

— С. 426–465. 3. Mazukiewicz M. *Choroby drobiu*. — Wrocław. — 2005. — P. 425–445. 4. Schwaber M., Carmeli Y. *Mortality and delay in effective therapy associated with extended-spectrum beta-lactamase production in Enterobacteriaceae bacteremia: a systematic review and meta-analysis*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. — 2007. — 60. — P. 913–20. 5. Livermore D. M., Canton R., Gniadkowski M. *CTX-M: changing the face of ESBLs in Europe*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. — 2007. — 59. — P. 165–74. 6. *Cephalosporin Order of Prohibition Goes Into Effect*. — FDA. — April 6, 2012.

Статья передана в печать 18.07.2012 г.

УДК 619:616.98:579.84:615.373:636.4

## ИНАКТИВАЦИЯ И КОНЦЕНТРАЦИЯ АНТИГЕНА ПРИ КОНСТРУИРОВАНИИ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ПАСТЕРЕЛЛЕЗА И БОРДЕТЕЛЛЕЗА СВИНЕЙ

\*Вербицкий А.А., \*\*Финоменов А.Ю., \*\*Толяронок Г.Е.

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

\*\*РНИУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского НАН Беларуси»,  
г. Минск, Республика Беларусь

В статье авторами изложена информация по изучению режимов инактивации антигена и определению его концентрации при конструировании вакцины против пастереллеза и бордетеллеза свиней.

The article features the data on studying the antigen inactivation techniques and determining its concentration for developing a vaccine against porcine pasteurellosis and bordetellosis.

**Введение.** Одной из основных причин снижения рентабельности на свиноводческих комплексах промышленного типа являются болезни органов дыхания. По происхождению и клинико-морфологическому проявлению они весьма разнообразны.

Анализ заболеваемости свиней в странах Европы и Америки показывает, что на долю болезней органов дыхания приходится 35-40%. В свиноводческих хозяйствах Республики Беларусь респираторная патология составляет 30-35% и более.

Пастереллез в нашей стране занимает третье место по распространенности среди бактериальных заболеваний. В плане противозооотических мероприятий - четвертое место. Немалую опасность представляет и бордетеллез проявляющийся у свиней ринитом и пневмонией. Сочетанная инфекция возбудителей бордетеллеза и пастереллеза приводит к возникновению атрофического ринита, который является одной из форм позднего проявления бордетеллеза. Эта болезнь регистрируется почти во всех странах мира, где выращиваются элитные породы свиней с высокой энергией роста. Плохие условия содержания (скупенность, низкая температура и высокая влажность воздуха, вызывающие воспаление дыхательных путей) повышают скорость распространения инфекционного атрофического ринита и усиливают признаки болезни [3].

I. Vauwems et al. [6] установили, что бордетеллезная пневмония приводит к замедлению роста тела на 2,6%, снижению усвояемости кормов на 12%, в результате для достижения живой массы до 100 кг возникает необходимость удлинять сроки откорма на один месяц. Абовян А.В. [1], F. Dugal et al. [7], L. Maguar et al. [8], изучая зависимость суточных приростов свиней от степени поражения их пневмонией и атрофическим ринитом, отмечали, что их среднесуточный прирост уменьшался на 3,3 – 5,2 и более процентов.

Основным звеном в мероприятиях по борьбе с бордетеллезом и пастереллезом является специфическая профилактика. Приведенная выше информация свидетельствует о необходимости разработки вакцины для профилактики пастереллеза и бордетеллеза свиней. Все выпускаемые вакцины, в зависимости от состояния в них антигенной фазы делятся на живые и инактивированные. В промышленном свиноводстве все более широкое применение находят инактивированные вакцины, благодаря их существенным преимуществам перед живыми вакцинами. Прежде всего следует отметить их высокую безопасность и безвредность, возможность стандартизации дозированного введения специфического антигена, стабильность основных биологических свойств, возможность создания системного, напряженного и продолжительного иммунологического эффекта, возможность успешного применения в поливалентном или ассоциированном варианте [2, 4, 5]. Исходя из этого нами определена цель – конструирование инактивированной вакцины против пастереллеза и бордетеллеза.

**Материалы и методы исследований.** Важным звеном при разработке и производстве инактивированных вакцин являются процессы подбора концентрации антигена и его инактивации при сохранении их иммуногенных характеристик. Количество и качество антигена в препарате является важнейшим показателем в получении эффективных вакцин. В технологии изготовления убитых вакцин вслед за получением микробной биомассы наступает этап инактивации. Выбор инактиванта и режима инактивации является одним из определяющих факторов, влияющих на протективные свойства готовой вакцины. В современных технологиях изготовления вакцин широко применяют следующие инактиванты: формалин, фенол, этанол, этиленмин и его производные [2].

Поэтому целью нашей работы явилось определение концентрации и изучение режимов инактивации штаммов *Pasteurella multocida* серовариант А, *Pasteurella multocida* серовариант D и *Bordetella bronchiseptica*.

В первой серии опытов была подобрана оптимальная концентрация антигена в вакцине. Для проведения опыта были наработаны три инактивированных антигена *Pasteurella multocida* серовариант А, *Pasteurella multocida* серовариант D и *Bordetella bronchiseptica*. Концентрация антигенов доводилась до 2 млрд., 5 млрд. и 10 млрд. микробных клеток в 1 мл по стандарту мутности. Стандартизированные антигены смешивались в соотношении 1:1:1. В приготовленные таким образом антигены вводился гель гидроокиси алюминия до конечной концентрации 30% и перемешивался. Полученными антигенами иммунизировали кроликов внутримышечно в объеме 2 мл. Через неделю после первой иммунизации проводили повторную иммунизацию в такой же дозе. На каждую концентрацию антигена использовали 3 кролика массой 2-2,5 кг. Для контроля эффективности иммунизации у кроликов отбирали сыворотку крови до иммунизации, через 14, 21, 30, 60 дней после последней иммунизации. В сыворотке крови проводили определение титра антител к *Pasteurella multocida* серовариант А, *Pasteurella multocida* серовариант D и *Bordetella bronchiseptica*.

При определении условий инактивирования полученной биомассы бактерий исследовался инактивант формалин.

На первом этапе исследования был проведен опыт по определению концентрации формалина, обеспечивающего гибель пастерелл и бордетелл. Для проведения опыта использовалась взвесь бактериальных клеток *Pasteurella multocida* серовариант А, *Pasteurella multocida* серовариант D и *Bordetella bronchiseptica* в концентрации 10 млрд. микробных клеток /мл по стандарту мутности в которую вносили формалин до конечной концентрации 0,05%; 0,1%; 0,3%; 0,4%; 0,5%; 1% и 2%. Культуру с формалином ставили в термостат при температуре 37°C. Через 1, 3, 6, 12, 24 и 48 часов экспозиции отбирались пробы для контроля полноты инактивации. Пробы высевались на чашки Петри с кровяным МПА в дозе 0,1 мл. Посевы инкубировались в термостате 48 часов при 37°C. После инкубации оценивали наличие или отсутствие роста на чашках с питательной средой.

Поскольку при получении инактивированных вакцин важна не только полнота инактивации, но и отсутствие реактогенности, то была проведена вторая серия опыта, в которой оценивалась степень реактогенности инактивированного антигена. При проведении опыта использовалась смесь суточных культур штаммов *Pasteurella multocida* серовариант А, *Pasteurella multocida* серовариант D и *Bordetella bronchiseptica* в соотношении 1:1:1. Для чего культуры высевались на сывороточный МПА, инкубировались в термостате при температуре 37°C в течение 24 часов. Выросшая бактериальная масса смывалась изотоническим раствором натрия хлорида и доводилась до концентрации 5 млрд.м.к./см<sup>3</sup> по стандарту мутности. Стандартизированные смывы смешивались и добавлялся формалин до конечной концентрации 0,4%. Антиген с формалином ставился в термостат на инактивацию при 37°C. Пробы антигена отбирались на 3, 7, 14, 21 и 30 сутки. Отобранные пробы антигена вводили белым мышам живой массой 16-18 г подкожно в дозе 0,4 мл. На каждую пробу использовалось 10 мышей. В течение 10 суток за мышами вели наблюдение. Учитывали общее состояние, поедаемость корма, водопотребление, гибель животных. Опыт проводится в двух повторностях. Для каждой повторности опыта использовали новый антиген.

**Результаты исследований.** Результаты опыта по подбору оптимальной концентрации антигена приведены в таблице 15.

Таблица 15

## Подбор оптимальной концентрации антигена

Время взятия крови	Штамм	Концентрация антигена/№ кролика								
		2 млрд.			5 млрд.			10 млрд.		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
		Титр антител								
До вакцинации	<i>Past. mult. cep. A</i>	0	0	0	1:2	1:2	0	0	0	0
	<i>Past. mult. cep. D</i>	0	1:2	0	1:2	0	0	1:2	0	1:2
	<i>Bord. bronchisept.</i>	0	1:2	1:2	0	0	0	0	0	0
Через 14 дней	<i>Past. mult. cep. A</i>	1:16	1:32	1:32	1:16	1:16	1:32	1:32	1:32	1:32
	<i>Past. mult. cep. D</i>	1:16	1:16	1:32	1:16	1:16	1:16	1:16	1:32	1:32
	<i>Bord. bronchisept.</i>	1:16	1:32	1:32	1:16	1:32	1:32	1:32	1:32	1:32
Через 21 день	<i>Past. mult. cep. A</i>	1:128	1:128	1:256	1:512	1:512	1:512	1:512	1:512	1:512
	<i>Past. mult. cep. D</i>	1:128	1:128	1:128	1:1024	1:512	1:512	1:512	1:512	1:512
	<i>Bord. bronchisept.</i>	1:128	1:256	1:256	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:512
Через 30 дней	<i>Past. mult. cep. A</i>	1:128	1:128	1:128	1:512	1:1024	1:1024	1:512	1:512	1:512
	<i>Past. mult. cep. D</i>	1:256	1:128	1:64	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:512
	<i>Bord. bronchisept.</i>	1:128	1:128	1:256	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:512
Через 60 дней	<i>Past. mult. cep. A</i>	1:64	1:64	1:32	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:512
	<i>Past. mult. cep. D</i>	1:32	1:32	1:32	1:1024	1:1024	1:512	1:1024	1:1024	1:512
	<i>Bord. bronchisept.</i>	1:32	1:32	1:32	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:1024	1:512

Как видно из приведенной таблицы, при концентрации антигена 2 млрд. микробных клеток/мл, уже через 14 дней после иммунизации в сыворотке крови животных наблюдался вакцинный титр антител, который нарастал и на 21 день после иммунизации достиг максимума (1:256). Через 30 дней после введения антигена титр антител оставался на прежнем уровне. К 60 дню он начал снижаться, что свидетельствует о том, что данной концентрации антигена недостаточно для формирования длительного иммунитета. При концентрации антигена 5 и 10 млрд. микробных клеток/мл на 14 день после иммунизации титр антител составлял 1:16 – 1:32. В последующем он увеличивался и достиг к 30 дню 1:512 – 1:1024. На 60 день после иммунизации снижения титра антител не произошло, он оставался на прежнем уровне. Таким образом данная концентрация антигена способствует формированию длительного иммунитета. Результаты опыта по определению концентрации формалина, обеспечивающего гибель пастерелл и бордетелл, приведены в таблицах 16, 17, 18.

Таблица 16

**Определение времени инаktivации бактерий формалином культуры  
Pasteurella multocida серовариант А**

Концентрация формалина, %	Время инаktivации, часов					
	1	3	6	12	24	48
0,05	+	+	+	+	+	-
0,1	+	+	+	+	-	-
0,3	+	+	+	+	-	-
0,4	+	+	+	-	-	-
0,5	+	+	+	-	-	-
1	+	+	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-

Примечание: «+» - наличие роста, «-» - отсутствие роста.

Таблица 17

**Определение времени инаktivации бактерий формалином культуры  
Pasteurella multocida серовариант D**

Концентрация формалина, %	Время инаktivации, часов					
	1	3	6	12	24	48
0,05	+	+	+	+	+	-
0,1	+	+	+	+	-	-
0,3	+	+	+	+	-	-
0,4	+	+	+	-	-	-
0,5	+	+	+	-	-	-
1	+	+	-	-	-	-
2	+	-	-	-	-	-

Примечание: «+» - наличие роста, «-» - отсутствие роста.

Таблица 18

**Определение времени инаktivации бактерий формалином  
культуры Bordetella bronchiseptica**

Концентрация формалина, %	Время инаktivации, часов					
	1	3	6	12	24	48
0,05	+	+	+	+	+	+
0,1	+	+	+	+	+	-
0,3	+	+	+	+	+	-
0,4	+	+	+	+	-	-
0,5	+	+	+	+	-	-
1	+	+	-	-	-	-
2	+	+	-	-	-	-

Примечание: «+» - наличие роста, «-» - отсутствие роста.

Анализируя приведенные таблицы видим, что время инаktivации бактерий, входящих в состав разрабатываемой вакцины сокращается с увеличением концентрации формалина и составляет при концентрации 0,05% - 48 часов и более, при 0,1% и 0,3% - 24-48 часов, при 0,4% - 12-24 часов, при 1% - 6 часов, при 2% - 3-6 часов. Поскольку в препарат рекомендуется введение формалина в минимальной концентрации, то была выбрана концентрация 0,4%.

Результаты по определению степени реактогенности инаktivированного антигена в зависимости от времени инаktivации приведены в таблице 19.

Таблица 19

**Реактогенность антигена в зависимости  
от времени инаktivации**

Мыши	Время инаktivации антигена, суток										
	3		7		14		21		30		
	1 опыт	2 опыт	1 опыт	2 опыт	1 опыт	2 опыт	1 опыт	2 опыт	1 опыт	2 опыт	
Пало/выжило	5/5	6/4	2/8	2/8	0/10	1/9	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10
Общее состояние	угнетение	угнетение	вялость	вялость	удовлетвор.	удовлетвор.	хорошее	хорошее	хорошее	хорошее	хорошее

Как видно из приведенной таблицы, при трехсуточной инаktivации антигена, он является довольно токсичным для белых мышей (гибель животных в группе более 50%, выжившие мыши угнетенные). При инаktivации в течение 7 суток также наблюдается гибель белых мышей (20%), у выживших мышей регистрировалась вялость, снижение аппетита. При инаktivации антигена в течение 14 суток в одном опыте реактогенность антигена не была выявлена, но при повторном опыте наблюдалась гибель одной

мыши, состояние животных удовлетворительное. При инактивации антигена в течение 21-30 дней, он являлся безвредным для белых мышей, общее состояние животных было удовлетворительным.

**Заключение.** В результате проведенной нами работы установили, что концентрация антигена 5 млрд. микробных клеток/мл обеспечивает формирование длительного иммунитета. Для изготовления вакцины оптимальной схемой инактивации антигена является внесение в него 0,4% формалина и инактивация при 37°C в течение 21 дня.

**Литература.** 1. Абовян, А.В. Изучение инфекционного атрофического ринита в Армении: Автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03 / А.В. Абовян. - Ереван, 1965 - 16 с. 2. Медведев, А.П. Основы получения противобактериальных вакцин и сывороток / А.П. Медведев, А.А. Вербицкий. - Витебск: ВГАВМ, 2010.-200с. 3. Пейсак, З. Болезни свиней / Зигмунт Пейсак; пер. с польского Д.В. Потапчука. - Брест: ОАО «Брестская типография», 2008. - 424с. 4. Разработка средств специфической профилактики инфекционных болезней животных / В. В. Максимович [и др.] // Научные труды / Институт экспериментальной ветеринарии им. С.И. Вышелесского НАН Беларуси. - Минск, 2005. - Вып. 38 : Ветеринарная наука - производству. - С. 359-361. 5. Справочник по применению вакцин, зарегистрированных в Республике Беларусь, против инфекционных болезней крупного рогатого скота, свиней, мелкого рогатого скота, лошадей, плотоядных и животных разных видов / сост. В.В. Максимович [и др.]. - Минск : Техноперспектива, 2006. - 166 с. 6. Bauwems, J.E. *Bordetella bronchiseptica pneumonia and bacteremia following bone marrow transplantation* / J.E. Bauwems, D.H. Spach D.H., T.W. Schacker // *Journal clin. Microbiol.* - 1992. - Vol.30. - № 9. - P. 2474-2475. 7. Dugal, F. *Adherence of Bordetella bronchiseptica 276 to uorcine trachea maintained in organ culture* / F. Dugal, C. Girard, M. Jacques // *Applied and Environmental Microbiology.* - 1990. - Vol.56. - № 6. - P.1523-1529. 8. Magyar, L. *The role of a Bordetella bronchiseptica cytotoxin in the pathogenesis of turbinate atrophy in pigs* / L. Magyar, N. Chanter, J.M. Rutter // *Acta Microbiologica Hungarica.* - 1988. - Vol. 35. - № 2. - P. 178.

Статья передана в печать 03.09.2012 г.

УДК:619:616.98

## ПРОБЛЕМА ПРИЖИЗНЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ ТУБЕРКУЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

\*Власенко В.В., \*\*Лысенко А.П., \*\*\*Врохмейер Л., \*Березовский И.В., \*Власенко И.Г., \*Войцицкая О.М.,  
\*\*\*\*Притыченко А.Н., \*\*\*\*\*Кузнецов Н.А.

\*Винницкий государственный аграрный университет, г. Винница, Украина,

\*\*Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вышелесского, г. Минск, Республика Беларусь,

\*\*\*N.Y. Institute of Medical Research in Bayside, New York, USA,

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

\*\*\*\*\*Гродненский государственный аграрный университет, г. Гродно, Республика Беларусь

*В результате проведенного мониторинга туберкулинодиагностических исследований установлено, что бактериологически диагноз на туберкулез был подтвержден всего лишь у 1,7 % позитивно реагирующих животных. Результаты исследований указывают на то, что специфичность и чувствительность аллергической пробы очень низкая. При этом рутинные методы диагностики не позволяют своевременно обнаружить возбудителя в продуктах животноводства. Предложен метод прижизненной диагностики туберкулеза у животных с использованием крови, стимулятора роста и питательных сред ВКГ и «Микофаст». Поэтому применение прижизненного посева крови у коров представляет интерес как альтернативный метод диагностики.*

*The monitoring studies for the diagnosis of tuberculosis is established that the bacteriological diagnosis of tuberculosis was confirmed by only 1,7 % responding positively to animals. Research results indicate that the specificity and sensitivity of the allergy test is very low. In this case, the routine diagnostic methods do not allow early detection of the pathogen in livestock products. A method of in vivo diagnosis of tuberculosis in animals with blood, growth factors and growth media and VCG and Mikofast. Therefore the use of in vivo blood culture in cows is of interest as an alternative method of diagnosis.*

**Введение.** Для прижизненной диагностики туберкулеза в ветеринарной медицине применяется метод аллергической пробы. Этот метод получил название туберкулинодиагностики. История изготовления аллергена и использования туберкулинодиагностики тесно связана с открытием Р. Кохом в 1882 году возбудителя туберкулеза. Через 8 лет после его открытия Кох предложил в качестве лечебного препарата туберкулин. Надежды автора на высокую эффективность туберкулина не оправдались, но этот препарат в течение многих лет используется с диагностической целью [1, 2, 3].

В ветеринарной медицине давно существует проблема положительных реакций на туберкулин у коров при отсутствии у них видимых патологических изменений и отрицательных результатах бактериологического посева патологического материала на общепринятые питательные среды [4, 5, 6]. Выделение атипичных микобактерий не всегда может объяснить причину возникновения таких реакций. Использование методов выявления L (CWD) форм микобактерий туберкулеза показало, что причиной туберкулиновых реакций у коров может быть латентная туберкулезная инфекция [7].

Российские ученые [8] в 1997 году изучали методы выявления возбудителя туберкулеза в животноводческом сырье. Перед убоем на мясо животных подвергали туберкулинодиагностике, а после убоя исследование проводили бактериологическим методом с использованием различных питательных сред. По результатам исследований у 95,85 % животных, у которых была положительная реакция на