабильности являются иммуногенность, серологическая принадлежность, типичность роста на питательных средах бактерий, из которых приготовлена вакцина.

Иммуногенность вакцин оценивают путем прямого заражения вакцинированных животных (острый опыт) или косвенно, определяя высоту титра антител в сыворотке крови подопытных животных. Практически это осуществляют следующим образом. Лабораторных животных (не менее 10) вакцинируют испытуемой вакциной и через определенный промежуток времени (обычно 14-18 суток) заражают 2-3 ЛД<sub>50</sub> вирулентного штамма специфического возбудителя. В качестве контрольных служат животные, не получавшие препарат, которых заражают одновременно с иммунизированными. Препарат считают иммуногенным в случае выживания не менее 80% вакцинированных животных и гибели не менее 80% в контрольной группе.

Считают, что контроль вакцины в остром опыте является довольно объективным и позволяет достоверно судить о ее иммуногенной активности.

При контроле некоторых вакцин допускают выпуск их для практического применения по высоте титра антител в сыворотке крови иммунизированных животных, но при гарантированной корреляции титра антител с уровнем иммунной защиты (выраженным в ИД<sub>50</sub>) статистическая достоверность которого подтверждена экспериментальным материалом.

В настоящее время применяют для определения иммуногенности вакцин качественный и количественный методы контроля. Принципиальная суть качественного метода состоит в том, что одну группу животных иммунизируют вакциной, а другую оставляют неиммунизированной, а затем животных обеих групп подвер-

Поступила 7.02.2005 г.

УДК 619:616.98:579.842.14:615.373

## **РАЦИОНАЛИЗАЦИЯ ПРОИЗВОДСТВА ГИПЕРИММУННОЙ СЫВОРОТКИ ПРОТИВ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА ЖИВОТНЫХ**

Медведев А.П., доктор ветеринарных наук, профессор <sup>1)</sup>

Даровских С.В., врач ветеринарной медицины <sup>1)</sup>

Юдашин А.М., врач ветеринарной медицины <sup>2)</sup>

<sup>1)</sup> УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины»

<sup>2)</sup> Витебская биофабрика

Сальмонеллез – инфекционная болезнь животных и человека, вызываемая разнооб-

разными серовариантами бактерий рода *Salmonella*. Об иммуногенности вакцины судят по выживаемости иммунизированных животных и гибели контрольных. Такой метод позволяет сделать относительное заключение об активности вакцины.

Более объективным и достоверным является количественный метод контроля активности вакцин. Суть его состоит в использовании большого количества лабораторных животных, иммунизированных различными дозами вакцины, и в расчете результатов выживания и гибели животных после их заражения, в контрольной и опытной группах с помощью математических методов. Количественный метод контроля позволяет выразить иммуногенность вакцин в ИД<sub>50</sub>, т.е. в определенных цифровых значениях.

Кроме биологических методов контроля вакцин, к которым можно отнести проверку на стерильность, безвредность и активность, определенное значение при оценке качества препаратов имеют физико-химические методы исследования. К ним относят визуальный метод определения макровида препарата, методы определения растворимости, массовой доли влаги и кислорода в лиофилизированных препаратах, определение значения концентрации водородных ионов в жидких препаратах и другие. Физико-химическое состояние вакцин имеет немаловажное значение при оценке их качества. Например, отклонение в величине pH вакцины в кислую или же в щелочную сторону, может оказать отрицательное влияние на иммуногенность препарата. Пониженное содержание адьюванта снижает активность вакцин, а повышенное содержание его вызывает острый воспалительный процесс, который ведет к различного рода поствакцинальным осложнениям.

Поэтому качество вакцин необходимо оценивать комплексно с учетом результатов проверки их на стерильность, безвредность, активность и анализа данных физико-химического контроля.

разными серовариантами бактерий рода *Salmonella*.

Сальмонеллез распространен практически во всех странах мира. В Республике Беларусь эта болезнь по широте распространенности и частоте регистрируемости занимает второе место после колибактериоза.

В настоящее время известно более 2500 серовариантов сальмонелл, и Международный сальмонеллезный центр регистрирует ежегодно по 10-20 новых серовариантов (Н.Г. Ожерельева 1999 г.; Н.В. Железняк, 2003 г.).

Большинство сальмонелл опасны как для животных, так и человека. Поэтому борьба с данным заболеванием представляет собой весьма важную не только ветеринарную, но и медицинскую проблему.

В комплексе мероприятий по профилактике и ликвидации болезни используют антиоксигенную поливалентную сыворотку против сальмонеллеза телят, поросят, ягнят, овец и птиц. Однако необходимо отметить, что производство сыворотки сложный, трудоемкий и длительный процесс. Особенно трудоемкими и длительными являются гипериммунизация волов и последующий режим их эксплуатации.

Поэтому нами была поставлена цель – оптимизировать схему гипериммунизации и режим эксплуатации волов-производителей сыворотки против сальмонеллеза животных.

В опытах использовали волов массой 380-400 кг, подобранных по принципу аналогов. В ходе экспериментов от животных брали кровь, получали сыворотку и исследовали ее агглютинирующую и превентивную активность.

Агглютинирующую активность сыворотки определяли в пробирочной реакции агглютинации (РА), которую ставили общепринятым в лабораторной практике методом. Реакцию оценивали в плюсах по степени просветления жидкости и выраженности агглютината. Титром сыворотки считали ее разведение, в котором реакция была оценена не менее чем на два плюса.

Превентивную активность сыворотки определяли в отношении *S. cholerae suis* на взрослых голубях, а *S. dublin*, *S. typhimurium*, *S. abortus ovis* – на белых мышах массой 18-20 гр. Сыворотку голубям вводили внутримышечно в дозах: 0,5; 0,1; 0,025; 0,004 и 0,0008 см<sup>3</sup>, используя на дозу не менее пяти особей. Мышам сыворотку инъецировали подкожно в дозах: 0,1; 0,02; 0,004; 0,0008 и 0,00016 см<sup>3</sup>, используя на дозу 5-10 животных. Заражение голубей проводили внутримышечно, мышей – внутрибрюшинно 3-5 ЛД<sub>50</sub> сальмонелл определенного серотипа через 2-3 часа после введения сыворотки. Контролем служили животные, не получавшие сыворотки, которых заражали одновременно с пассивно иммунизированными.

Учет результатов испытания активности сыворотки производили в течение 7 дней после гибели контрольных животных. Величину 50%-ной иммунизирующей дозы сыворотки (ИД<sub>50</sub>) для голубей и мышей рассчитывали по

формуле Кербера в модификации Ашмарина (1962).

Содержание в крови волов гемоглобина, эритроцитов и скорость их оседания определяли общепринятыми в гематологии методами.

В цепи технологического процесса изготовления сыворотки важным звеном является гипериммунизация волов. На биофабриках бывшего СССР животных гипериммунизировали по схеме, предложенной Малявиным А.Г. еще в начале 50-ых годов, путем подкожного введения формолантигена в нарастающих дозах от 25 до 500 см<sup>3</sup>. Всего производили 19 инъекций антигена с интервалом 3-4 дня.

Первое рабочее кровозъятие проводили через 8-10 дней после последней инъекции антигена, через 2-3 дня антиген инъецировали в половинной дозе (200-250 см<sup>3</sup>), спустя 2-ое суток вводили полную дозу антигена из расчета 1см<sup>3</sup> на 1 кг массы вола и на 8-10-ый день производителей подвергали очередному кровозъятию и т.д.

Разработанная Малявиным А.Г. схема гипериммунизации имела ряд недостатков. Иммунизация длилась 98 дней, что задерживало перевод волов в производители. Большие дозы антигена усложняли его инъекцию и зачастую приводили к образованию абсцессов. Животные болезненно реагировали на введенный им антиген.

Поэтому мы поставили перед собой задачу разработать более рациональную схему гипериммунизации волов и режим их эксплуатации. Работу начали с изучения влияния различных способов введения антигена на активность получаемой от волов сыворотки. Мы установили, что наиболее быстрое и интенсивное нарастание титра агглютининов и уровня превентивной активности вызывал антиген при внутривенном введении. Менее интенсивный иммунный ответ у гипериммунизируемых волов наблюдали при внутрибрюшинном введении антигена. Однако при внутривенных инъекциях волы реагировали на антиген полной потерей аппетита, угнетением, повышением температуры тела и т.д. После 2-3 - кратного внутривенного введения антиген вызывал у 20-30% животных шоковое состояние. Напротив, при внутрибрюшинных инъекциях волы значительно легче реагировали на антиген. У животных наблюдали незначительное угнетение, повышение температуры тела на 0,2-0,3 °С, шоковая реакция отсутствовала. Кроме этого, внутрибрюшинный метод введения отличается доступностью и простотой.

Поэтому в дальнейшем опытная работа была сосредоточена на подборе таких доз антигена, которые обеспечивали бы при внутрибрюшинном его введении максимальное накопление антител в сыворотке крови волов при минимальном отрицательном воздействии инъекций на общее состояние животных.

В результате многочисленных экспериментов мы разработали схему гипериммунизации волов, предусматривающую 10 внутрибрюшинных инъекций антигена в нарастающих дозах от 4 до 20 см<sup>3</sup> с интервалом 4-5 суток. Концентрация антигена составляет 10 млрд. микробных тел в см<sup>3</sup>.

При внутрибрюшинном способе инъекций антигена в процесс иммуногенеза больше вовлекаются центральные органы иммунной системы, а при подкожном – периферические. Учитывая это, мы провели работу, направленную на оптимизацию режима эксплуатации волов-продуцентов сыворотки против сальмонеллеза животных.

В опыт было взято 30 волов массой 380-400 кг, подобранных по принципу аналогов, которых гипериммунизировали по предложенной нами схеме. Затем животных разделили на две группы по 15 голов в каждой.

Волов первой группы эксплуатировали следующим образом. После очередного крововзятия спустя 3-4 дня животным вводили внутрибрюшинно антиген в дозе 20 см<sup>3</sup> на голову и через 7-8 дней проводили взятие крови, а затем на 3-4 сутки снова инъецировали антиген и т.д.

Волам второй группы после крововзятия на 3-4 сутки вводили внутрибрюшинно антиген в дозе 20 см<sup>3</sup> на голову и через 7-8 дней проводили взятие крови, а затем на 3-4 сутки снова инъецировали антиген, но уже подкожно в дозе 0,3 см<sup>3</sup> на 1 кг массы. Спустя 7-8 дней производили очередное крововзятие, после которого антиген вводили внутрибрюшинно, и так далее, т.е. режим эксплуатации животных второй группы отличается чередованием способов введения антигена и величиной его дозы при подкожном введении.

Полученную через 6, 12 и 18 месяцев с начала периода эксплуатации сыворотку от продуцентов обеих групп исследовали на предмет агглютинирующей и превентивной активности.

Результаты исследований приведены в таблицах 1 и 2.

Из таблицы 1 видно, что уровень агглютининов в сыворотке, полученной от волов 1-ой группы, по мере увеличения срока эксплуатации повышается. Такая же закономерность установлена в отношении титра антител сыворотки, полученной от продуцентов 2-ой группы, т.е. разрешающая способность иммунологической памяти нарастает, поэтому очередные инъекции антигена обеспечивают получение сыворотки с более высоким титром агглютининов, чем в начале эксплуатации.

Из таблицы видно, что сыворотка полученная от продуцентов 2-ой группы, примерно в два раза активнее, чем от волов 1-ой группы.

Это свидетельствует о том, что антиген при внутрибрюшинном введении в большей степени вовлекает в процесс иммуногенеза центральные органы иммунной системы, а ее периферические органы несут относительно меньшую антигенную нагрузку, позволяющую им восстанавливать свои потенциальные возможности. И наоборот, при подкожном введении более интенсивное раздражение и функциональную нагрузку испытывают периферические органы иммунной системы, в то время как ее центральные органы в меньшей степени подвержены антигенному воздействию.

Режим эксплуатации продуцентов сыворотки против сальмонеллеза животных предусматривает не только иммунизацию волов, но и не менее двух раз в месяц взятие от них крови из расчета 16 см<sup>3</sup> на 1 кг массы, т.е. разовое взятие крови не превышает 1,6% от общей массы их тела.

По нашему мнению, эта норма взятия крови не полностью исчерпывает физиологические возможности организма. Надо отметить, что содержание крови у крупного рогатого скота составляет в среднем 8% от массы животного. К тому же предложенный нами щадящий режим иммунизации в некоторой степени избавляет организм продуцентов от напряженных функциональных нагрузок, что позволяет увеличить норму взятия крови.

Для подтверждения этого мы провели опыт, в котором использовали две группы волов, по 10 голов в каждой.

У продуцентов первой группы кровь брали из расчета 16 см<sup>3</sup>, а у второй - 17 см<sup>3</sup> на 1 кг массы животного. Продуцентов обеих групп эксплуатировали в течение пяти лет. В процессе эксплуатации оценивали общее состояние здоровья волов, проводили необходимые диагностические и лечебные мероприятия. Из практики производства сыворотки на Витебской биофабрике известно, что эксплуатация продуцентов более 5 лет ведет к повышению температуры тела, исхуданию, слабости, отекам, анемии и т.д. Длительная эксплуатация животных в первую очередь нарушает работу их кроветворных органов, что проявляется снижением содержания эритроцитов и гемоглобина в крови, повышением СОЭ (С.П. Карпов, С.М. Прегер, Г.Е. Синельников, Ю.В. Федоров, 1976).

Таблица 1

**Агглютинирующая активность сыворотки от опытных волов**

№№ групп	Сальмонеллы	Титр агглютининов через месяцев		
		6	12	18
1	S.cholaerae suis	400±000	655±42	840±336
	S.dublin	600±252	533±50	833±504
	S.typhimurium	535±84	660±42	800±000
	S.abortus ovis	533±42	530±35	835±125
2	S.cholaerae suis	800±125	1066±256	1736±601
	S.dublin	800±24	900±125	1600±000
	S.typhimurium	900±25	1066±115	1335±125
	S.abortus ovis	800±000	1012±256	1066±115

Таблица 2

**Превентивная активность сыворотки от продуцентов опытных групп**

№№ групп	Сальмонеллы	ИД <sub>50</sub> сыворотки (см <sup>3</sup> ) для белых мышей через (месяцев)		
		6	12	18
1	S.cholaerae suis	0,008±0,001	0,008±0,001	0,009±0,001
	S.dublin	0,007±0,002	0,008±0,002	0,010±0,002
	S.typhimurium	0,009±0,001	0,008±0,001	0,008±0,001
	S.abortus ovis	0,010±0,002	0,009±0,002	0,007±0,001
2	S.cholaerae suis	0,004±0,001	0,004±0,001	0,003±0,000
	S.dublin	0,002±0,000	0,003±0,001	0,004±0,001
	S.typhimurium	0,004±0,001	0,004±0,001	0,005±0,002
	S.abortus ovis	0,005±0,001	0,004±0,000	0,003±0,001

Примечание: в отношении S.cholaerae suis активность сыворотки определяли для голубей.

Поэтому мы определяли содержание гемоглобина и эритроцитов в крови волов, а также СОЭ в течение пяти лет с начала эксплуатации животных. В результате было установлено, что эти показатели в течение четырех лет эксплуатации оставались без существенных изменений. Общее состояние здоровья продуцентов обеих групп за данный период эксплуатации можно охарактеризовать, как удовлетворительное. Животные имели хороший аппетит, были средней упитанности и прибавили в весе в среднем 71±8 кг на голову.

Через пять лет эксплуатации нами было зарегистрировано снижение содержания эритроцитов, гемоглобина и повышение СОЭ в крови у продуцентов обеих групп. Так, содержание эритроцитов снизилось у волов 1-ой группы с 7,2±0,4 до 5,2±0,7·10<sup>12</sup>/л, гемоглобина - с 85±0,06 до 71±0,04 г/л, СОЭ значительно возросла и составила 1,7±0,06 против 1,1±0,1 мм/час. Примерно такими же данными характеризуются показатели крови у продуцентов 2-ой группы.

Необходимо отметить, что через 5 лет эксплуатации у 80% волов в обеих группах появились признаки изношенности их организма, проявляющиеся в слабости животных, повышении температуры тела на 0,8-1,0°С, которая не снижалась до физиологической нормы в течение 3-4 суток, образованием отеков и постепенным снижением массы тела.

Поступила 7.02.2005 г.

Таким образом, результаты опытной работы позволили нам предложить для практики более совершенную схему гипериммунизации волов и более рациональный способ эксплуатации продуцентов сыворотки, заключающийся в следующем. По окончании цикла гипериммунизации волов на 7-8 сутки от них берут кровь из расчета 17 см<sup>3</sup> на 1 кг массы, после на 3-4 сутки волам внутрибрюшинно вводят антиген в дозе 20 см<sup>3</sup> на голову и на 7-8 сутки берут кровь. Затем через 3-4 суток вводят антиген подкожно в дозе 0,3 см<sup>3</sup> на 1 кг массы продуцента. На 7-8 сутки проводят очередное взятие крови, а затем на 3-4 сутки антиген вводят внутрибрюшинно в дозе 20 см<sup>3</sup> на животное и т.д.

Разработанный и предложенный нами цикл гипериммунизации и режим эксплуатации волов-продуцентов сыворотки против сальмонеллеза животных позволяет получать качественный коммерческий препарат для животноводства Республики с меньшими затратами труда, времени и средств, чем по ранее существующей технологии.

**Литература.** 1. Ашмарин И.А., Воробьев А.А. Статистические методы в микробиологии.- Л.: Медгиз, 1962.- 180 с. 2. Железняк Н.В. Палочки грамотрицательные неспорообразующие// Медицинская микробиология.- Витебск, 2002.- 176-227 с. 3. Гипериммунные сыворотки/ С.П. Карлов, С.М. Прегер, Г.Е. Синельников, Ю.В. Федоров.- Томск, 1976.- 378 с. 4. Микробиология и иммунология.- М., 1999.- 289-318 с.