

УДК 619:579.843.95:615.371

ПОВЫШЕНИЕ ИММУНОГЕННОСТИ ВАКЦИН ПРОТИВ ПАСТЕРЕЛЛЁЗА ЖИВОТНЫХ**Медведев А.П., Вербицкий А.А., Корочкин Р.Б., Даровских С.В.**

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

В статье приведены результаты испытания углеводородных масел в качестве адъювантов, повышающих иммуногенность противопастереллёзных вакцин.

The article present the test results of hydrocarbon oils as aides that enhance the immunogenicity of antibacterienne vaccines.

Ключевые слова: бактерии, пастереллы, адъюванты, масла, иммуногенность, реактогенность, вакцины.

Keywords: bacteria, pasterellaceae, adjuvants, oil, immunogenecity, reactivity, vaccines.

Введение. Пастереллёз – контагиозная инфекционная болезнь домашних и диких животных, характеризующаяся при остром течении признаками септицемии, крупозным воспалением легких, плевритом, а при хроническом течении - гнойно-некротической пневмонией, артритом, маститом, кератоконъюнктивитом, эндометритом и иногда энтеритом [3, 5, 6].

В Республике Беларусь свиноводство является сравнительно рентабельной отраслью животноводства, что объясняется высокой репродуктивной способностью свиней и интенсивностью их роста. Однако, ведение свиноводства на промышленной основе, концентратный тип кормления, гиподинамия, стрессы, нарушение ветеринарно-зоотехнических условий содержания животных способствует возникновению различных инфекционных болезней, в том числе и пастереллёза [5, 6, 7]. По широте распространенности и частоте регистрации в хозяйствах республики пастереллёз занимает третье место после колибактериоза и сальмонеллёза. Возбудителями болезни являются пастереллы, насчитывающие пять серогрупп по капсульному и 16 серотипов по соматическому антигену [5]. Чаще всего инфекцию у животных вызывают пастереллы серогрупп А, В, D, различающиеся между собой капсульным антигеном. Он состоит из белка и полисахаридов, присущ бактериям, образующим на мясопептонном агаре колонии S-типа. Потеря пастереллами капсул не вызывает заметного изменения их жизнедеятельности, но сопровождается снижением патогенности и иммуногенности бактерий. Это необходимо учитывать при получении вакцин против пастереллёза.

Пастереллёз наносит значительный экономический ущерб хозяйствам вследствие гибели животных, снижения продуктивности, вынужденного их убоя, затрат на проведение лечебно-профилактических и оздоровительных мероприятий [5, 6, 7, 8].

В системе мер борьбы по профилактике и ликвидации пастереллёза ведущую роль отводят применению специфических средств защиты. Известно, что биопромышленность России производит для нужд животноводства 15 вакцин против пастереллёза и 3 гипериммунные сыворотки. В Республике Беларусь ОАО «Белветуниверфарм» выпускает вакцину полужидкую гидроокисьалюминиевую против пастереллёза крупного рогатого скота, вакцину ассоциированную поливалентную против сальмонеллёза, пастереллёза и стрептококкоза свиней, сыворотку против пастереллёза крупного рогатого скота, овец и свиней.

Однако применение вакцин зачастую оказывается малоэффективным, что вынуждает изыскивать средства и методы, повышающие их иммуногенную активность. Одним из путей усиления иммуногенеза является применение адъювантов. По нашему мнению, представляется целесообразным использовать адъюванты совместно с низкоиммуногенными антигенами, к которым относятся некоторые вирусные и бактериальные антигены, а также – пастереллёзные.

Многие авторы считают, что эмульгированные вакцины (с добавлением в качестве адъюванта масла) превосходят по эффективности большинство применяемых противопастереллёзных препаратов [1, 2, 3, 4]. В то же время недостатками эмульгированных вакцин является их повышенная вязкость, затрудняющая введение препаратов, и довольно частое образование стерильных абсцессов в месте инъекции.

Целью работы являлось приготовление противопастереллёзных вакцин с различными адъювантами и определение их реактогенности и иммуногенности.

Материалы и методы исследований. Для получения вакцин использовали производственные штаммы 796 и 877. Бактерии высевали в МПБ и выращивали в термостате при 37-38°C в течение 24 часов. Выращенную бульонную культуру засеивали по методу Дригальского в чашки Петри на поверхность МПА с целью получения изолированных колоний. Чашки помещали в термостат и вели культивирование бактерий при 37-38°C в течение 18–20 часов. Выращенную на поверхности агара культуру просматривали в проходящем свете и отбирали колонии S-типа. Из этих колоний производили посев пастерелл в МПБ во флаконах и проводили культивирование бактерий на шуттель-аппарате в течение 20 часов. Концентрацию

микроорганизмов в среде определяли фотометрическим методом. Морфологию бактерий изучали путем световой микроскопии препаратов-мазков, окрашенных по Граму. Наличие капсул у пастерелл выявляли по методу Ольта. Культуральные свойства определяли по характеру роста бактерий в жидких питательных средах и на поверхности агара. Биохимические свойства определяли с использованием сред Гисса. Подвижность пастерелл устанавливали методом посева их уколом в полужидкий агар.

Вирулентность микробных культур определяли для белых мышей по величине ЛД₅₀. Культуры пастерелл, предназначенные для получения вакцин, инактивировали формалином.

В качестве адъювантов использовали углеводородные масла, гидроокись алюминия. Вязкость масел определяли на вискозиметре, реактогенность – на белых мышках массой 17–18 г, морских свинок – 230–250 г и кроликах массой 2,7–3 кг. Испытуемые масла вводили мышам подкожно в дозе 0,1 см³, а морским свинкам и кроликам – внутримышечно в дозах, соответственно, 1 и 2 см³. Через 14 суток животных подвергали эвтаназии и учитывали макроскопические изменения в месте инъекции масла.

Для изготовления эмульгированных вакцин применяли лабораторный гомогенизатор. Препараты проверяли на стабильность. Для этого их центрифугировали 30 минут при 3000 об/мин и хранили при температуре 37°C в течение 14 суток. Препараты признавались стабильными в случае отсутствия расслоения эмульсии.

Противопастереллезные вакцины готовили из расчета содержания в 1 см³ препарата 10 млрд бактерий. Нами были приготовлены нижеследующие опытные образцы вакцин, которые выдержали испытание на стабильность и стерильность.

Вакцина № 1 содержала 40% смеси синтетического и медицинского масел в равном соотношении, 2% безводного ланолина и 58% антигена.

Вакцина № 2 содержала 46% синтетического масла, 2% эмульгатора и 52% антигена.

Вакцина № 3 содержала 26% ангорского масла, 4% эмульгатора и 70% антигена.

Вакцина № 4 представляла собой смесь равных объемов синтетического масла и антигена.

В состав вакцины № 5 входили 70% антигена и 30% гидроокиси алюминия.

Приготовленные вакцины проверяли на стерильность по общепринятой методике, т.е. путем посева на питательные среды и выдерживали их в термостате на протяжении 10 суток.

Иммуногенность препаратов определяли на кроликах. Для этого каждой вакциной вакцинировали внутримышечно 6 кроликов в дозе 2 см³. Кроликов предварительно проверяли на пастереллоносительство, используя пробу с бриллиантовой зеленью, а также на наличие антител в сыворотке крови к корпускулярному и капсульному антигенам пастерелл путем постановки серологических реакций (РА и РНГА).

В опытах были задействованы животные отрицательно реагирующие на бриллиантовую зелень и не имеющие специфических антител в сыворотке крови.

Спустя 30 суток после вакцинации животных опытных и контрольных групп заражали заранее подтитрованной дозой (5 ЛД₅₀) культуры *P. multocida* штамма 796. Павших животных вскрывали, из крови делали препараты-мазки и высевы на питательные среды. За оставшимися в живых кроликами вели наблюдение в течение 10 дней, а затем их убивали и проводили вскрытие.

Результаты исследований. Для приготовления вакцин сухие штаммы *P. multocida* 796 и 877 были реактивированы в мясопептонном бульоне и высеяны по Дригальскому на поверхность плотной питательной среды (МПА). Из колоний S-типа была выращена бульонная культура пастерелл. С морфологической точки зрения, бактерии представляли собой граммотрицательные палочки или коккопалочки, располагающиеся в поле зрения микроскопа одиночно, попарно, короткими цепочками. Пастереллы расщепляли глюкозу, сахарозу, декстрозу, фруктозу, маннозу, галактозу, образовывали индол и сероводород. Бактерии ферментировали маннит и сорбит, не вызывали разложения салицина, дульцита, глицерина, инсулина.

В МПБ пастереллы росли, вызывая равномерное помутнение среды с образованием незначительного слизистого осадка на дне пробирки. На МПА бактерии формировали мелкие, выпуклые, прозрачные, круглой формы колонии, слегка флуоресцирующие в коспроходящем свете. В полужидком агаре при посеве уколом пастереллы росли в виде серо-белого стержня по уколу, т.е. были неподвижными.

В первых генерациях культур при окрашивании их по Ольту капсула у микробов обнаруживалась, а при последующих пересевах – утрачивалась.

Величина 50%-ной летальной дозы для белых мышей составила 200 микробных клеток. Культуры пастерелл при добавлении к ним 40% раствора формальдегида в конечной концентрации 34% инактивировались в течение 3–4 суток.

При определении вязкости масел (ангорское, медицинское, синтетическое) установлено, что наиболее приемлемым по вязкости является синтетическое масло, ангорское и медицинское превышают его по вязкости в 3–4 раза. Высокой реактогенностью для белых мышей обладали ангорское и медицинское масла. В месте введения эти масла вызывали развитие гнойного воспаления окружающих тканей. Реактогенность синтетического масла была вполне умеренной, т.е. наблюдалась незначительная воспалительная реакция.

Для кроликов ангорское и медицинское масла обладали чрезмерной реактогенностью. В тканях в месте инъекции этих масел формировались гроздевидные стерильные абсцессы

величиной с грецкий орех. Синтетическое масло вызывало воспалительную реакцию без образования абсцессов, признаки которой исчезали в течение 5–7 дней.

У морских свинок в месте инъекции ангорского и медицинского масел, также как и у кроликов образовывались стерильные плотные абсцессы величиной с голубиное яйцо, напротив, синтетическое масло обладало умеренной реактогенностью.

Нетрудно заметить, что при изучении реактогенности масел наблюдается корреляция результатов, полученных на белых мышах, морских свинках и кроликах.

Сравнительное изучение реактогенности вышеуказанных масел на лабораторных животных позволяет утверждать, что сильное раздражение тканей вызывает ангорское и медицинское масло, а умеренную воспалительную реакцию – синтетическое масло.

Однако, несмотря на эти данные, мы решили ввести в состав вакцин ангарское, медицинское и, естественно, синтетическое масло, т.к. в смеси с антигеном может измениться их реактогенность и адъювантное действие заметно усилить иммуногенность препаратов.

Результаты определения иммуногенности вакцин в остром опыте оказались следующими. Вакцина № 1, содержащаяся в качестве адъюванта 40% смеси синтетического и медицинского масел, защитила от падежа 5 кроликов из 6 иммунизированных.

Однако результаты вскрытия свидетельствовали о значительной реактогенности этой вакцины, т.к. в мышцах кроликов обнаружены абсцессы величиной до грецкого ореха с толстыми стенками, заполненные желтым гноем.

Вакцина № 2, содержащая синтетическое масло, защитила от гибели всех иммунизированных кроликов. В месте введения вакцины в мышце бедра кроликов было отмечено незначительное увеличение жировой клетчатки саловидной консистенции, что является показателем низкой реактогенности этого препарата.

Вакцина № 3, содержащая ангорское масло в количестве 26%, предотвратила гибель всех иммунизированных кроликов. При вскрытии животных в месте инъекции обнаружены 2 абсцесса величиной до куриного яйца с прочными стенками, заполненные тягучим желтым гноем, что свидетельствует о высокой реактогенности биопрепарата.

Вакцина № 4, представляющая собой смесь равных количеств синтетического масла и антигена, защитила от гибели всех животных. При вскрытии у 2 из 6 кроликов в месте инъекции вакцины обнаружены мелкие абсцессы размером с лесной орех. Абсцессы имели дряблые стенки и содержали гной сметанообразной консистенции желтого цвета, что указывает на значительную степень реактогенности этой вакцины.

Вакцина № 5, в состав которой входили 70% антигена и 30% гидроокиси алюминия, защитила от гибели 4 из 6 вакцинированных кроликов. При вскрытии животных отмечали наличие небольших, размером с горошину, образований однородной консистенции, саловидной на разрезе. Эти данные являются показателем низкой реактогенности вакцины.

При вскрытии кроликов, павших в результате контрольного заражения, мы наблюдали патологоанатомические изменения, характерные для геморрагической септицемии. При высевах крови из сердца удалось выделить культуру вирулентного штамма *P. multocida*, которая по своим тинкториально-морфологическим, культуральным и биохимическим свойствам соответствовала указанному виду пастерелл.

Заключение. Изучение реактогенности масляных адъювантов на лабораторных животных позволяет заключить, что наибольшей реактогенностью обладают ангорское и медицинское масло, в умеренной – синтетическое, что позволяет рекомендовать его в качестве адъюванта при конструировании противопастерелллезных вакцин.

Результаты испытания иммуногенности вакцин в остром опыте на кроликах свидетельствуют о том, что наиболее приемлемой оказалась вакцина, содержащая в своем составе в качестве адъюванта 46% синтетического масла, 2% эмульгатора и 52% антигена, которая обладала умеренной реактогенностью и высокой превентивной активностью.

Литература. 1. Воробьев, А. А., Васильев, Н. Н. Адъюванты – М., 1969, 256 с. 2. Никифорова, Н. М., Лукьяненко А. В. Пастереллёзы. – В кн: Ветеринарные препараты. М., 1981, 237 с. 3. Душук, Р. В. Состояние и перспективы совершенствования противопастерелллезных биопрепаратов. – В кн: Разработка, апробация и госконтроль ветпрепаратов. М., 1981, с. 93. 4. Гусева, Е. В., Дудников, А. И. Изучение реактогенности компонентов, входящих в состав эмульгированных противоящурных вакцин. – В кн: Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии. Владимир, 1986, с. 77 – 79. 5. Шимко, В. В. Пастереллёз молодняка крупного рогатого скота. – Мн, 2000, 40 с. 6. Лях, Ю. Г. Пастереллёз свиней на территории Республики Беларусь (эпизоотология и меры борьбы). – Мн, 2000, 36с. 7. Лях, Ю. Г. Пастереллёз свиней в Беларуси. – Мн, БИТ «Хата», 2002 – 201 с. 8. Лях, Ю. Г. Распространение пастереллёза свиней в Беларуси // Ветеринарная медицина Беларуси. - № 3. – 2002. – с. 8 – 9.

Статья передана в печать 20.10.2016 г.