МІКРОБІОЛОГІЯ, ВІРУСОЛОГІЯ, МІКОЛОГІЯ, ІМУНОЛОГІЯ ТА ЕПІЗООТОЛОГІЯ

УДК 619:616.98:579.843.95:615.371:636.4

ВЛИЯНИЕ АДЪЮВАНТОВ НА РЕАКТОГЕННОСТЬ И ИММУНОГЕННОСТЬ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ПАСТЕРЕЛЛЕЗА СВИНЕЙ

Вербицкий А.А., Гвоздев С.Н.
УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», Витебск, Республика Беларусь

Аннотация. *В статье идет речь о проведении исследований, направленных на изучение стерильности, безвредности, реактогенности и иммуногенности эмульсин-вакцины в сочетании с тремя разными адъювантами на белых мышах. В результате из трех адъювантов был выбран один ISA 206, как наименее реактогенный и обеспечивающий наибольшую иммунную активность.*

Ключевые слова: *вакцина, адъюванты, пастереллез, иммуногенность, реактогенность.*

Актуальность проблемы. Удовлетворение потребности населения продуктами животного происхождения, а промышленности сырьем, возможно лишь в случае интенсивного ведения животноводства. Одной из наиболее рентабельных отраслей животноводства является свиноводство. Основными поставщиками свинины в Республике Беларусь служат крупные свиноводческие комплексы с оборотом стада в 24 тыс. и 108 тыс. голов в год. Такое крупное скопление животных на ограниченной территории ведет к риску возникновения заболеваний, которые при этом наносят значительный экономический ущерб. При этом ведущая роль в поражении животных принадлежит заболеваниям инфекционной этиологии.

В настоящее время среди инфекционных болезней третье место занимает пастереллез, уступая лидерство лишь колибактериозу и сальмонеллезу. Первые сведенья о возникновении пастереллеза в нынешней Республике Беларусь датируются 1912 г., когда двумя учеными - Н.И. Эскертом и В.В. Федерсом было зарегистрировано и дано подробное описание пастереллеза среди диких кабанов в Беловежской пуще. Впервые в свиноводческих хозяйствах Республики Беларусь пастереллез был зарегистрирован в 1945 году, при этом был выявлен всего один неблагополучный пункт, в котором было поражено одно животное. Затем вплоть до 1950 года наблюдается медленный рост количества случаев заболевания животных пастереллезом. В 1950 году было выявлено 56 неблагополучных пунктов. Начиная с этого года, наблюдается резкое увеличение количества случаев заболевания животных [11]. Это дало толчок к развитию средств борьбы и профилактики данного недуга [5,10].

Несмотря на обилие биопрепаратов, используемых в настоящее время для профилактики и борьбы с пастереллезом, данное заболевание актуально и по настоящий день. По данным ветеринарной отчетности за 2000 – 2006 года в Республике Беларусь было выявлено неблагополучных пунктов соответственно – 36, 56, 58, 49, 32, 39 и 39. Это свидетельствует о том, что применяемые в

настоящее время препараты для профилактики пастереллеза свиней не всегда приносят ожидаемый эффект.

Возбудителем пастереллеза свиней является P. multocida (капсульные серовары A, B, D, E, при этом серовары B и E вызывают острое течение болезни (геморрагическую септицемию), а серовары A и B – затяжное течение (инфекционную анемию) [8].

Среди мер борьбы с пастереллезом важное место занимает вакцинопрофилактика [1, 2]. Для профилактики заболевания применяют живые и инактивированные вакцины [3, 7]. Недостаток живых вакцин – они часто обладают остаточной вирулентностью и реактогенностью. Что касается инактивированных вакцин, то у них данные недостатки отсутствуют, однако они в свою очередь обладают более низкой иммуногенностью за счет действия инактиванта, повреждающего антигенные структуры клеток микроорганизмов [4, 6, 9]. Для повышения иммуногенности инактивированных вакцин в настоящее время широко применяют масляные адъюванты.

Эмульсин-вакцины создают длительный иммунитет, продолжительность которого в значительной мере зависит от масляного адъюванта, который препятствует быстрому всасыванию вакцины и таким образом создает депо специфического антигена в организме на месте введения. Нежелательный эффект от применения таких вакцин наблюдается при использовании сильно реактогенного масла, которое может приводить к образованию на месте введения медленно заживающих ран.

Для эффективной борьбы с пастереллезом у свиней в настоящее время необходимо применять эмульсионные вакцины. Однако для их разработки и организации производства остаются невыясненными вопросы оптимальных способов инактивации пастерелл, отработки промышленного метода их культивирования, подбора масляного адъюванта, его соотношение к антигену. Целью данной работы является решение указанных задач, что позволит разработать научно-техническую документацию на изготовление и контроль эмульсин-вакцины против пастереллеза свиней и организовать ее производство на территории Республики Беларусь.

Задания исследования:

1.Проверить стерильность и безвредность опытных образцов вакцины.

2.Определить на лабораторных животных реактогенность и иммуногенность адъювантов.

3.Установить иммуногенную дозу препарата.

Материал и методы исследования. Материалы – штаммы P. multocida 14; 655; 656 и 877 в качестве антигена; эмульсин-вакцина; адъюванты ISA 70, ISA 206, продукт 139; 160 белых мышей; сывороточный агар.

Все исследования проводились в несколько этапов.

На первом этапе были изготовлены опытные образцы 3-х эмульсин-вакцин, в состав которых в качестве антигена вошли штаммы P. multocida 14; 655; 656 и 877. В качестве масляной основы использовались 3 разных адъюванта. Для приготовления первой вакцины использовали адъювант ISA 70. Для второй и третей соответственно ISA 206 и продукт 139.

Для приготовления вакцин инактивированные бактериальные штаммы центрифугировались. Полученный осадок ресуспензировали до концентрации 30 миллиардов микробных клеток в одном сантиметре кубическом вакцины. Затем готовили эмульсию из расчета 40% антигена и 60% масляного адъюванта.

При приготовлении вакцины с продуктом 139 первоначально была проведена дополнительная манипуляция. Продукт 139 по отношению к маслу брали в массовой доле соответственно 2,5% и 97,5%. В дальнейшем по выше описанной схеме готовили эмульсию. Данную работу проводили в условиях УП «Витебская биофабрика».

Полученные экспериментальные образцы вакцин проверили на стерильность, определили их безвредность, реактогенность и иммуногенность. Стерильность полученных препаратов проверяли путем посева на МПА, МПБ, среду Сабуро и Кита-Тароцци.

Безвредность определили на белых мышах путем подкожного введения им вакцин в дозе 0,5 мл на животное. Реактогенность проверили по методу Гарцета в модификации
Е.В Гусевой и А. И. Дудникова. Для этого сформировали 6 групп животных (по 5 мышей в каждой) – по 2 группы на каждую вакцину. По 2 группы животных формировали с той целью, что реактогенность биопрепаратов проверяли как через 24 часа после введения вакцины, так и на 10 сутки с момента введения препарата.

Животным каждой группы вводили в пяточную поверхность задней лапки вакцину в дозе 0,05 мл. Задняя лапка, в которую вакцину не вводили, служила контролем.

Мышей первых трех групп через 24 часа после введения вакцин усыпили хлороформом, после чего на уровне скакательного сустава лапки отрезали. Затем брали общие пробы – пять опытных и пять контрольных лапок – и взвешивали. Реактогенность учитывали по разнице в весе лапок. Такие же манипуляции были проведены с мышами оставшихся трех групп через 10 дней после введения вакцин.

Иммунную активность препаратов проверили на лабораторных животных. В качестве последних использовали белых мышей массой 18-20 г. Было сформировано 13 групп мышей по 10 животных в каждой. Для каждой вакцины использовали по 4 группы животных (всего 12 групп). 13-я группа служила контролем. 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. Животным контрольной группы вводили изотонический раствор натрия хлорида. Затем за мышами вели наблюдение. Через 21 день после вакцинации животных всех групп подвергли экспериментальному заражению.

Для заражения в качестве антигена использовали тест культуру пастерелл, из которой делали посев на глюкозо-сывороточный агар. Через 24 часа сделали смыв культуры и довели до концентрации 1 млрд. микробных клеток в 1 мл суспензии (по стандарту мутности). Далее, путем последовательных разведений, довели содержание микробных клеток до 100 тыс. в 1 мл суспензии. Полученную суспензию, ввели подкожно мышам в дозе 0,2 мл. Затем в течение 2-ух недель за мышами велось наблюдение. Трупы павших животных подвергли вскрытию. Из внутренних органов делали посевы и мазки отпечатки.

Результаты исследования. За период наблюдения в посевах из вакцин рост отсутствовал. При определении безвредности все подопытные животные оставались живыми на протяжении всего опыта.

Результаты определения реактогенности отражены в таблице 1.

Как видно из таблицы разница в весах лапок при первом исследовании в группах была не значительной и находилась в пределах от 0,5393 (ISA 70) до 0,8545 (продукт 139). При втором исследовании разница уже колебалась от 0,4341 (ISA 206) до 1,392 (продукт 139). Вес опытных лапок (вакцина с адъювантом продукт 139) превышал вес контрольных лапок в 3,21 раза, тогда как при использовании других адъювантов разница в весе опытных и контрольных лапок, что через 24 часа, что на 10-ые сутки превышала не более чем в 2 – 2,1 раза.

Таблица 1 - **Показатели реактогенности эмульсин-вакцин в сочетании с различными адъювантами.**

Адъювант	Через 24 часа (г)			На 10 сутки (г)		
	О.л	З.л	Разница в весе	О.л	З.л	Разница в весе
ISA 70	1,1976	0,6583	0,5393	1,0064	0,5402	0,4662
ISA 206	1,4683	0,7337	0,7346	0,9268	0,4927	0,4341
Продукт 139	1,5020	0,6475	0,8545	2,0207	0,6287	1,392

Где О.л. – опытные лапки, З.л. – здоровые лапки.

Вес лапок определяли с помощью аналитических весов.

Результаты изучения иммуногенной активности приведены в таблице 2.

Как видно из указанной таблицы и рисунка, наилучшая сохранность мышей отмечена в тех группах, где вакцина применялась в дозе 0,1 – 0,2 мл на животное. Так, в группе, вакцинированной эмульсин-вакциной в сочетании с ISA 70 в живых к концу опыта осталось 9 из 10 животных (при дозах 0,1 – 0,2 мл), в то время как при меньших дозах (0,025мл и 0,05 мл) выжило соответственно 60 и 70% животных. При вакцинации мышей с адъювантом ISA 206 в дозе 0,025 мл выжило 5 животных (половина группы), а при вакцинации в дозе 0,05 мл 60% мышей, в то время дозы 0,1 и 0,2 мл обеспечили 100% сохранность.

Если аналогично сравнивать продукт 139, то сохранность животных составила соответственно – 70, 80, 90 и 100% в зависимости от дозы применения эмульсин-вакцины.

В контрольной группе пали все животные.

Таблица 2 - **Иммуногенность эмульсин-вакцин**

Адъювант	Доза (мл)	Животных в группе	Выжило	Пало	% выживаемости
ISA 70	0,025	10	6	4	60
	0,05	10	7	3	70
	0,1	10	9	1	90
	0,2	10	9	1	90
ISA 206	0,025	10	5	5	50
	0,05	10	6	4	60
	0,1	10	10	0	100
	0,2	10	10	0	100
Продукт 139	0,025	10	7	3	70
	0,05	10	8	2	80
	0,1	10	9	1	90
	0,2	10	10	0	100
контроль	-	10	0	10	0

Как видно из полученных результатов, все вакцины с опытными адъювантами обеспечивают максимальную защиту при применении их в дозе 0,2 мл на животное (ISA 206 и продукт 139 – 100%, ISA 70 – 90%). При использовании вакцины в дозе 0,025 мл - сохранность мышей в группах варьирует от 50% (ISA 206) до 70% (ISA 70 и продукт 139). Доза 0,05 мл обеспечивает сохранность животных в пределах от 60% (ISA 206) до 80% (продукт 139).

Использование дозы вакцины 0,1 мл на животное обеспечило полное отсутствие падежа только в группе, вакцинированной с адъювантом ISA 206. В тоже время, вакцины с другими адъювантами обеспечили защиту на 90% (9 из 10 животных выжили).

При определении реактогенности выяснилось, что наименьшей реактогенностью обладает вакцина с адъювантом ISA 206. Наименее приемлемым вариантом в этом отношении оказалась вакцина на основе продукта 139. Изучение иммуногенной активности приготовленных вакцин показало, что наиболее максимальную защиту животных обеспечивают препараты с адъювантами ISA 206 и продуктом 139.

Выводы. 1. Приготовленные нами опытные образцы вакцин с различными адъювантами (ISA 70, ISA 206, продукт 139) оказались стерильными и безвредными.

2. Наиболее приемлемым для приготовления вакцины против пастереллеза свиней является адъювант ISA 206. Эмульсин-вакцина с данным адъювантом обладает слабой реактогенностью и высокой иммуногенностью, обеспечивающей 100%-ю защиту лабораторных животных от пастереллеза в дозе 0,1 мл.

Литература

1. Горбунов, А. П. Профилактика пастереллеза телят в откормочных хозяйствах / А. П. Горбунов // Ветеринария. – 1986. - №10. – С. 74 – 81.
2. Иммуногенность вакцин против пастереллеза свиней / Р. В. Душук [и др.] // Ветеринария. – 1997. - №10. – С. 18 – 20.
3. Бушуева, Н. Б. Инактивация пастерелл и сальмонелл при изготовлении биопрепаратов / Н.Б. Бушуева, М.Я. Ярцев // Ветеринария. – 1997. - №11. – С. 23 – 25.
4. Бирман, Б.Я. Лабораторные испытания инактивированной эмульгированной вакцины против пастереллеза птиц / Б.Я. Бирман, Р.П. Лизун // Птицеводство Беларуси. – 2002. - №3. – С. 18 – 20.
5. Лях, Ю. Г. Пастереллез свиней на территории Республики Беларусь: автореф. ... дис. док. вет. наук / Ю.Г. Лях // РНИУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского НАН Беларуси». - Мн., 2003. – 36 с.
6. Леонов, А. В. Получение аттенуированного штамма P. multocida / А. В. Леонов, В. В. Гусев // Ветеринария. – 2004. - №10. –С. 23 – 26.
7. Андросик, Н. Н. Профилактика пастереллеза сельскохозяйственных животных на современном этапе / Н. Н. Андросик, Ю. Г. Лях // Весці акадэміі аграрных навук Рэспублікі Беларусь. – 2000. - №4. – С. 62 – 64.
8. Заерко, В. Е. Совершенствование специфической профилактики пастереллеза / В. Е. Заерко, В. И. Ситьков, И.К. Тутов // Ветеринария. – 2000. - №6. – С. 20 – 22.
9. Соколов, С. Г. Способ инактивации пастерелл / С. Г. Соколов // Ветеринарная наука производству. – 1988. – Выпуск 26. – С. 54 – 58.
10. Сравнительное изучение эффективности противопастереллезной вакцины для свиней / Х.В. Саркисян [и др.] // Ветеринарная патология. – 2003. - №1. – С. 135 – 138.
11. Лях, Ю. Г. Эпизоотическая ситуация и прогноз по пастереллезу свиней в Республике Беларусь / Ю. Г. Лях // Ветеринарная патология. – 2003. - №1. – С. 137 – 139.

ВПЛИВ АД'ЮВАНТІВ НА РЕАКТОГЕННІСТЬ ТА ІМУНОГЕННІСТЬ ВАКЦИНИ ПРОТИ ПАСТЕРЕЛЬОЗУ СВИНЕЙ

А.А. Вербицький, С.М. Гвоздєв

НО «Вітебська ордена «Знак Пошани» державна академія ветеринарної медицини», Вітебськ, Республіка Бєларусь

Анотація. *В статті іде мова про проведені дослідження, направлені на вивчення стерильності, шкідливості, реактогенності та імуногенності емульсин-вакцини в сполученні з трьома різними ад'ювантами на білих мишах. Як*

висновок, із трьох ад'ювантів був вибраний один ISA 206, як найменш реактогенний і забезпечуючий найбільшу імунну активність.

Ключові слова: *Вакцина, ад'юванти, пастерельоз, імуногенність, реактогенність.*

INFLUENCE OF ADJUVANTS ON REACTIVITY AND IMMUNOGENICITY OF VACCINE AGAINST POARCINE PASTEURELLOSIS

A.A. Verbicki, S.N. Gvozdev

EE «Vitebsk «Badge of Honor» Order State Academy of Veterinary Medicine» Vitebsk, The Republic of Belarus

Summary. *The article presents researches for studying sterility, safety, reactivity and immunogenicity of an oil emulsion vaccine in combination with three types of adjuvants conducted on white mice. The ISA 206 adjuvant has been chosen as having the lowest reactivity with highest activity.*

Key words: *Vaccine, adjuvants, pasteurellosis, immunogenicity, reactiviy.*

Стаття надійшла до редакції – 31.03.2008 р.
Рецензент – доцент Гонтар А.М.