



## ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ

УДК 619:616.98:578.831.3:615.37.636.4

### РАЗРАБОТКА ГИПЕРИММУННОЙ СЫВОРОТКИ ПРОТИВ ПНЕВМОНИИ СВИНЕЙ

А. А. Вербицкий (УО ВГАВМ)

Ключевые слова: *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, пневмония, свиньи, сыворотка (Key words; *Bordetella bronchiseptica*, *Pasteurella multocida*, pneumonia, swine, immune serum)

Получена сыворотка для пассивной иммунизации и лечения пневмоний у свиней пастереллезной и бордетеллезной этиологии, описаны методы ее заключительного контроля.



#### **ВВЕДЕНИЕ**

По происхождению и клинко-морфологическому проявлению пневмонии весьма разнообразны. У свиней они, как правило, регистрируются в послеотъем-

ный период. При анализе спектра возбудителей бактериальных пневмоний по результатам бактериологических исследований патматериала, возбудитель бордетеллеза выделяется в 5-30% случаев. Наряду с бордетеллезом, в 15-40% случаев выделяется возбудитель пастереллеза [4]. По периоду возрастной восприимчивости болезни вызываемые указанными возбудителями совпадают.

Для лечения свиней, больных пневмонией пастереллезной и бордетеллезной этиологии, используют многочисленные анти-бактериальные препараты. Однако применение антибиотиков имеет большое количество негативных и побочных действий, связанных с их токсическим, иммунодепрессивным и дисбактериальным действием, как для организма животных, так и людей, употребляющих в пищу мясо от этих животных, что обуславливает необходимость создания гипериммунной сыворотки [2].

В этой связи целью нашей работы явилось получение высокоэффективного биологического препарата для лечения и пассивной профилактики инфекционных пневмоний свиней, вызываемых ассоциацией пастерелл и бордетелл, что на наш взгляд является достаточно актуальным.

#### **МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

Работа выполнена на кафедре микробиологии и вирусологии УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» и УП «Витебская биофабрика».

Для разработки сыворотки использовали штаммы пастерелл и бордетелл, выделенные от поросят, доминирующие в республике и отвечающие требованиям к штаммам используемых для получения биологических препаратов [1,3].

Получение гипериммунной сыворотки представляет собой поэтапный процесс. Вначале отобрали волов, будущих продуцентов препарата. На следующем этапе мы сконструировали антиген, в который входили штаммы *Pasteurella multocida* серотипов А, В, D и *Bordetella bronchiseptica*. На начальном этапе изготавливали поливалентный антиген путем выращивания бактериальных культур, проверки их свойств, составления антигена, его инактивации и концентрирования. С этой целью штаммы *P. multocida* серотипов А, В,

D и V.bronchiseptica, прошедшие контроль и соответствующие паспортным данным, первоначально культивировали при  $37,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$  в течение 18-20 часов во флаконах объемом  $100 \text{ см}^3$ , содержащей  $30\text{-}50 \text{ см}^3$  модифицированной питательной среды.

Проверенные на чистоту роста культуры из флакона засеивали каждую в отдельности в 20-ти литровые баллоны, наполненные не более чем на одну треть объема модифицированной питательной средой. Культивирование культуры второй генерации проводили  $37,5 \pm 0,5^\circ\text{C}$  в течение 20-24 часов. Полученную матровую раскладку проверяли на чистоту роста макроскопически и путем микроскопирования окрашенных по Грамму мазков, после чего определяли концентрацию микробных клеток.

Инактивацию полученных культур проводили 0.3%-ным раствором формалина (содержание формальдегида не менее 36%) в течение 10-14 суток при  $36\text{-}38^\circ\text{C}$ . Инактивированную культуру концентрировали путем сорбции на гидроокиси алюминия. После сорбции и отстоя готовый антиген концентрировали до содержания 8 млрд. микробных клеток в  $1 \text{ см}^3$  путем декантации надосадочной жидкости.

Стерильность сконструированного антигена проверяли контрольным посевом на МПА, МПБ, Китта-Тароцци и агар Сабуро. По отсутствию роста грибковой и бактериальной микрофлоры устанавливали стерильность полученного антигена.

Безвредность сконструированного антигена определяли в опыте *in vivo* на 5 белых мышах путем подкожного введения антигена в объеме  $0,5 \text{ см}^3$  на голову с последующим наблюдением в течение 10 суток. О безвредности антигена судили по отсутствию заболевания и падежа лабораторных животных.

Величину pH полученного антигена определяли после трехкратного исследо-

вания его значения с помощью pH-метра. Показатель pH в значениях от 7.0 до 7.6 свидетельствует о безвредности антигена.

Гипериммунизацию волов-продуцентов проводили путем четырехкратного внутрибрюшинного введения антигена в количествах  $5 \text{ см}^3$ ,  $10 \text{ см}^3$ ,  $15 \text{ см}^3$  и  $20 \text{ см}^3$  соответственно с интервалом между инъекциями 5 суток.

Отбор и переработку крови проводили через 10 суток после последней инъекции антигена в количестве  $16 \text{ см}^3$  на кг живой массы вола. Получение сыворотки проводили путем дефибринирования плазмы в дефибринаторе при работающей мешалке с добавлением 30%-ного раствора хлористого кальция в течение 30 минут.

Полученную сыворотку консервировали путем добавления 5%-ного раствора фенола до получения его конечной концентрации в сыворотке не более 0.5%.

Далее готовую сыворотку подвергали отстою в отстойниках на протяжении 40 суток при температуре  $+2\text{-}15^\circ\text{C}$ . По истечении срока отстоя сыворотку осветляли и фильтровали с помощью картонных фильтров «Т», «КФО-1» и «КФМ». Затем полученный препарат мы подвергали стерильной фильтрации с помощью фильтрационной установки PALL и фасовали в стерильные флаконы объемом  $200 \text{ см}^3$ , укупоривали резиновыми пробками, закатывали металлическими колпачками.

Заключительный контроль опытной серии полученной сыворотки проводили в ОКК УП «Витебская биофабрика» на безвредность, стерильность и иммунную активность.

Для определения безвредности использовали 5 белых мышей массой 16 -18 г. Для испытания использовали 3 флаконов сыворотки из опытной партии. Из каждого флакона отбирали в один стерильный флакон по  $20 \text{ см}^3$  сыворотки для получения объединенной пробы. Смесь сыворотки вводили подкожно в области спины мышам в дозе  $0,5 \text{ см}^3$ . Наблюдение

за подопытными животными вели в течение 10 суток.

Изучение активности (специфичности) препарата. Метод заключался в определении профилактических свойств препарата после иммунизации белых мышей, и последующего их заражения патогенными культурами пастерелл и бордетелл. От объединенной пробы отбирали 10 см<sup>3</sup> испытуемой сыворотки. Для испытания иммунной активности использовали 24 белые мыши массой 16-18г. На каждую разновидность пастерелл и штамм бордетеллы брали по 3 животных, которым сыворотку вводили подкожно в дозе по 0,2 см<sup>3</sup> в смеси с 0,3 см<sup>3</sup> стерильного физиологического раствора, общим объемом 0,5см<sup>3</sup> в разные точки.

Через 24 часа иммунизированных животных и трех контрольных мышей в каждой группе заражали 3-5 ЛД<sub>50</sub> контрольных штаммов пастерелл и бордетеллы. За зараженными животными вели наблюдение в течение 10 суток.

Для изучения стерильности использовали МПА, МПБ, агар Сабуро и среду Китта-Тароцци по две пробирки каждой среды. Для проведения испытания использовали 3 флакона из опытной партии сыворотки. Из каждого флакона сыворотку засекали в объеме по 0,2 см<sup>3</sup> в пробирки с МПА, МПБ, агаром Сабуро и средой Китта-Тароцци и по 2 см<sup>3</sup> во флаконы с МПБ и средой Китта-Тароцци. Посевы на агаре Сабуро выдерживали в термостате при температуре 20-22<sup>o</sup>С, а на остальных средах - при температуре 37±1<sup>o</sup>С в течение 10 суток.

### **РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

В результате изучения морфологических, культуральных, ферментативных, патогенных и антигенных свойств установлено, что *Pasterella multocida* серотипа А, В и D – грамотрицательные, короткие с закругленными концами овоидные палочки, спор не образуют, неподвижны. При окраске по Романовскому-Гимзе или

Лэффлеру пастереллы выглядят, как овоиды или короткие палочки с закругленными концами и заметной биполярностью, вокруг которых может быть видна прозрачная капсула. *Bordetella bronchiseptica* – мелкие, грамотрицательные, овоидные, подвижные палочки.

Рост пастерелл в первые дни (24-48ч) выращивания на жидких питательных средах сопровождался легким равномерным помутнением, на 4-5 сутки на дне пробирки образовывался характерный слизистый осадок, поднимающийся при встряхивании в виде неразбивающейся косички, с полным просветлением бульона. На плотных сывороточных средах пастереллы росли в виде мелких, прозрачных, круглых колоний с ровными краями, при дальнейшем культивировании колонии приобретали серо-белый цвет. При росте на кровяном агаре не образовывали зону гемолиза.

Бордетеллы при культивировании на жидких питательных средах вызвали равномерное помутнение с последующим образованием осадка и пристеночного кольца, легко разбивающегося при встряхивании. На поверхности МПА, бордетеллагаара, казеиново-угольного агара через 24 часа образовывались полупрозрачные, розинчатые, блестящие, выпуклые колонии размером с булавочную головку. Они имели маслянистую консистенцию, легко снимающуюся бактериологической петлей. Через 48-72 ч колонии приобретали серо-белый цвет.

В биохимическом отношении штаммы *Pasterella multocida* серотипа А, В и D ферментировали глюкозу, сахарозу, маннозу и маннит с образованием кислоты без газа, не свертывали молоко, редуцировали нитраты, образуют индол, не расщепляли мочевину. *Bordetella bronchiseptica* не ферментировала сахара и многоатомные спирты, расщепляла мочевину, образовывала сероводород, не образовывала индол, росла на среде Сим-

монса, редуцировала нитраты и давала положительную пробу на каталазу.

LD<sub>50</sub> для белых мышей массой 14-16г *Pasterella multocida* серотипов А и D составляла 60 микробных клеток при подкожном введении, а для *Pasterella multocida* серотипа В – 20 микробных клеток. Штамм *Bordetella bronchiseptica* обладал LD<sub>50</sub> для белых мышей в количестве 100 микробных клеток при подкожном введении.

Готовый инактивированный антиген был признан безвредным, т.к. в течение 10 суток мыши оставались живыми и клинически здоровыми.

Величину рН измеряли с помощью рН-метра трижды и подсчитали среднее арифметическое значение, которое составило – 7,3.

Полиантиген признали стерильным, потому что после посева на питательные среды, рост микроорганизмов и грибов отсутствовал в течение 10 суток.

После гипериммуннизации волов-продуцентов, взятия крови, получения из нее сыворотки, последующего отстоя и фильтрации мы получили опытную серию биопрепарата, который подвергли контролю в ОКК УП «Витебская биофабрика». При этом установили, что полученная сыворотка была:

- безвредной, т.к. в течение 10 суток животные оставались живыми и клинически здоровыми, на месте введения препарата отека и других побочных явлений не наблюдалось.
- активной (специфичной), т.к. за период наблюдения за опытными (зараженными) животными все белые мыши выжили, в контрольной группе, где животных не иммунизировали полученной сывороткой, все мыши погибли в течение 3-х суток.
- стерильной, т.к. в течение 10 суток рост

микроорганизмов на питательных средах отсутствовал.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

В ходе экспериментальной работы мы получили опытную серию препарата «Гипериммунная сыворотка против пневмонии свиней, содержащая антитела к *P. multocida* серотипов А, В, D и *B. bronchiseptica*». Предложенные методы контроля показали, что сыворотка оказалась безвредной, активной и стерильной.

**Developing the immune serum against swine pneumonia. Viarbitski A.A.**

### **SUMMARY**

The immune serum for treatment and prevention of swine pneumonia caused by *Pasteurella multocida*, and (or) *Bordetella bronchiseptica* has been developed, the control procedure has been described.

### **ЛИТЕРАТУРА**

1. Каширин В.В. Иммуногенные свойства штаммов *Pasteurella multocida* / В.В. Каширин // Ветеринария. -1995. - №10. – С. 25 – 29.
2. Медведев, А.П. Проблемы производства противобактериальных биопрепаратов для пассивной профилактики и лечения животных. \А.П. Медведев, А.А.Вербицкий, С.В. Даровских \ \ Ученые записки: научно-практический журнал\ Витеб. госуд. академия ветер. медицины. - Витебск,2006.-Т.42. ч.2- с.37-40.
3. Положение о паспортизации и депонировании штаммов микроорганизмов / А.П. Лысенко [и др.]; Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслесского НАН Беларуси. – Минск, 2006. – 28 с.
4. Лях Ю.Г. Эпизоотическая ситуация и прогноз по пастереллезу свиней в Республике Беларусь //Ю.Г Лях / Ветеринарная патология. – 2003. - №1. – С. 137 – 139.