

## ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОТИВОПАСТЕРЕЛЛЕЗНОЙ ВАКЦИНЫ ИЗ ЭПИЗООТИЧЕСКИХ ШТАММОВ ВОЗБУДИТЕЛЯ

С.Л. Григорян, А.Р. Мкртчян, М.А. Саркисян, Н.А. Мусаелян  
Государственный аграрный университет Армении

**Ключевые слова:** пастереллез, штамм, антиген, иммунитет, вакцина.

**П**астереллез, или геморрагическая септицемия, – инфекционная болезнь многих видов млекопитающих и птиц, характеризующаяся отечным синдромом, поражением легких, суставов и кишечника. Несмотря на то, что болезнь обычно проявляется в виде энзоотий, при неблагоприятных климатических условиях у крупного рогатого скота она составляет 70-80 %, нередки и случаи падежа больных животных [1].

В комплексе мер по диагностике и предупреждению пастереллеза немаловажное место отводится серологической идентификации различных штаммов *Pasteurella multocida*, что позволяет детально изучить антигенное родство выделенных штаммов и их распространенность среди различных видов животных [2].

Перед нами была поставлена задача получить чистую культуру возбудителя, установить возможную связь между антигенной активностью и вирулентными свойствами пастерелл, а также приготовить эмульсионную вакцину, отличающуюся выраженными иммуногенными свойствами.

В целях изучения агглютинирующей способности и превентивных свойств сыворотки крови исследования проводили с тремя штаммами пастерелл, выделенных из крови и внутренних органов павшего от пастереллеза крупного рогатого скота. Для определения вирулентности пастерелл белым мышам методом подкожной инъекции вводили по 0,5 мл бульонной культуры и смыва с поверхности агаровой культуры, содержащих 200 тыс. бактериальных клеток. В течение 24-30 ч после заражения все подопытные мыши пали, а результаты бактериологического исследования внутренних органов павших мышей подтвердили наличие пастереллезной инфекции. Таким образом, выделенные из трупов заболевших и павших от пастереллеза крупного рогатого скота эпизоотические штаммы возбудителя идентифицировали методами бактериологических, культуральных и биологических исследований.

После определения вирулентности выделенных штаммов пастерелл четыре кролика, разделенные на две группы, были иммунизированы биопрепаратом, полученным термической обработкой пастерелл. Миллиардную взвесь 24-часовой агаровой культуры инактивировали в водяной бане при температуре 70° С в течение 30 минут. Стерильность биопрепарата проверяли методом посева на искусственные питательные среды. Перед иммунизацией кроликов термометрировали и проверяли на предмет пастереллоносительства. Инактивированный антиген вводили кроликам обеих групп подкожно в количестве 1 мл четыре раза через каждые семь дней. После каждой инъекции дозу вводимого антигена увеличивали на 500 млн инактивированных микроорганизмов. Таким образом, первый раз кроликам вводили 1 млрд, во второй раз – 1,5 млрд, а в третий и четвертый разы – соответственно 2 и 2,5 млрд микробных клеток. Через семь дней кроликам вводили вирулентный штамм *Pasteurella multocida*, при этом первой группе инъецировали смешанную микробную взвесь из трех выделенных из трупов крупного рогатого скота штаммов пастерелл.

Кроликов второй группы заразили тем же количеством антигена, полученного из штамма N2. Для определения титра антител перед каждой иммунизацией кроликов проводили забор крови, из полученной сыворотки готовили разведения в соотношении от 1:5 до 1:320. Необходимо отметить, что при иммунизации кроликов инактивированными пастереллами специфические антитела по отношению к испытуемым штаммам возбудителя в сыворотке крови животных обнаружены не были. При этом заражение кроликов живыми штаммами пастерелл провоцировало выработку специфических антител в высоких титрах уже через семь дней после инъекции. Для приготовления вакцины из наиболее агглютиногенного штамма N1 была получена взвесь микроорганизмов в количестве 500 мл, содержащая в 1 мл 20 млрд пастерелл, инактивированных раствором формальдегида, добавленного с таким расчетом, чтобы его количество в биопреparate составило 0,1%, что равноценно 0,25%-ому раствору формалина. Таким образом, к 500 мл микробной взвеси добавили 1,25 мл формалина и после тщательного перемешивания поместили в термостат при 37° С на 24 часа. По окончании указанного срока биопрепарат подвергли

проверке на микробиологическую стерильность и безвредность, при этом первый показатель определяли методом посева на жидкие и плотные питательные среды, а второй – подкожным введением белым мышам 0,5 мл препарата. Получив чистую с точки зрения посторонних микроорганизмов и безвредную микробную взвесь, дальнейшую работу следовало направить на приготовление эмульсионной вакцины. С этой целью был получен масляный адьювант, состоящий из 17% безводного ланолина и 83% легкого минерального масла. Указанные составные части брали в объемных соотношениях и смешивали с помощью магнитной мешалки. Итак, получение эмульсии «вода – масло» из ланолина и минерального масла и обезвреженной 20-ти млрд бактериальной взвеси позволило подвергнуть последнюю дисперсии в этой эмульсии с таким расчетом, чтобы соотношение микробной взвеси и адсорбента составило соответственно 52-48%. Полученную вышеописанным методом эмульсионную вакцину разливали в стерильные флаконы объемом 100 мл.

Очевидно, что все три исследуемых штамма пастерелл отличаются друг от друга антигенным свойством, при этом агглютинирующие свойства лучше выражены у штамма N1. Если при четырехкратной иммунизации кроликов инактивированным антигеном образование агглютининов ко всем исследуемым штаммам было значительно ниже положительного показателя, то на пятую инъекцию, проводимую вирулентными штаммами возбудителя, организм животных отвечает довольно высоким титром специфических антител. В этой связи примечателен тот факт, что даже при разведении полученной сыворотки крови в соотношении 1:80 наблюдается стопроцентная агглютинация антигена. Высокий титр антител сохраняется также при разведении сыворотки крови в соотношении 1:320, при этом реакция агглютинации оценивается в три плюса (на 75%). Выраженная антигенная активность штамма N1 по сравнению с двумя другими штаммами пастерелл проявляется в том, что на фоне четырехкратной иммунизации кроликов инактивированной взвесью штамма N2 образование специфических антител по отношению к возбудителю штамма N1 происходит лишь после заражения животных взвесью из всех трех патогенных штаммов пастерелл. При этом агглютинирующий эффект по сравнению со штаммами N1 и N2 составил всего 75%, и то при разведении сыворотки крови в соотношении 1:5 и 1:10. Примечательно, что при гипериммунизации животных возбудителями штамма N2 и заключительном заражении той же культурой пастерелл титр образующихся антител значительно уступает аналогичным показателям, выявляемым при использовании штамма N1. Так, если при применении штамма N1 наблюдается 75%-ный эффект агглютинации в случае разведения сыворотки крови 1:320, то по отношению к возбудителю штамма N2 аналогичный эффект агглютинации наблюдается только при разведении сыворотки крови 1:10, при разведении же в соотношении 1:320 эффект агглютинации неизменно отрицательный. Почти аналогичные результаты были получены и при исследовании штамма N3 пастерелл. Фактически ответная реакция организма животных к возбудителям штаммов N1 и N3 не должна отличаться по интенсивности, однако в связи со слабой агглютинирующей способностью штамма N3 агглютинирующий эффект сыворотки крови проявляется при более низких разведениях. Агглютинирующий эффект сыворотки крови кроликов второй группы свидетельствует о зависимости титра агглютинации не только от антигенной активности, но и от вирулентности штаммов пастерелл. Слабые антигенные свойства штамма N2 определенно отразились на иммунологическом ответе организма кроликов второй группы, которых иммунизировали сначала инактивированными, а затем и патогенными возбудителями данного штамма. Ожидаемый агглютинирующий эффект сыворотки крови по отношению к возбудителям штамма N2 значительно уступал по интенсивности агглютинирующим свойствам сыворотки крови, наблюдаемым после заражения кроликов штаммами N1 и N3, которые не применялись для иммунизации кроликов второй группы. Описанное явление можно объяснить тем, что штаммы N1 и N3 характеризуются некоторой общностью антигенов, поэтому антитела, синтезированные в организме иммунизированных животных в ответ на введение возбудителей штамма N2, вступают в перекрестную реакцию с антигенами преимущественно штамма N1 и в определенной степени штамма N3 пастерелл. Показатели этих иммунологических реакций при разведении сыворотки крови 1:5 составляют соответственно 75 и 50 %. При этом проявляется также выраженное родство между антигенными структурами возбудителей штаммов N1 и N2.

Для приготовления эмульсионной вакцины был использован штамм N1 как наиболее иммуногенный. В целях подтверждения требований, предъявляемых к качеству биопрепаратов, приготовленная нами вакцина была исследована на стерильность, стабильность, безвредность и иммуногенную активность. Стерильность биопрепарата определяли методом проведения посевов в мясопептонный бульон, на агар Хоттингера и в печеночно-бульонную среду Китт-Тароци с выдерживанием в термостате при 37°C в течение 24-х часов. Для определения стабильности эмульсии два флакона с биопрепаратом помещали в термостат при 37°C с выдержкой в две недели. В течение указанного времени изменений физических свойств содержимого флаконов не наблюдалось, кроме образования слегка заметного надосадочного кольца желтоватого цвета высотой 0,5 см. Безвредность вакцины определяли путем подкожной инъекции трем белым мышам по 0,5 мл и двум кроликам по 1 мл биопрепарата. В течение 10 дней наблюдения у подопытных животных признаков нарушения здоровья не

наблюдалось. Для подтверждения наличия иммуногенной активности эмульсионной вакцины две группы кроликов, по шесть в каждой, методом аналогов были разделены на контрольные и опытные. Кроликам опытной группы вакцину в объеме 1,5 мл ввели внутримышечно в область внутренней поверхности бедра, в то время как кролики второй группы служили контролем вирулентности возбудителя пастереллеза крупного рогатого скота. Через 12 дней после инъекции биопрепарата 12 кроликов из опытной и контрольной групп были заражены смертельной дозой возбудителя пастереллеза крупного рогатого скота, составившей 0,5 мл 24-часовой бульонной культуры в разведении 1:10. После заражения кролики контрольной группы пали уже в течение 24-70 ч, в то время как все вакцинированные животные выжили. Из трупов павших кроликов была выделена чистая культура возбудителя пастереллеза.

Таким образом, исследования позволяют сделать следующие выводы:

1. Отдельные штаммы возбудителя пастереллеза характеризуются антигенными и агглютинирующими свойствами различной интенсивности.
2. Четырехкратная иммунизация кроликов термически инактивированными пастереллами не приводит к образованию должного уровня антител, заражение же вирулентными штаммами возбудителя обеспечивает ответную реакцию организма, проявляющуюся резким повышением титра агглютининов.
3. Из трупов крупного рогатого скота, павшего от острой формы пастереллеза, были выделены возбудители, обладающие высокой вирулентностью и иммуногенной активностью. Вакцина, приготовленная из эпизоотических штаммов пастерелл, стерильна, безвредна, стабильна и вызывает активный иммунитет у привитых животных.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Конопаткин А.А. Эпизоотология и инфекционные болезни сельскохозяйственных животных. – М.: Колос, 1984. – С. 210-217.
2. Масимов Н.А. Пастереллез животных. – М.: 1984. – 21 с.

## ՀԱՎԱԳԱՍՏԵՐԵԼՅԱԿԱՆ ՊԱՏՎԱՍՏԱՆՅՈՒԹԻ ՊԱՏՐԱՍՏՈՒՄԸ ՀԱՐՈՒՑԻՉԻ ՀԱՄԱՃԱՐԱԿԱՅԻՆ ՇՏԱՆՆԵՐԻՑ

Ս.Լ. Գրիգորյան, Ա.Ռ. Մկրտչյան, Մ.Ա. Սարգսյան, Ն.Ա. Մուսայելյան  
Հայաստանի պետական ագրարային համալսարան

Հողվածում ներկայացված են պատերեյրոզից անկած խոշոր եղջերավոր կենդանիներից անջատված հիվանդության հարուցչի ձևաբանական առանձնահատկության և վարակունակության ցուցանիշները: 20 միլիարդանոց մանրէական կախուկն ակտիվազրկվել է 0,1%-անոց ֆորմալդեհիդի լուծույթով, այնուհետև անջուր լանոլինի և թեթև հանքային յուղի միջավայրում ենթարկվել դիսպերսիայի հակապատերեյրոզային էմուլսիոն պատվաստանյութ ստանալու նպատակով: Բացահայտվել է, որ ստացված կենսապատրաստուկը ստերիլ է, կայուն, անվտանգ և օժտված է բարձր իմունածին հատկություններով:

## PREPARATION OF THE ANTI-PASTEURELLOSIS VACCINE FROM EPIDEMIOLOGICAL STRAINS

S. Grigoryan, M. Sargsyan, A. Mkrtchyan, N. Musayelyan  
State Agrarian University of Armenia

**Keywords:** pasteurulosis, strain, antigen, immunity, vaccine

The article deals with the indices of morphological characteristics and virulence of pathogen isolated from cattle dead from pasteurulosis. The 0.1% formaldehyde extract of germs, which contain 20 milliard bacterial cells, has been dissolved in water free lanolin and light mineral oils emulsion. This biopreparation completely fits for prophylaxis of animal pasteurulosis.

УДК 599(479.25)

## ЗАЩИТА ОСОБО ЦЕННЫХ ВИДОВ МЕЛКИХ МЛЕКОПИТАЮЩИХ НА ОХРАНЯЕМЫХ ТЕРРИТОРИЯХ АРМЕНИИ

Г.Т. Макичян, А.Э. Явруян  
ГОУ ВПО Российско-Армянский (Славянский) университет

**Ключевые слова:** сельскохозяйственные животные, ООПТ, заповедник, национальный парк.

**Н**а сравнительно небольшой (около 30000 км<sup>2</sup>) территории Армении расположено значительное количество охраняемых государством участков, где наряду с дикими видами фауны встречаются животные разного сельскохозяйственного назначения – «вредные» и «полезные».

Если на таких особо охраняемых территориях (ООПТ), как заповедники (Хосровский-Гарнийский, Шикаохский, Эребунийский), нахождение домашних видов животных категорически запрещено (что у нас не всегда соблюдается, а в заказниках это правило действует частично), то на территориях национальных парков (Дилижан, Севан) такое положение допускается. Следовательно, для охраны этих видов мониторинг их исследования рассматривается в разных аспектах, в зависимости от места и условий обитания. Однако главное, что следует отметить, – это случаи, когда все виды животных, в том числе и сельскохозяйственные, так или иначе охраняются лучше, чем на не охраняемых законом и специальными службами территориях.

Если учесть, что к особо ценным сельскохозяйственным видам животных относятся также животные охотничье-промыслового назначения, в том числе и пушные зверьки, то неоспорима необходимость охраны последних. Чтобы не быть голословным, перечислим некоторые из них. Это крот – *Talpa orientalis*; заяц-русак – *Lepus europaeus*; белка – *Sciurus persicus*; соня-полчок – *Glis glis*. К пожирателям так называемых сельскохозяйственных «вредителей» из числа пушных животных относятся ласка – *Mustela nivalis* и каменная куница – *Martes foina*, а из обитателей водоемов (в том числе и в ракоразводных хозяйствах) – выдра – *Lutra lutra*; ондатра – *Ondatra zebethius*; нутрия – *Miocastor coyrus* [1-3].

Многолетние наблюдения позволяют предположить, что в тех случаях, когда численность сельскохозяйственных животных (в данном случае грызунов-вредителей) на сельхозугодьях достигает угрожающей цифры и не помогают даже химические методы борьбы с ними в отличие от тех мест, где не отведенная под сельское хозяйство