

**ПОЛУЧЕНИЕ И КОНТРОЛЬ АНТИГЕНА
ДЛЯ ГИПЕРИММУНИЗАЦИИ ПРОДУЦЕНТОВ СЫВОРОТКИ
ПРОТИВ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА И ПАСТЕРЕЛЛЕЗА
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

Медведев А.П., доктор ветеринарных наук, профессор

Кошнерова Л.А., аспирант

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

ВВЕДЕНИЕ

В Республике Беларусь самыми распространенными болезнями бактериальной этиологии являются эшерихиоз (колибактериоз), сальмонеллез и пастереллез. Инфекционные болезни – одна из сложных проблем ветеринарной науки и практики. В борьбе с ними большое значение имеют специфические биопрепараты, предназначенные для диагностики инфекций, их профилактики и терапии животных.

Применение ветеринарных биологических препаратов значительно улучшает эпизоотическое состояние животноводства, повышает сохранность животных и их продуктивность, качество продуктов питания и сырья животного происхождения, играет важную роль в охране окружающей среды [6].

Для активной специфической профилактики сальмонеллеза и пастереллеза используют ряд вакцин. Однако, несмотря на значительное количество вакцинированных животных, ежегодно в Беларуси регистрируется значительное количество неблагополучных пунктов по этим заболеваниям. Применение вакцин малоэффективно в тех случаях, когда необходимо создать иммунную защиту в течение нескольких часов или суток [2]. Такие ситуации возникают в неблагополучных по заболеваниям хозяйствах, когда требуется профилактировать вышеназванные болезни у подозрительных в заражении животных или в случае иммунизации молодняка с еще несформировавшейся иммунной системой [8].

Лечебно-профилактические сыворотки содержат готовые антигены, в связи с чем пассивный иммунитет у животных наступает практически сразу после их введения [2]. Кроме этого, сыворотки оказывают положительное влияние на организм: повышают естественную резистентность, стимулируют синтез белков, интенсифицируют обменные процессы, оказывают антитоксическое действие, пополняют организм энергетическими и пластическими веществами. Характерной особенностью сывороток является специфичность их действия против возбудителя, вызывающего конкретную болезнь [4,7].

Поэтому сыворотку можно применять не только в качестве лечебного, но и профилактического средства. Следовательно, получение сыворотки против сальмонеллеза и пастереллеза является перспективным направлением в иммунотерапии, поскольку указанные инфекции часто поражают молодняк крупного рогатого скота и могут протекать в ассоциации [3].

Известно, что сальмонеллы и пастереллы широко распространены в природе, являются условно-патогенными микроорганизмами, обитают в желудочно-кишечном тракте животных и человека, на слизистой оболочке верхних дыхательных путей, вызывают сальмонеллез и пастереллез, которые могут протекать в виде смешанной инфекции [1].

Основными возбудителями сальмонеллеза крупного рогатого скота признаны *S. dublin* (серогруппа Д 1) и *S. typhimurium* (серогруппа В). К редким возбудителям этой болезни относят *S. enteritidis* (серогруппа Д 1) [8].

Ведущая роль в возникновении пастереллеза крупного рогатого скота принадлежит *P. multocida* и в более редких случаях – *P. haemolytica* [5].

Учитывая широкое распространение сальмонеллеза и пастереллеза среди животных в хозяйствах республики, а также проявление этих болезней в виде смешанной инфекции, мы решили приготовить ассоциированный сальмонеллезно-пастереллезный антиген, который можно было бы использовать для гипериммунизации волов с целью получения от них ассоциированной лечебно-профилактической сыворотки.

Полагаем, что получение такой сыворотки является целесообразным, так как арсенал средств для борьбы с сальмонеллезом и пастереллезом может пополниться еще одним специфическим препаратом.

В связи с вышеотмеченным, целью нашей работы явилось приготовление и контроль качества ассоциированного сальмонеллезно-пастереллезного антигена для гипериммунизации продуцентов сыворотки против сальмонеллеза и пастереллеза крупного рогатого скота.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для получения сальмонеллезных бульонных культур использовали производственные штаммы сальмонелл *S. dublin* 373, *S. typhimurium* 371, а для получения пастереллезных культур – *P. multocida* штаммы №№ 656, 798, 877, 5264.

Прежде, чем получить необходимое количество биомассы производственных штаммов сальмонелл и пастерелл путем культивирования их в жидкой питательной среде, мы определяли морфологические, тинкториальные, культуральные, ферментативные и антигенные свойства бактерий на предмет их соответствие паспортным данным.

Морфологические и тинкториальные свойства бактерий изучали путем микроскопии препаратов-мазков, окрашенных по Граму.

Производственные штаммы сальмонелл и пастерелл высевали на различные питательные среды и по характеру их роста судили о культуральных свойствах микробов.

Ферментативные свойства определяли по способности сальмонелл и пастерелл расщеплять моно-, полисахариды и многоатомные спирты на средах Гисса.

Антигенную структуру сальмонелл определяли с помощью набора сывороток О-комплексных и монорецепторных О- и Н-агглютинирующих в РА на стекле в соответствии с наставлением по их применению.

Убедившись, что штаммы сальмонелл и пастерелл были типичными по морфологическим, культуральным, биохимическим и антигенным свойствам, мы проводили их посев в бульон Хоттингера для последующего культивирования и получения бактериальной массы. Бульон Хоттингера стерилизовали автоклавированием. Перед засевом микроорганизмов определяли рН среды потенциометрически, устанавливая значение этого показателя в пределах 7,2-7,4 с помощью 10%-го раствора NaOH.

Культивирование бактерий вели в течение 20-24 часов при температуре 37-38 °С, используя для активного перемешивания растущих культур шуттель-аппарат. В процессе культивирования контролировали рН растущих культур и их чистоту.

Выращенные культуры сальмонелл и пастерелл инактивировали формалином в концентрации 0,3 % (для инактивации культуры использовали формалин с содержанием формальдегида не менее 36 %) и выдерживали их в термостате при 37°С в течение 35 суток, перемешивая их два раза в первые и не менее раза в последующие сутки.

Для составления ассоциированного антигена инактивированные культуры смешивали в следующем соотношении: 2 части культур сальмонелл и 3 части культур пастерелл.

После составления антигена его подвергали проверке на стерильность, безвредность и активность.

Испытание на стерильность проводили высевом антигена на питательные среды (МПА, МПБ, МППБ под вазелиновым маслом, среда Сабуро) с последующим выдерживанием их в термостате при 37-38 °С в течение 10 суток. Среду Сабуро помещали в отдельный термостат, поддерживающий температуру в пределах 20-22 °С.

Для определения безвредности антигена его вводили 5 белым мышам массой 16-18 г по 0,5 см³ подкожно в область спины и 5 морским свинкам по 3 см³ подкожно в область живота. За животными вели наблюдение в течение 10 суток.

Белых мышей использовали в качестве тест-модели при определении активности ассоциированного антигена. Для опыта по принципу аналогов подбирали мышей массой 18 г.

Животных разделили на четыре группы. Белым мышам 1-й, 2-й, 3-й групп антиген вводили внутрибрюшинно, однократно, в дозах: 0,1; 0,2; и 0,3 см³ соответственно, используя на каждую дозу по 10 животных. Через 14 суток после введения антигена иммунизированных мышей заражали заранее подтитрованной ЛД₁₀₀ сальмонелл и пастерелл. Животные 4-й группы служили контролем. Их также заражали заранее подтитрованной ЛД₁₀₀ сальмонелл и пастерелл без предварительного введения антигена. В контрольной группе заражали не менее 10 животных. Активность антигена проверяли в отношении *S. dublin* 373, *S. typhimurium* 371 и *P. multocida* 877 (этот штамм пастерелл предложен ВГНКИ для контроля активности протипастереллезных препаратов). За опытными животными наблюдали в течение 10 суток, отмечая павших и выживших. Эффективным антиген считали в случае выживания не менее 8 из 10 иммунизированных мышей в опытных группах и гибели не менее 8 из 10 в контрольной группе.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В результате проведенной опытной работы было установлено следующее.

Сальмонеллы представляли собой грамтрицательные палочки с закругленными концами. В поле зрения микроскопа располагались одиночно, попарно, неопределенными скоплениями. При росте в мясо-пептонном бульоне бактерии вызывали его равномерное помутнение с образованием значительного осадка. На мясо-пептонном агаре бактерии формировали круглые, с ровными краями, выпуклые колонии с блестящей поверхностью серо-белого цвета, размером от 2 до 3 мм в диаметре. На висмут-сульфитном агаре колонии были такого же размера, но черного цвета с металлическим оттенком. На средах Эндо и Плоскирева сальмонеллы формировали бесцветные или голубоватые колонии с ровными краями. При посеве на среды Гисса было установлено, что сальмонеллы ферментировали с образованием кислоты и газа глюкозу, маннит, дульцит и не изменяли лактозу, сахарозу, раффинозу. Бактерии не свертывали молоко, не редуцировали метиленовую синьку в молоке, не образовали индол.

Антигенная структура бактерий выражалась для каждого сероварианта следующими формулами: *S. dublin* – O- 1, 9, 12; H- g, p; *S. typhimurium* – O- 1, 4, 12; H- i и 1, 2.

Пастереллы представляли собой в поле зрения микроскопа короткие, мелкие с закругленными концами овоидные грамтрицательные палочки, не образующие спор, располагающиеся изолированно, парами и реже в виде коротких цепочек.

В мясо-пептонном бульоне в виду роста и размножения пастерелл наблюдали помутнение среды, а затем просветление с выпадением

на дно пробирки незначительного осадка, который при встряхивании пробирки поднимался в виде «косички».

На поверхности плотной питательной среды (МПА) пастереллы формировали округлые, гладкие, розинчатые, слегка выпуклые серовато-белые, с ровными краями колонии.

Пастереллы при посеве на среды Гисса с углеводами ферментировали с образованием кислоты глюкозу, сахарозу, маннит, сорбит и не расщепляли лактозу, дульцит, аденин. Бактерии не разжижали желатин, не вызывали гемолиза на кровяном агаре, давали положительную пробу на каталазу, не свертывали молоко, восстанавливали нитраты в нитриты, продуцировали индол.

При визуальном просмотре питательных сред в проходящем свете для определения стерильности антигена рост микроорганизмов не обнаружен, т.е. антиген был стерильным.

При проверке безвредности антигена был установлен положительный результат: мыши и морские свинки, получившие антиген, остались клинически здоровыми в течение 10 суток наблюдения за ними.

При контроле активности ассоциированного антигена в отношении *S. dublin* 373 было установлено, что антиген в дозе 0,1 см³ защищал от гибели 5 мышей из 10 опытных; в дозе 0,2 см³ – 8 особей; а мыши, получившие дозу препарата 0,3 см³ – выжили все. В контрольной группе погибли 9 из 10 мышей.

При контроле активности ассоциированного антигена в отношении *S. typhimurium* 371 было установлено, что антиген в дозе 0,1 см³ защищал от падежа 4 мышей из 10 опытных; в дозе 0,2 см³ – 8 особей; а мыши, получившие дозу препарата 0,3 см³ – выжили все. В контрольной группе погибли все мыши.

При контроле активности ассоциированного антигена в отношении *P. multocida* 877 было установлено, что антиген в дозе 0,1 см³ защищал от гибели 5 мышей из 10 опытных; в дозе 0,2 см³ – 9 особей; а мыши, получившие дозу препарата 0,3 см³ выжили все. В контрольной группе погибли все мыши.

ОБСУЖДЕНИЕ

По нашему мнению, получение поливалентной сыворотки против сальмонеллеза и пастереллеза крупного рогатого скота, применение ее в условиях животноводческих хозяйств может сыграть существенную роль в деле ликвидации сальмонеллеза и пастереллеза.

Для выращивания культуры сальмонелл и пастерелл использованы производственные штаммы бактерий, которые исследованы на предмет их типичности и принадлежности к соответствующим видам и серовариантам.

Затем нами были выращены бульонные культуры сальмонелл и пастерелл, из которых после их инактивации был составлен поливалентный ассоциированный сальмонеллезнопастереллезный антиген и произведен

контроль его качества. Ассоциированный антиген оказался стерильным, безвредным для белых мышей и морских свинок. Также ассоциированный антиген при контрольном заражении белых мышей обладал способностью вызывать защиту у иммунизированных животных в отношении *S. dublin* 373, *S. typhimurium* 371, *P. multocida* 877 при введении им 0,2-0,3 см³ антигена и вызывал гибель 9-10 контрольных мышей, т.е. был активным.

ВЫВОДЫ

В результате опытной работы приготовлен стерильный, безвредный, активный сальмонеллезнопастереллезный антиген, пригодный для гипериммунизации волов с целью получения от них поливалентной ассоциированной сыворотки против сальмонеллеза и пастереллеза крупного рогатого скота.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Афанасенко, В.И. Меры борьбы и профилактики при ассоциативных инфекциях животных / В.И. Афанасенко, А.П. Красиков // Актуальные проблемы инфекционных, паразитарных и незаразных болезней домашних животных и меры борьбы с ними: сб. науч. тр. – Омск, 1998. – С. 24–26.
2. Барашков, А.Н. Эффективность ассоциированного применения антигенов при получении гипериммунной сыворотки против пастереллеза / А.Н. Барашков // Ученые записки: сб. науч. тр. по материалам международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы диагностики и профилактики болезней, селекции, кормления и воспроизводства животных» / УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины». – Витебск, 2003. – Т. 39, ч. 1. – С. 22–24.
3. Ленев, С.В. Профилактика и диагностика болезней сельскохозяйственных животных / С.В. Ленев, Ю.А. Малахов, В.В. Шорохов // Сборник научных трудов ВГНКИ. – Москва, 2001. – Т. 62. – С. 52–57.
4. Максимович, В.В. Лечебная эффективность ассоциированной гипериммунной сыворотки при экспериментальном пастереллезе у крупного рогатого скота / В.В. Максимович, А.Н. Барашков // Ветеринарная наука – производству: сб. науч. тр. – Минск, 2005. – Вып. 38. Матер. межд. науч.-практ. конф. «Актуальные проблемы ветеринарной медицины в условиях современного животноводства». – С. 339–341.
5. Панин, А.Н. Состояние и перспективы совершенствования специфической профилактики пастереллеза животных / А.Н. Панин, Р.В. Душук // Сборник научных трудов / Всероссийский государственный научно-исследовательский институт контроля, стандар-

- тизации и сертификации ветеринарных препаратов – Центр качества вет. препаратов и кормов. – Москва, 2001. – Т. 62. – С. 27–38.
6. Получение в условиях хозяйства и испытание гипериммунной сыворотки против респираторных болезней телят / С.В. Пруцаков [и др.] // Актуальные проблемы ветеринарной медицины: матер. между. науч.-практ. конф. – Ульяновск, 2003. С.97–99.
 7. Разработка средств специфической профилактики инфекционных болезней животных / В.В. Максимович [и др.] // Ученые записки: сб. науч. тр. по материалам международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины и зоотехнии», посвященной 80-летию основанию учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, 4–5 ноября 2004 года / УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины». – Витебск, 2004. – Т. 40, ч. 1. – С.245–246.
 8. Шахов, А.Г. Этиология и профилактика желудочно-кишечных и респираторных болезней телят и поросят / А.Г. Шахов // Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях: Матер. междунар. науч.-практ. конф., Воронеж, 23–25 сентября 2002 г. – Воронеж: Воронежский государственный университет, 2002. – С. 3–8.