

3. Кореляція між значеннями титрів віруснейтралізуючих антитіл в сироватках крові м'ясоїдних, досліджених методами FAVN та ELISA, становить 0,97.

Список літератури

1. Kennedy, J. Quarantine and Rabies: A Reappraisal. Report by the advisory group on Quarantine to the right hon nick brown MP, Minister of agriculture, fisheries and food. MAFF publication, London, 1998, p. 313.
2. Klingeborn B., Krogsrud J. Vaccination and antibody testing replacing quarantine as rabies safety measure for transfer of dogs and cats into Sweden and Norway from EU/EFTA-countries. Rabies Bull. Eur. 17 (4), 1993, p. 13.
3. EC Regulation № 998/2003 of the European parliament and of council of 26 may 2003 on the animal health requirements applicable to the non-commercial movements of pets animal.
4. Matouch O. and Vitasek J. Rabies situation and rabies control in the Czech Republic 2000-2002. Rabies Bulletin of Europe, 2002, 4:5-10.
5. Романенко, О.А., Дрожде Ж.М. Оцінка ефективності пероральної вакцинації проти сказу диких м'ясоїдних в Україні // Ветеринарна біотехнологія. – Київ. – 2008. – 13 (1). – С.346-352.
6. Cliquet, F., Aubert, M. Elimination of Terrestrial Rabies in Western European Countries//Control of Infectious Diseases by Vaccination. Dev Biol, Karger, 2004, vol. 119, pp 185-204.
7. The oral vaccination of foxes against rabies. Report of the Scientific Committee on Animal Health and Animal Welfare, October 2002, European Commission, 55 p.
8. Manual of Standards for Diagnostic Test and Vaccines/ Office International epizootic (OIE),-2004.
9. Laboratory Techniques in Rabies/ WHO, Fourth Edition, -1996.
10. WHO Expert Consultation on Rabies: First Report, Geneva,-2004.

VALIDATION OF ELISA FOR DETERMINING OF RABIES VIRUS-NEUTRALIZING ANTIBODY

Drozhzhe Zh.M.

State Scientific and Research Institute of Laboratory Diagnostics and Veterinary and Sanitary Expertise, Kyiv

The article presents results of validation of test-kit Platelia Rabies Kit II manufactured by Bio-Rad to detection rabies virus-neutralizing antibody titer in serum after vaccination of carnivorous by ELISA

УДК 619 615.371 / 372 : 616.986.7

РАЗРАБОТКА СПОСОБА КОНСЕРВАЦИИ ЛЕПТОСПИР ПРИ ИЗГОТОВЛЕНИИ БИОПРЕПАРАТОВ

Зайцев В.В., Дремач Г.Э.*

УП «Витебская биофабрика»

**УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск*

Первую вакцину против лептоспироза предложили в 1916 году Wani, Ido, Hoki в Японии для профилактики заболевания у шахтеров. Первоначально это была суспензия печени зараженных лептоспирозом морских свинок, а затем – культура, выращенная на сывороточной среде и инактивированная формалином.

В СССР вакцину против лептоспироза животных из лептоспир серогрупп Помона и Гриппотифоза впервые применили в 1947 году. Она представляла собой смесь 2 культур, инактивированных формалином. В дальнейшем в ее состав ввели лептоспиры серогрупп Иктерогеморрагия и Каникола (1952-1956), Тарассови (1959-1962), Гебдомадиз и Ваталия (1965-1966).

В 1978 году в ветеринарную практику внедрили депонированную вакцину из штамма ВГНКИ, которая успешно применяется до настоящего времени. Однако эпизоотическая ситуация по лептоспирозу остается напряженной.

Перекрестный иммунитет между лептоспирами различных серогрупп, а в ряде случаев и сероваров, либо не создается, либо очень слабо выражен. Поэтому вакцина, которая могла бы быть эффективной против всех лептоспир, должна содержать большинство сероваров. Изготовление такой вакцины технически не осуществимо, поэтому в каждом отдельном случае целесообразно определить – вакцина какого состава необходима для животных данного вида в определенном регионе [1].

Проведенное изучение этиологической структуры болезни позволило с достаточным основанием включить в состав вакцины против лептоспироза свиней серовары лептоспир: *L. pomona*, *L. tarassovi* и *L. icterohaemorrhagiae*.

Эпизоотические показатели свидетельствуют о необходимости дальнейшего совершенствования средств специфической профилактики лептоспироза животных. В порядке реализации этой задачи в 1990 году в России внедрили концентрированную, а в 1996 году – сухую вакцину. Однако концентрированная вакцина не получила практического применения из-за выпадения не разбивающегося осадка при длительном хранении [2, 3].

В связи с вышеизложенным, одним из ключевых моментов в разработке высокоэффективной вакцины против лептоспироза является подбор консерванта, который бы обеспечивал сохранение целостности бактериальных клеток и специфических антигенов в составе препарата в течение продолжительного периода его хранения.

Материалы и методы исследований. В работе использовали 5 производственных штаммов лептоспир: *L. pomona*; *L. tarassovi*; *L. grippotyphosa*; *L. icterohaemorrhagiae*; *L. canicola*.

Для культивирования лептоспир в опытах использовали следующие питательные среды: сывороточная среда (СС); сывороточная модифицированная среда с липополисахаридом сальмонелл (СМС-ЛПСС); сывороточная модифицированная среда с липополисахаридом эшерихий (СМС-ЛПСЭ). Штаммы лептоспир пересекали каждые 15-20 дней.

Наличие роста определяли просмотром пробирок в проходящем свете микроскопа и микроскопией капель культур в темном поле микроскопа. Чистоту культур проверяли высевом на МПБ, МПА, МППБ и среду Сабуро, а также просмотром культур в проходящем свете и микроскопией.

Серогрупповую принадлежность штаммов лептоспир контролировали в перекрестной РМА с групповыми агглютинирующими лептоспирозными сыворотками согласно «Методическим указаниям по лабораторной диагностике лептоспироза животных».

Концентрацию лептоспир определяли путем подсчета в счетной камере Петрова-Хауссера.

В исследованиях использовали животных: кроликов породы шиншилла массой 3,0-3,5 кг; золотистых хомячков массой 40-50 г; белых мышей массой 18-20 г; морских свинок массой 120-150 г; морских свинок массой 350-400 г.

Для оценки антигенной и иммуногенной активности лептоспир, культуры выращенные на средах разного состава, консервировали следующими веществами: способ 1 – формалином 0,3 %; способ 2 – формалином 0,2 % и 0,01 % натрия мертиолятом; способ 3 – фенолом 0,3 %; способ 4 – фенолом 0,5 %; способ 5 – теотропином 0,1 %; способ 6-0,02 % натрия мертиолятом; способ 7 – формалином 0,3 и до 5 % глюкозой; способ 8 – формалином 0,2 %, 0,01 % натрия мертиолятом и 5 % глюкозой; способ 9 – формалином 0,3 % и 5 % натрия тиосульфата; способ 10 – фенолом 0,5 % и 5 % натрия тиосульфата.

Смесь лептоспир и консерванта инкубировали при температуре 37 °C и 28 °C в течение 48 часов. Консервированные разными способами лептоспиры далее концентрировали в 2 раза и учитывали в дальнейшем наличие клеток в гущенной культуре.

Розділ 4. Розробка та виробництво ветеринарних імунобіологічних препаратів

Далее проводили сравнительную оценку методов консервации лептоспир по тесту терморезистентности. Для этого консервированные разными методами культуры лептоспир инкубировали при температуре 56 °С в течение 180 минут.

Для изучения антигенной активности консервированных разными способами лептоспир готовили образцы поливалентного антигена, в составе которого содержалось по 23 млн.м.к./см³ каждого серотипа микроорганизмов. Антигены вводили кроликам внутривенно в дозе 0,6 см³. На каждую серию антигена использовали по 5 кроликов. Через 24 часа у лабораторных животных производили забор крови, получали из нее сыворотку и определяли в ней титры антител в РМА.

В заключительном опыте изучали безвредность и протективную активность полиантигенов, консервированных разными способами.

Протективные свойства сыворотки крови исследовали на золотистых хомячках, используя по 10 зверьков в группе. Хомячкам внутримышечно вводили по 0,5 см³ сыворотки и через 2 часа заражали смертельной дозой лептоспир (10 LD₅₀). Обязательным условием опытов был 100 %-ный падеж зараженных хомячков в контрольной группе.

Морским свинкам массой 140-150 г вводили по 0,6 см³ приготовленных разными способами полиантигенов. Через 24 суток после введения полиантигена животных инфицировали живыми культурами лептоспир в дозе 2 LD₅₀.

Безвредность полиантигенов изучали путем их внутрибрюшинного введения белым мышам в дозе 0,3 см³, подкожного введения морским свинкам в дозе 3,0 см³.

Результаты исследований. По результатам проведенных исследований нами установлено, что количество микробных клеток в концентрированной бактериальной массе лептоспир не пропорционально кратности сгущения и видимое количество лептоспир меньше расчетного. В связи с этим вывели коэффициент между расчетным количеством и действительным накоплением лептоспир в концентрированной культуре. Условно этот коэффициент назвали коэффициентом лизиса. По нашему мнению несоответствие между расчетным и действительным количеством лептоспир обусловлено лизисом значительного количества микробных клеток в процессе концентрирования и, следовательно, отсутствием возможности их учесть.

Для установления полноты осаждения лептоспир на полых волокнах проводили микроскопию фильтрата и, кроме того, его вводили кроликам внутривенно трехкратно в объеме 1, 2 и 3 см³ с интервалом 3 дня. В дальнейшем сыворотку крови животных исследовали в РМА, результаты получились отрицательными, т.е. концентрирование приводило к полному отделению цельных и частиц лизированных клеток лептоспир. Использование при изготовлении вакцины операции по концентрированию, очистке и стандартизации бактериальных клеток приводит к лизису части лептоспир. Полученные результаты исследований показали, что консервацию лептоспир лучше всего проводить по варианту 2, 6, 7, 8, 9 и 10. Так, при указанных способах консервации лептоспир коэффициент лизиса микроорганизмов составил 1,10-1,80. Наиболее предпочтительнее лептоспиры консервировать по варианту № 8, т.к. коэффициент лизиса составил всего 1,1-1,16.

При изучении влияния температуры на устойчивость лептоспир, консервированных разными способами, нами установлено, что более стабильны клетки, обработанные совокупностью препаратов: формалином, мертиолятом натрия и глюкозой. При этом способе обработки коэффициент лизиса составил 1,21-1,24. При других режимах коэффициент лизиса повышался до 6,74-6,85.

Таким образом, технологичнее лептоспирозные культуры консервировать путем добавления формалина до 0,2 %, мертиолята натрия до 0,01 % и глюкозы до 5 %.

Из результатов, сведенных в таблице 1, видно, что наиболее выраженная сохранность антигенов лептоспир отмечается также при консервации бактерий по методу № 8.

Таблица 1 – Зависимость антигенной активности полиантигенов от способа консервации лептоспир

Способ консервации антигена	Титр антител к лептоспирам				
	<i>L. pomona</i>	<i>L. tarassovi</i>	<i>L. grippothyphosa</i>	<i>L. conicola</i>	<i>L. icterohaemorrhagiae</i>
2	1:400***	1:400***	1:400**	1:100**	1:100**
6	1:400**	1:400**	1:400**	1:100*	1:100*
7	1:400****	1:400***	1:400**	1:100**	1:100**
8	1:800**	1:800**	1:400****	1:200**	1:200***
9	1:400***	1:400***	1:400**	1:100**	1:100**
10	1:400**	1:400**	1:400*	1:100*	1:100*

Примечание: учет реакции в крестах

Использование способов № 2, 7 и 9 позволяет умеренно сохранять антигенную структуру лептоспир в процессе технологии изготовления вакцины, но гораздо меньше, чем по методу № 8. При получении полиантигенов способами № 6 и № 10 отмечается наименьшая сохранность антигенной активности микроорганизмов.

Из таблицы 2 видно, что только полиантиген, консервированный по способу 8, обеспечивает выживаемость, повышение массы тела животных без видимых местных и общих проявлений. Полиантиген, полученный по способу № 7, также не оказывает выраженного токсического действия на лабораторных животных, хотя в единичных случаях приводит к проявлению параличей и парезов.

Таблица 2 – Токсичность и безвредность полиантигенов против лептоспироза

Способ консервации	Кол-во животных, гол	Погибло, гол	Выжило, гол	Наличие параличей, парезов	Средняя масса, г		Местные проявления
					до введения	после введения	
1	2	3	4	5	6	7	8
2	20	–	20	–	18,6	17,8	припухлость у отдельных животных
6	20	–	20	1	18,8	17,8	припухлость у отдельных животных
7	20	–	20	1	18,6	18,0	отсутствует

1	2	3	4	5	6	7	8
8	20	–	20	–	18,4	18,7	отсутствует
9	20	2	18	1	18,5	17,9	припухлость у отдельных животных

Полиантигены, консервированные другими способами, вызывают у подопытных животных выраженное снижение живой массы, проявление местной реакции в виде формирования припухлостей в месте введения антигена, а также проявлением общей реакции. Самой высокой протективной активностью обладает полиантиген, консервированный по способу № 8, т.к. он гарантирует 100 % выживаемость лабораторных животных. Полиантигены, консервированные другими методами, в зависимости от серотипа лептоспир, гарантировали защиту только 64-80 % животных.

Выводы. По результатам проведенной работы предложен способ консервации лептоспир, который гарантирует высокую сохранность целостности бактериальных клеток и антигенных структур, а также установлено, что полиантиген, консервированный по способу № 8, является нетоксичным, безвредным и обладает выраженными антигенными и протективными свойствами. Разработанный способ консервации в дальнейшем может быть использован в биологической промышленности для приготовления противолептоспирозных биопрепаратов.

Список литературы

1. Вакцина против лептоспироза животных лиофилизированная / А.Н. Панин [и др.] // Ветеринария. – 2002. – № 1. – С. 21-24.
2. Волина, Е.Г. Культивирование лептоспир в жидкой питательной среде с лизированной кроличьей кровью / Е.Г. Волина, Л.Е. Саруханова // ЖМЭИ. – 2001. – № 1. – С. 3-5.
3. Зайцев, В.В. Влияние состава питательной среды на патогенные свойства лептоспирозных бактерий / В.В. Зайцев // Ученые записки УО ВГАВМ. – Витебск, 2010. – Т.46, вып.1, ч. 1. – С. 73-76.
4. Зайцев, В.В. Оценка ростовой активности сывороточных и альбуминовых сред / В.В. Зайцев // Ученые записки УО ВГАВМ. – Витебск, 2010. – Т.46, вып.1, ч. 1. – С. 76-79.

DEVELOPMENT OF THE METHOD OF LEPTOSPIRA CONSERVATION AT THE PRODUCTION OF BIOPREPARATIONS

Zaytsev V.V., Dremach G.E. *

Vitebsk Biofactory UE,

*Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine

The method of leptospira conservation which allows a high preservation rate for bacteria and antigens are developed. It has been established that polyanitgen preserved by the method has proved to be non-toxic, safe and has antigenic and protective properties.

УДК 619:616.98:578.83:636.

АССОЦИИРОВАННАЯ ИНАКТИВИРОВАННАЯ ВАКЦИНА ПРОТИВ ПАРАГРИППА-3, ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА И ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Иванов А.В., Гумеров В.Г., Макаев Х.Н.

ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных», г. Казань

Основной причиной гибели и преждевременной выбраковки телят в раннем возрасте являются респираторные и желудочно-кишечные болезни. По широте распространения, смертности, вынужденному убою, потери продуктивности они превалируют над всеми остальными заболеваниями этого возраста.

Как известно, в развитии заболеваний молодняка крупного рогатого скота имеет место масса различных факторов, как инфекционной, так и не инфекционной природы.

В развитии инфекционной патологии ведущее место занимают агенты вирусной этиологии, относящиеся к различным таксономическим группам. Доминирующую роль при респираторных и желудочно-кишечных заболеваниях телят играют вирусы ПГ-3, ИРТ, ВД, рота-, коронавирусы и др. В связи с этим профилактика вышеуказанных болезней наиболее эффективна с использованием ассоциированных вакцин [1-5].

Целью исследований была разработка ассоциированной инактивированной вакцины против ПГ-3, ИРТ и ВД крупного рогатого скота и изучение ее эффективности в лабораторных и производственных условиях.

Материалы и методы. Для приготовления экспериментальных серий вакцин использовали вакцинные штаммы: «ТК-А (ВИЭВ) – В2» вируса ИРТ; «ПТК-45/86» вируса ПГ-3 и «ВК-1 (ВИЭВ)» вируса диареи крупного рогатого скота. Вирусы репродуцировали роллерным способом в перевиваемых культурах клеток MDBK, ЛЭК и TR. Инактивацию вирусов проводили формальдегидом. Очистку вирусной биомассы от клеточного детрита проводили центрифугированием, концентрирование вирусов – с помощью полиэтиленгликоля-6000.

В соответствии с разработанным регламентом были изготовлены экспериментальные серии ассоциированной вакцины с использованием в качестве адьюванта гидроокись алюминия и масляного адьюванта.

Антигенную активность ассоциированных вакцин изучали на кроликах по 5 животных в каждой группе. Препараты животным вводили подкожно двукратно с интервалом 14 дней в дозе 1,0 см³. С целью изучения динамики накопления специфических антител у кроликов, взятие крови осуществляли до, через 14 дней, после первой и второй вакцинации, а также через 2 и 3 месяца с начала опыта. Антитела к вирусу ПГ-3 определяли в реакции торможения гемагглютинации, а к вирусам ИРТ и ВД в реакции нейтрализации.

Опыты по изучению антигенной и иммуногенной активности экспериментальных серий ассоциированной вакцины были проведены в 2-х неблагополучных по респираторным заболеваниям телят хозяйствах. С этой целью за 1,5-2 месяца до отела провели двукратную с интервалом 15 дней вакцинацию сухостойных коров. Препараты животным вводили внутримышечно в дозе 2,0 см³. Новорожденных телят в возрасте 5 дней, так же как и коров, вакцинировали двукратно в дозе 1,0 см³. Исследование сывороток крови телят на наличие антител к вирусам ПГ-3, ИРТ и ВД проводили до, через 15 дней после первой и второй вакцинации, а также в возрасте 2, 3 и 6 месяца. В качестве контрольного препарата использовали вакцину «Комбовак».

Результаты исследований. В опытах на кроликах установлено, что у всех животных до вакцинации в сыворотке крови отсутствовали специфические антитела к вирусам ПГ-3, ИРТ и ВД КРС. Достоверное накопление титров антител ко всем 3-м