

вом на среды Гисса, серологические свойства - в реакции агглютинации с гомологичными агглютинирующими сыворотками.

Проверенные культуры из флаконов засеивали в 1-3 литровые бутылки, наполовину наполненные питательной средой, выращивали в течение 8-10 часов при температуре 37-38 °С, проверяли на чистоту роста и каждый штамм (*S. cholerae suis* 370, *S. typhimurium* 371, *S. dublin* 373) засеивали в отдельный реактор. Рост бактерий в реакторе вели при непрерывной аэрации и перемешивании среды механической мешалкой в течение 10-12 часов при температуре 37-38 °С. В процессе роста через каждые два часа брали пробы, определяли концентрацию микробных тел, чистоту культуры и рН, корректируя этот показатель 10%-ным раствором едкого натрия в пределах 7,6-7,8.

Концентрация сальмонелл, выращенных на опытных питательных средах, была на 1-2 млрд. ниже, чем в контрольной среде, и составила для *S. cholerae suis* 370 - 21 млрд., *S. typhimurium* 371 - 23 млрд., *S. dublin* - 25 млрд. микробных тел в 1 см³. Такое накопление бактериальной массы отвечает требованиям нормативно-технической документации по изготовлению и контроль против сальмонеллеза вакцин, выпускаемых УП «Витебская биофабрика».

Выращенные культуры разводили физиологическим раствором до концентрации 4 млрд. микробных клеток в 1 см³, добавляли формалин, периодически перемешивая. Для инактивации культур использовали формалин с содержанием не менее 36 % формальдегида.

Из инактивированных культур были приготовлены опытные серии вакцин против сальмонеллеза поросят и вакцины формолквасцовоной концентрированной против сальмонеллеза телят.

Приготовленные вакцины были подвергнуты контролю на стерильность, безвредность и активность в соответствии с требованиями технических условий на эти биопрепараты.

В результате проведенного контроля опытные вакцины были признаны стерильными, безвредными и активными.

Заключение. Экспериментальная работа позволяет заключить, что для получения белковых гидролизатов и приготовления на их основе питательных сред для культивирования сальмонелл можно использовать неприщевое сырьё – мясо выбракованных овец-доноров крови и волов-продукторов гипериммунных сывороток крови.

Литература. 1. Злобина, М.З. Использование некондиционных перепелиных яиц для изготовления гидролизатов / М.З. Злобина, Н.А. Ашикбаева, И.М. Смирнова // Сборник научных трудов ВГНКИ. – Москва, 1987. – С. 53-56. 2. Колабская, Л.С. Усовершенствование технологии изготовления белковых препаратов сыворотки крови птиц / Л.С. Колабская [и др.] // Сборник научных трудов ВГНКИ. – Москва, 1987. – С. 56-58. 3. Простяков, А.П. Физико-химические свойства сухих гидролизатов белков сыворотки крови / А.П. Простяков, С.И. Цыганкова, Л.И. Трусова // Сборник научных трудов ВГНКИ. – Москва, 1985. – С. 48-51. 4. Телишевская, Л.Я. Использование белковых отходов производства АТФ для получения гидролизатов / Л.Я. Телишевская [и др.] // Сборник научных трудов ВГНКИ. – Москва, 1984. – С. 15-19. 5. Телишевская, Л.Я. Получение гидролизатов из отходов производства пищевого пепсина / Л.Я. Телишевская [и др.] // Сборник научных трудов ВГНКИ. – Москва, 1985. – С. 88-90. 6. Цыганкова, С.И. Использование отходов глобулинового производства для приготовления гидролизатов / С.И. Цыганкова [и др.] // Сборник научных трудов ВГНКИ. – Москва, 1985. – С. 62-66. 7. Цыганкова, С.И. Получение альбумина и серопротеина при безотходной переработке сыворотки крови / С.И. Цыганкова [и др.] // Сборник научных трудов ВГНКИ. – Москва, 1985. – С. 58-62. 8. Цыганкова, С.И. Усовершенствованные технологии изготовления гидролизатов, полученных на основе ветеринарных биологических препаратов / С.И. Цыганкова, В.И. Космына, Г.Г. Гурбенко // Сборник научных трудов ВГНКИ. – Москва, 1987. – С. 113-114. 9. Чудинова, А.Д. Биохимические свойства гидролизатов ферментолизата биомассы микроорганизмов / А.Д. Чудинова // Сборник научных трудов ВГНКИ. – Москва, 1985. – С. 26-58.

УДК 619:615.373

ПРИГОТОВЛЕНИЕ АНТИГЕНА ИЗ ВАКЦИН ПРОТИВ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА И ПАСТЕРЕЛЛЕЗА ДЛЯ ГИПЕРИМУНИЗАЦИИ ПРОДУЦЕНТОВ ЛЕЧЕБНО-ПРОФИЛАКТИЧЕСКОЙ СЫВОРОТКИ

Медведев А.П., Кошнерова Л.А.

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

В работе использованы вакцины против сальмонеллеза и пастереллеза крупного рогатого скота. Из них был получен сальмонеллезно-пастереллезный антиген, пригодный для гипериммунизации волов с целью получения от них лечебно-профилактической сыворотки против сальмонеллеза и пастереллеза крупного рогатого скота.

At the scientific work were used vaccines against salmonellosis and pasterellosis of cattle. From his was received salmonellas and pasteurellas antigen, suitable for hyperimmunization of ox for the purpose to receive from they treatment and preventive serum against salmonellosis and pasterellosis of cattle.

Введение. Повышение рентабельности животноводства Республики Беларусь в определенной мере зависит от благополучия хозяйств по инфекционным болезням, которое в значительной степени обеспечивается применением средств специфической профилактики, диагностики и лечения животных.

Основным компонентом вакцин для активной профилактики инфекционной патологии животных является антиген, качество которого определяет специфичность и иммуногенность этих препаратов. Превентивная активность лечебно-профилактических сывороток связана с концентрацией в них специфических антител, уровень которых предопределяется иммуногенностью антигена, предназначенного для гипериммунизации продукторов,

схемой его применения и иммунной реактивностью организма этих животных.

От количества антигенов, входящих в состав ассоциированных вакцин, зависит широта спектра их иммуногенности, в связи с чем при применении таких препаратов можно обеспечивать формирование у животных иммунитета против нескольких болезней. Наличие антител в лечебно-профилактических специфических средствах к различным антигенам расширяет границы их применения при создании пассивного иммунитета и лечении больных животных. Поэтому при производстве гипериммунных сывороток продуцентов иммунизируют антигеном, приготовленным из микроорганизмов разных видов, или же из бактерий различных штаммов одного вида.

Препараты, приготовленные из нескольких типов одного вида бактерий, называют поливалентными, а из разных видов возбудителей – ассоциированными [1].

Способность организма животных и человека отвечать выработкой специфических антител на совместное, одновременное введение различных антигенов широко используют при конструировании вакцин и лечебно-профилактических сывороток. Многие исследователи [2,3,4,5,6], занимаясь изучением возможности получения ассоциированных препаратов, пришли к положительному разрешению вопроса при целом ряде инфекций.

Поэтому литературные данные побудили нас провести экспериментальную работу по получению антигена для гипериммунизации волов, из крови которых можно было бы приготовить активную сыворотку против сальмонеллеза и пастереллеза крупного рогатого скота, тем более что указанные болезни часто поражают этот вид животных, имеют повсеместное распространение и могут протекать одновременно.

Материалы и методы. Для конструирования сальмонеллезно-пастереллезного антигена, предназначенного для гипериммунизации волов-продуцентов с целью получения от них гипериммунной сыворотки, содержащей антитела к сальмонеллам и пастереллам, мы решили использовать выпускаемые биологической промышленностью вакцины – формолквасцовую концентрированную против сальмонеллеза телят и полужидкую гидроокисьалюминиевую против пастереллеза крупного рогатого скота. Первая указанная вакцина представляет собой инактивированную смесь сальмонелл (*S. typhimurium* 371, *S. dublin* 373), выращенных на бульоне Хоттингера. Она предназначена для вакцинации телят и стельных коров против сальмонеллеза. Вторая упомянутая вакцина применяется для иммунизации телят в возрасте от одного месяца и старше. Препарат готовят из штаммов *Pasteurella multocida* № 796, 5264, культивированных на жидкой питательной среде и инактивированных теплом и формалином.

Основной задачей при конструировании ассоциированных антигенов является подбор оптимальных (иммуногенно сбалансированных) компонентов, входящих в состав препарата.

Для получения ассоциированного сальмонеллезно-пастереллезного антигена вакцину формолквасцовую концентрированную против сальмонеллеза телят смешивали с вакциной полужидкой гидроокисьалюминиевой против пастереллеза крупного рогатого скота в соотношении 1:1, 1:2, 1:3, 2:3 соответственно. Полученную таким образом смесь вакцин считали ассоциированным антигеном, который подвергали контролю на стерильность, безвредность и иммуногенную активность для лабораторных животных.

Для испытания на стерильность антиген высевали по 0,2 - 0,3 см³ в пробирки с МПА, МПБ, МППБ под вазелиновым маслом, со средой Сабуро и по 1-2 см³ во флаконы с МПБ и средой Китта-Тароцци. Посевы проводили в две пробирки и два флакона с каждой средой и помещали в термостат, поддерживающий температуру 37-38 °С. Спустя трое суток из жидких питательных сред делали пересевы по 1-2 см³ в два флакона со средой Китта-Тароцци. Первичные посевы и среду Сабуро выдерживали в термостате в течение 10, а пересевы – 7 суток. Антиген признавали стерильным при отсутствии видимого роста во всех средах.

Для определения безвредности антигена его вводили подкожно пяти белым мышам массой 16-18г в дозе 0,3 см³ и двум кроликам массой 1,5-1,8 кг также подкожно в дозе 5 см³. Антиген считали безвредным, если лабораторные животные в течение 10 суток после его введения оставались живыми и клинически здоровыми.

Иммуногенную активность ассоциированного антигена в отношении сальмонеллезных свойств определяли на морских свинках массой 350-400г, которым вводили его подкожно в область живота в дозах 0,25 и 0,5 см³. На каждую дозу использовали по 5 морских свинок. Через 16 суток иммунизированных животных вместе с пятью интактными свинками (контроль) заражали заранее подготовленной смертельной дозой агаровой культуры *S. typhimurium* 371 и *S. dublin* 373. На каждый штамм брали отдельную группу животных. Антиген считали иммуногенным в случае выживания не менее 8 из 10 иммунизированных свинок при гибели не менее 4 из 5 контрольных.

Иммуногенность антигена в отношении пастереллезного компонента проверяли на голубях. Для этого антиген вводили голубям внутримышечно двукратно с интервалом 7-10 дней, первый раз в дозе 1 см³, второй – 3 см³. Затем через 16-20 суток проводили заражение иммунизированных и 4 контрольных (не получивших антиген) голубей подтитрованной смертельной дозой бульонной культуры *P. multocida* (штамм № 796 и № 5264). Антиген считали активным при выживании 4 из 5 иммунизированных и гибели в течение 2-3 суток не менее 3 контрольных голубей.

Каждый вариант ассоциированного антигена (1:1, 1:2, 1:3, 2:3) проверяли вышеописанными методами на стерильность, безвредность и иммуногенную активность. Кроме этого, перед иммунизацией лабораторных животных в антигене контролировали концентрацию водородных ионов с помощью потенциометра марки ЛПУ-01. Для инъекций использовали антиген с рН в пределах 7,01-7,02.

Результаты исследований. Проведенная опытная работа позволила получить следующие результаты.

Каждый вариант ассоциированного антигена оказался стерильным, безвредным, с показателем рН, близким к нейтральному значению.

Белые мыши при подкожном введении антигена оставались клинически здоровыми в течение 10 суток наблюдения за ними (табл. 1).

Таблица 1 — Результаты контроля величины pH, стерильности и безвредности.

Соотношение вакцин в антигене	Величина pH	Рост на средах				Выживаемость белых мышей	
		МПБ	МПА	МППБ под вазелиновым маслом	Среда Сабуро	Выжило	Пало
1:1	6,9	-	-	-	-	5	0
1:2	7,1	-	-	-	-	5	0
1:3	6,9	-	-	-	-	5	0
2:3	7,1	-	-	-	-	5	0

Примечание: «-» - рост микроорганизмов не обнаружен.

Для испытания иммуногенной активности антигена в отношении *S. dublin* 373 всех иммунизированных морских свинок и 5 контрольных (не получивших антиген) заражали подкожно заранее подтитрованной смертельной дозой агаровой культуры указанного штамма сальмонелл. За животными вели ежедневное наблюдение, регистрируя павших свинок.

Результаты этого опыта представлены в таблице 2.

Таблица 2 — Иммуногенная активность ассоциированного антигена в отношении *S. dublin* 373

Варианты антигена	Доза антигена (см ³)	Количество морских свинок на дозу	Результат заражения морских свинок <i>S. dublin</i> 373	
			Пало	Выжило
1:1	0,2	5	1	4
	0,5	5	0	5
1:2	0,2	5	1	4
	0,5	5	0	5
1:3	0,2	5	1	4
	0,5	5	0	5
2:3	0,2	5	0	5
	0,5	5	0	5
Контроль		5	5	0

Из таблицы видно, что все контрольные свинки пали, а животные, получившие антиген в дозе 0,5 см³ каждого из испытанных вариантов ассоциированного антигена, выжили, за исключением падежа по 1 из 5 свинок трех первых вариантов (1:1, 1:2, 1:3), иммунизированных антигеном в дозе 0,2 см³.

В таблицу 3 сведены данные, полученные в результате заражения опытных морских свинок бактериями *S. typhimurium* 371. Для постановки острого опыта использовали агаровую культуру этого штамма.

Таблица 3 — Активность сальмонеллезного компонента антигена в отношении *S. typhimurium* 371

Варианты антигена	Доза антигена (см ³)	Количество морских свинок на дозу	Результат заражения морских свинок <i>S. typhimurium</i> 371	
			Пало	Выжило
1:1	0,2	5	0	5
	0,5	5	0	5
1:2	0,2	5	1	4
	0,5	5	0	5
1:3	0,2	5	1	4
	0,5	5	0	5
2:3	0,2	5	0	5
	0,5	5	0	5
Контроль		5	4	1

Данные таблицы свидетельствуют о высокой активности сальмонеллезного компонента ассоциированного антигена в отношении *S. typhimurium* 371. Так, все морские свинки, получившие антиген в дозе 0,5 см³, остались живыми, и лишь по 1 морской свинке из 5, иммунизированных антигеном в дозе 0,2 см³, составленным из вакцин в соотношении 1:2 и 1:3, погибли.

В таблице 4 мы приводим данные, полученные в результате испытания иммуногенной активности пастереллезного компонента всех вариантов ассоциированного антигена.

Заражение опытных и контрольных голубей проводили бульонной культурой пастерелл, выращенной в течение 24 часов.

Таблица 4 — Активность пастереллезного компонента ассоциированного антигена для голубей

Варианты антигена	Результат заражения <i>Pasteurella multocida</i> № 796			Результат заражения <i>Pasteurella multocida</i> № 5264		
	Количество иммунизированных голубей	Пало	Выжило	Количество иммунизированных голубей	Пало	Выжило
1:1	5	3	2	5	4	1
1:2	5	3	2	5	2	3
1:3	5	0	5	5	0	5
2:3	5	0	5	5	0	5
Контроль	5	4	1	5	5	0

Данные таблицы показывают, что пастереллезный компонент антигена, составленного из вакцин в соотношении 1:1 и 1:2, несмотря на двухкратную внутримышечную иммунизацию голубей в дозах 1 и 3 см³ не защищает от гибели 3 из 5 особей, как в отношении *P. multocida* № 796, так и в отношении *P. multocida* № 5264. Напротив, все голуби, получившие антиген вариантов 1:3 и 2:3, остаются живыми.

Заключение. Проведенная опытная работа позволяет заключить следующее. Нами было составлено четыре варианта антигена из вакцины формолквасцовой концентрированной против сальмонеллеза телят и вакцины полужидкой гидроокисьюалюминиевой против пастереллеза крупного рогатого скота. Использование ассоциированного антигена расцениваем положительно, так как изготавливаемые биопредприятием препараты выпускаются для практического применения после контроля их качества и являются довольно стабильными в отношении биологических свойств. Все полученные нами варианты ассоциированного антигена имели концентрацию водородных ионов, близкую к нейтральному значению, были стерильными и безвредными для белых мышей. Ассоциированный антиген, составленный из вакцин в соотношении 1:1, 1:2, 1:3 и 2:3, обладал способностью вызывать защиту иммунизированных свинок при контрольном заражении их как культурой бактерий *S. dublin* 373, так и *S. typhimurium* 371.

Пастереллезный компонент ассоциированного антигена вариантов 1:1 и 1:2 предохраняет от гибели только лишь 3 из 5 иммунизированных голубей, как в отношении *P. multocida* штамма № 796, так и бактерий *P. multocida* штамма № 5264. Соотношение вакцин в ассоциированном антигене 1:3 и 2:3 оказалось наиболее иммуногенно сбалансированным, что подтверждается выживанием всех опытных голубей при заражении их бульонной культурой *P. multocida* штаммов № 796 и № 5264. Опытные данные позволяют нам утверждать, что ассоциированный антиген из вакцин в соотношении 1:3 является стерильным, безвредным, активным и пригодным для гипериммунизации волов-продуцентов сыворотки против сальмонеллеза и пастереллеза крупного рогатого скота, так же как и антиген варианта 2:3, но это соотношение вакцин в препарате увеличивает их расход и ведет к удорожанию антигена.

Литература. 1. Вербицкий, А.А. Питательные среды и культивирование микроорганизмов/ А.А. Вербицкий, А.П. Медведев// УО ВГАВМ. – Витебск, 2008. – 236с. 2. Колычев, Н.М. Ветеринарная микробиология и иммунология/ Н.М. Колычев, Р.Г. Госманов// Москва: Колос С, 2003г. – 432с. 3. Разработка средств специфической профилактики инфекционных болезней животных / В.В. Максимович [и др.] // Ученые записки: сборник научных трудов по материалам международной научно-практической конф. «Актуальные проблемы ветеринарной медицины и зоотехнии», посвященной 80-летию основания 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. 4. Медведев, А.П. Противобактериальные лечебно-профилактические сыворотки/ А.П. Медведев// УО ВГАВМ. – Витебск, 2007. – 379с. 5. Раевский, А.А. Разработка технологии культивирования и изготовление ассоциированной вакцины против стрептококкоза, гемофилеза и пастереллеза свиней// А.А.Раевский [и др.]// Материалы междунар. научн.-практич. конф., посвященной 80 – летию ФГУП «Щелковский биокOMBинат», 20-23 сентября 2004г. – Щелково, 2004 – С. 173-174. 6. Школьников, Е.Э. Испытание сыворотки против гемофилеза и пастереллеза свиней/ Е.Э. Школьников [и др.]// Материалы междунар. научн.-практич. конф., посвященной 80 – летию ФГУП «Щелковский биокOMBинат», 20-23 сентября 2004г. – Щелково, 2004. – С. 56-57.