

На правах рукописи

БОНДАРЕВА ОЛЬГА ВИКТОРОВНА

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОНЪЮНКТИВАЛЬНОГО МЕТОДА
ИММУНИЗАЦИИ БАРАНОВ ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННОГО
ЭПИДИДИМИТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВАКЦИНЫ
ИЗ ШТАММА В. АВОРТУС 19**

16.00.03. – ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Бонд

Новосибирск -2006

Работа выполнена в ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт бруцеллеза и туберкулеза животных СО РАСХН

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук,
профессор
Аракелян Петрос Карпетович

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор
Димов Сергей Константинович

кандидат ветеринарных наук
Падалица Алексей Григорьевич

Ведущая организация: **ФГУ ФЦТРБ – Всероссийский
научно-исследовательский
ветеринарный институт (г. Казань)**

Защита состоится «6» июня 2006 г. в 10 ч. на заседании диссертационного совета Д.006.045.01 в ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО РАСХН по адресу: 630501, Новосибирская область, Новосибирский район, п. Краснообск, ИЭВСиДВ

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНСХБ СО РАСХН

Автореферат разослан «25» апреля 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



С.И. Логинов

2006 А
9433

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. Актуальность проблемы. В настоящее время в РФ в целях специфической профилактики инфекционного эпидидимита баранов (ИЭБ) официально регламентировано однократное применение вакцины из штамма *V. melitensis* Rev-1 подкожно в дозе 2 млрд м.к. Однако рядом авторов убедительно доказано, что оно не обеспечивает надежного оздоровления отар, неблагополучных по этой болезни. При этом ими была дополнительно предложена реиммунизация животных конъюнктивально в уменьшенной дозе (100 млн м.к.). Такая схема обеспечила формирование достаточно напряженного иммунитета у баранов против ИЭ (И.А. Косилов с соавт., 1999).

Известно, что у вакцинного штамма *V. melitensis* Rev-1 сохранился весьма высокий уровень инвазивности, реактогенности и остаточной вирулентности, нередко приводящий на практике к многочисленным издержкам, наиболее серьезная из которых – возможность инфицирования людей (L. Neman, 1968). В этой связи актуальна проблема изучения перспектив изготовления из этого штамма иммуногенной убитой вакцины с использованием адьювантов (С.М. Лихолетов, 1998; П.К. Аракелян, А.С. Димова, 2003; А.С. Димова, 2003; С.М. Орлов, 2004).

Вместе с тем, отдельные публикации содержат экспериментальные и практические данные, аргументирующие возможность использования для специфической профилактики ИЭБ живой вакцины из наименее инвазивного, реактогенного и вирулентного штамма *V. abortus* 19 в дозе 40 млрд м.к. подкожно (Ф.И. Усманова и др., 1973; Г.Н. Глотов с соавт., 1975). Но есть и сообщения о возникающих при этом осложнениях у привитых животных в виде хромоты у 65%, а у некоторых - эпидидимита, и даже выделения вакцинного штамма со спермой (K. Van Haerden, S. Van Rensburg, 1962; M. Baddle e.al., 1963; W. Laurence, 1964; J. Kater, W. Hartley, 1963; L. Hughes, I. Claxton, 1968).

Для специфической профилактики бруцеллеза мелкого рогатого скота предложена иммунизация маточного поголовья вакциной из штамма 19 конъюнктивальным методом в дозе 4 млрд м.к. При этом получены экспериментальные и практические данные, свидетельствующие об его высокой эффективности (И.А. Косилов с соавт, 1995; А.Т. Рукин, 1998; Л.В. Жарова, 2002; Н.А. Морозова, 2002). В этой связи логично утверждать о возможных перспективах использования для специфической профилактики ИЭБ вакцины из штамма 19 при конъюнктивальном методе введения в уменьшенных дозах.

Однако сведения о реактогенности, иммуногенности, агглютиногенности, а также проводящей способности этой вакцины при данных условиях ее применения отсутствуют, что и определило цель и задачи исследований.

РОС. НАЦИОНАЛ
БИБЛИОТЕКА
С.Петербург
09 100 акр

1.2. Цель исследований - изучить эффективность конъюнктивного метода иммунизации баранов вакциной из штамма *V. abortus* 19 в уменьшенной дозе.

1.3. Задачи исследований:

1. Изучить реактогенные, агглютиногенные, иммуногенные и провоцирующие свойства вакцины из штамма 19 при конъюнктивном методе применения в сравнении с вакциной из штамма Rev-1.

2. Провести оценку эффективности конъюнктивного метода иммунизации баранов вакциной из штамма *V. abortus* 19 в оптимальной дозе в системе противэпидидимитных мероприятий.

1.4. Научная новизна работы. В экспериментальных и производственных условиях при ИЭБ доказана высокая эффективность конъюнктивного метода иммунизации баранов вакциной из штамма 19 в дозе 4 млрд м.к по сравнению с вакциной из штамма Rev-1 (живой и инактивированной).

При подкожном введении баранам убитой адьювант-вакцины из штамма Rev-1 установлено (независимо от количества микробных клеток в дозе) местное проявление реактогенных свойств в виде болезненных припухлостей, абсцессов и т.п., а также сохранение у большинства привитых животных высокого уровня бруцеллезных антител в течение всего срока наблюдений.

Для иммунизации баранов против ИЭБ определена оптимальная доза живой вакцины из штамма 19 на основании обеспечения практически равного уровня иммунитета, и более быстрого угасания бруцеллезных антител, чем при введении максимальной дозы.

Доказан провоцирующий эффект вакцин из штаммов 19 и Rev-1, позволяющий при серологическом исследовании в РСК и РДСК сывороток крови баранов неблагополучной по ИЭ отары на 14 и 21 дни после иммунизации конъюнктивным методом дополнительно выявлять значительное число инфицированных животных.

Установлен противэпизоотический эффект при ИЭБ двукратной с интервалом один год иммунизации баранов вакциной из штамма 19 конъюнктивным методом в дозе 4 млрд м.к. в сочетании с использованием рациональной поствакцинальной диагностики.

На способ специфической профилактики инфекционного эпидидимита баранов получено решение ФГУ ФИПС о выдаче патента РФ на изобретение.

1.5. Практическая значимость. Полученные экспериментальные и практические данные, доказывающие высокую эффективность при ИЭБ конъюнктивного метода иммунизации баранов вакциной из штамма 19 в дозе 4 млрд м.к. в сочетании с рациональной диагностикой, в том числе основанной на использовании провоцирующих свойств вакцины, открывают возможности для его широкого внедрения в системе противэпидидимитных мероприятий, что обеспечит надежное и быстрое оздоровление овце-

водческих хозяйств от этой болезни.

1.6. Апробация полученных результатов. Основные положения диссертации доложены на IV, V межрегиональных научно-практических конференциях ГНУ ВНИИБТЖ (Омск, 2005, 2006 гг.); на XI научной конференции профессорско-преподавательского состава и аспирантов ФГОУ ПО ОмГАУ (Омск, 2005 г.), на заседаниях ученого совета ГНУ ВНИИБТЖ (2004-2005 гг.).

Основные положения, выводы и практические предложения, изложенные в диссертации, обсуждены и одобрены на межлабораторном совещании сотрудников ГНУ ВНИИБТЖ (2006 г.).

1.7. Публикация результатов исследований. По теме диссертации опубликовано 6 научных работ.

1.8. Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 107 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения результатов исследований, выводов, практических предложений, списка литературы, приложений.

Диссертация иллюстрирована 13 таблицами, 9 рисунками. Список литературы включает 249 источников, из них 169 отечественных, 80 зарубежных авторов.

1.9. Внедрение результатов исследований. Система противозпидидимитных мероприятий с использованием конъюнктивального метода иммунизации баранов вакциной из штамма 19 внедрена в ОАО «Чистовское» Омской области. На основе результатов исследований разработан проект «Временное наставление по применению вакцины живой сухой из штамма 19 бруцелла абортус конъюнктивальным методом при инфекционном эпидидимите баранов», рассмотренный и одобренный ученым советом ГНУ ВНИИБТЖ (протокол № 4 от 6 апреля 2006 г.).

1.10. Основные положения, выносимые на защиту.

1. Результаты изучения реактогенных, агглютиногенных, иммуногенных и провоцирующих свойств вакцины из штамма 19 при конъюнктивальном методе применения, в том числе в сравнении с живой и убитой вакцинами из штамма Rev-1.

2. Материалы, доказывающие эффективность конъюнктивального метода иммунизации баранов вакциной из штамма B. abortus 19 в оптимальной дозе в системе противозпидидимитных мероприятий.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы и методы исследования. Работа выполнялась в 2003 - 2006 гг. в ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт бруцеллеза и туберкуллеза животных СО РАСХН и овцеводческих хозяйствах Омской и Курганской областей.

Реактогенность, агглютиногенность и иммуногенность вакцины из

штамма *B. abortus* 19 в уменьшенных дозах при конъюнктивальном методе иммунизации баранов, в том числе в сравнении с живой и убитой вакцинами из штамма *B. melitensis* Rev-1, при ИЭБ изучали в благополучных по бруцеллезу и инфекционному эпидидимиту баранов хозяйствах Курганской области. Интактных животных иммунизировали вакцинами из штаммов *B. abortus* 19 в разных дозах (500 млн м.к., 4 и 10 млрд м.к.) и *B. melitensis* Rev-1 в дозе 100 млн. м.к. конъюнктивальным методом, а также убитой вакциной из штамма *B. melitensis* Rev-1 с адьювантом 6510 (ВНИИЗЖ) в дозах 50 и 500 млн м.к. подкожным методом.

Напряженность иммунитета проверяли через 120 и 250 дней после прививки. При проверке иммунитета в качестве заражающего штамма использовали вирулентную культуру *B. ovis* 19/94 в дозе 40 млрд м.к., которую вводили баранам подкожно в области локтевого сустава.

После заражения опытных и контрольных животных убивали через 30 дней, а биоматериал от них (органы и лимфатические узлы - 11 объектов) исследовали бактериологически путем посева на мясо-печеночно-пептонные бульон и агар. Посевы просматривали каждые 5-7 дней в течение одного месяца. Выделенные культуры бруцелл дифференцировали (вакцинный *B. abortus* штамм 19 от заражающей культуры *B. ovis*).

Иммунологические реакции у привитых животных изучали до и после заражения в сроки, предусмотренные схемой опыта, с использованием РА, РСК с единым бруцеллезным антигеном и РДСК с овисным антигеном до предельного титра, а также РИД с О-ПС бруцеллезным антигеном (100 баранов).

Объектом изучения динамики угасания поствакцинальных антител служили бараны благополучных по бруцеллезу и инфекционному эпидидимиту хозяйств Курганской области, которых иммунизировали вакциной из штамма *B. abortus* 19 в дозе 4 млрд м.к. конъюнктивальным методом. Сыворотку крови животных исследовали выше указанными серологическими методами (145 животных)

В производственных условиях в отаре, неблагополучной по ИЭБ, но благополучной по бруцеллезу, был поставлен опыт по изучению провоцирующих свойств вакцины из штамма 19 в дозе 4 млрд м.к. в отношении овисных антител в сравнении с вакциной из штамма Rev-1 в дозе 100 млн м.к. при конъюнктивальном методе введения. Исследовали баранов в РСК/РДСК с овисным антигеном до и на 14-й, 21-й дни после введения вакцин до предельного титра (149 животных).

Противоэпизоотическую эффективность конъюнктивального метода иммунизации вакциной из штамма 19 в дозе 4 млрд м.к. изучали в неблагополучном по ИЭБ хозяйстве Омской области (510 животных). Схемы опытов более подробно описаны в соответствующих разделах автореферата.

Автор выражает благодарность и признательность научному руководителю д.в.н., профессору П.К. Аракеляну и научному консультанту д.в.н.,

профессору заслуженному деятелю науки И.А. Косилову, коллективу сектора бруцеллеза мелкого рогатого скота ВНИИБТЖ, а так же практическим ветеринарным специалистам за методическую и практическую помощь в проведении исследований и оформлении материалов.

2.2. Результаты исследования

2.2.1. Реактогенные, агглютиногенные и иммуногенные свойства вакцины из штамма 19 при конъюнктивальном методе введения в разных дозах.

Опыт был поставлен на 60 баранах-производителях из благополучного по ИЭ хозяйства. Экспериментальных животных разделили по принципу аналогов на три группы. Баранов первой группы иммунизировали в дозе 500 млн м.к., второй – 4 млрд и третьей – 10 млрд м.к.

Поствакцинальные реакции отслеживали с применением РА и РСК с единым бруцеллезным антигеном и РДСК с овисным антигеном до предельного титра, а также РИД с О-ПС бруцеллезным антигеном. Исследования сывороток проводили на 30, 60, 90, 120 дни после иммунизации животных. Реактогенные свойства вакцины из штамма 19 изучали у привитых баранов при их клиническом обследовании (исследование температуры, пульса, дыхания, аппетита, общего поведения, наличия отека, воспалительных и гнойных процессов).

РА и РСК у баранов 1-й и 2-й групп полностью угасли к 90-му дню после прививки, тогда как в 3-й группе (10 млрд м.к.) поствакцинальные реакции (РА и РСК) продолжали сохраняться на протяжении всего опыта, т.е. 120 дней.

Характерно, что у животных, привитых вакциной из штамма 19 в дозах 500 млн. м.к. (1-я группа) и даже 4 млрд м.к. (2-я группа), на всем протяжении опыта РИД была стабильно отрицательной. В 3-й группе у животных, которых прививали в дозе 10 млрд м.к., эта реакция по отношению к РА и РСК также была слабо выражена: на 30-й день после прививки – у 11,1%, на 60-й – только у 5,2%. В последующие сроки исследования РИД угасла полностью.

Вместе с тем на 90-й день после иммунизации 50% сывороток крови баранов продолжали реагировать в РА со средним титром 41,7 МЕ и 16,3% в РСК со средним титром 1:5. На 120-й день после прививки (срок наблюдений) эти реакции продолжали регистрироваться: РА – у 21,1% (средний титр 25 МЕ). У животных 1-й и 2-й групп, привитых соответственно в дозе 500 млн м.к. и 4 млрд м.к., поствакцинальные серологические реакции были выражены слабо: на 60-й день после прививки средний титр РА не превышал 25 МЕ, а РСК – 1:5 (у 15 и 5% проб). РДСК с овисным антигеном во все сроки исследования у всех животных была отрицательной.

При клиническом обследовании баранов всех групп общих и местных отклонений не установлено в течение всего срока наблюдений.

Для проверки иммунитета из каждой группы было отобрано по 6 баранов, которых через 120 дней после прививки заражали вирулентной культурой *V. ovis* подкожно в дозе 40 млрд м.к. (табл. 1).

Таблица 1 - Показатели иммунитета к заражению *V. ovis* у баранов, привитых вакциной из штамма *V. abortus* 19 конъюнктивально

№ п/п	Доза вакцины	Количество животных	Заразилось, голов	Иммунитет, %
1	500 млн. м.к.	6	3	50,0
2	4 млрд м.к.	6	1	83,3
3	10 млрд м.к.	6	1	83,3
4	Контроль	3	3	0

Результаты опыта показали, что дозы 4 и 10 млрд м.к. обеспечивают формирование у животных равноценного иммунитета к заражению вирулентным возбудителем ИЭБ на уровне 83,3%. Тогда как в группе животных, иммунизированных в дозе 500 млн м.к., противостояли заражению только 50% баранов при 100% их инфицировании в контроле.

2.2.2. Реактогенные, агглютиногенные и иммуногенные свойства живых вакцин из штаммов *V. abortus* 19 и *V. melitensis* Rev-1 при конъюнктивальном применении в уменьшенных дозах в сравнении с инактивированной адьювант-вакциной из штамма *V. melitensis* Rev-1.

Эксперимент проводили на 80 баранах, разделенных на четыре группы.

Животных первой группы вакцинировали конъюнктивально вакциной из штамма *V. melitensis* Rev-1 в дозе 100 млн м.к., второй - подкожно инактивированной вакциной из штамма *V. melitensis* Rev-1 в дозе 50 млн м.к. с адьювантом 6510, третьей - подкожно той же инактивированной вакциной, но в дозе 500 млн м.к., четвертой - конъюнктивально вакциной из штамма *V. abortus* 19 в дозе 4 млрд м.к.

Поствакцинальные серологические реакции отслеживали с применением РА и РСК с бруцеллезным антигеном и РДСК с овисным антигеном до предельного титра, а также РИД с О-ПС антигеном. Исследования животных проводили на 30, 60, 90, 120, 180, 210 и 250 дни после иммунизации.

В группах 1 и 4 поствакцинальные реакции у животных были выражены слабо. Так, в первой группе в РА реагировало только на 60-й день 26,7% животных со средним титром 43,8 МЕ, а в РСК - на 30-й день 5,9% в титре 1:10. В группе 4 агглютинины регистрировались в течение 60 дней у 53,8-13% с титром не выше 35 МЕ, а комплементсвязывающие антитела - до 90-го дня у 7-20% с резким угасанием титра с 1:50 до 1:7,5. РИД на всем протяжении опыта в обеих группах не регистрировалась. В группе 2 при дозе 50 млн м.к. РА проявлялась у 50-100% животных в титрах 80-250 МЕ, РСК - соответственно у 66-100% со средним титром 1:33-1:190. В высоких тит-

рах антитела продолжали сохраняться до 250 дней (срок наблюдения).

В группе 3 также у большинства животных (60–100%) на протяжении опыта продолжали стойко сохраняться агглютинины и комплементсвязывающие антитела в высоких титрах: соответственно в пределах 120–490 МЕ и 1:90-1:216 соответственно. Характерно, что РИД, полностью отсутствующая в группах 1 и 4, в группах 2 и 3 после применения адьювант-вакцины регистрировалась у животных на протяжении всего опыта. По истечении 250 дней после прививки она продолжала сохраняться у 46–50% животных. Следует отметить, что существенных различий в проявлении поствакцинальных реакций у баранов во второй и третьей группах, несмотря на 10-и кратную разницу в дозировках (50 и 500 млн. м.к.), не установлено.

Важно особо подчеркнуть, что РДСК с овисным антигеном, как и в предыдущих группах, во все сроки исследования у всех животных была отрицательной.

Иммуногенные свойства вакцины из штамма 19 при конъюнктивальном методе применения в дозе 4 млрд м.к. изучили в сравнении с вакциной из штамма Rev-1 при конъюнктивальном (живая – 100 млн м.к.) и подкожном (убитая с масляным адьювантом – 500 млн м.к.) введениях (табл. 2).

В контрольной группе вирулентной культурой *V. ovis* заразились все животные с высоким индексом инвазивности – 35. В остальных группах заражению противостояло примерно одинаковое количество животных (66,7–77,8%).

Однако индекс инвазивности в группе животных, иммунизированных вакциной из штамма 19, был в 2 раза ниже (3,7), чем у остальных баранов, в том числе привитых адьювант-вакциной (7,4).

Таблица 2 – Иммуногенность различных противобруцеллезных вакцин при ИЭБ

Группа	Вакцина. метод введения, доза	Количество животных	Заразилось, голов	Иммуни-тет, %	Индекс инвазивности
1	шт. Rev-1, конъюнктивально, 100 млн м.к.	9	3	66,7	6,5
2	шт. Rev-1 с адьювантом, подкожно, 500 млн м.к.	9	2	77,8	7,4
3	шт. 19, конъюнктивально, 4 млрд м.к.	9	2	77,8	3,7
4	контроль	5	5	0	35

Реактогенность препаратов при разных способах иммунизации отслеживали клиническим методом (температура, пульс, дыхание, аппетит, общее состояние, местные изменения). Отклонений от физиологической нормы в первой и четвертой группах в течение 10 дней не отмечено. У 20 – 35 % животных второй и третьей групп к концу опыта (250 дней) на месте введения вакцины сохранялись воспалительные отеки размером от 2 до 5 см с образованием абсцессов и свищей.

2.2.3. Поствакцинальные реакции у баранов, однократно и многократно привитых вакциной из штамма 19 конъюнктивальным методом в дозе 4 млрд. м.к.

Исследования проводили в благополучном по ИЭБ и бруцеллезу мелко-рогатого скота хозяйстве, где баранов прививали конъюнктивальным методом вакциной из штамма 19 в дозе 4 млрд. м.к. После однократной прививки сыворотку крови животных исследовали в РА, РСК с бруцеллезным антигеном и РДСК с овисным антигеном до предельного титра, а так же в РИД с О-ПС антигеном в различные сроки после иммунизации.

Результаты опыта показали, что уже через 90 дней РА была отрицательной у всех 152 баранов. Наибольшее число реагирующих было отмечено на 20-й день после прививки (13,8%) баранов. В этот срок был зафиксирован и ее максимальный титр (100 МЕ) у одного животного. У остальных преобладали сомнительные результаты (25 МЕ).

Продукция комплементсвязывающих антител была более активной. Максимальное количество положительных реакций (11,2 %) было выявлено на 20-й день. Однако концентрация антител была не высокой (максимальный титр составлял 1:10 с преобладанием во все сроки исследования титра 1:5) и сохранялась также непродолжительное время, как и РА. К 90-му дню РСК была отмечена у 7 баранов (4,6%). В последующие сроки исследования случаев реагирования баранов в РА и РСК не отмечено.

Что касается РИД с О-ПС бруцеллезным антигеном и РДСК с овисным антигеном, то за весь срок наблюдения (в течение 360 дней после прививки) у баранов не отмечен ни один случай выявления этих реакций.

Таким образом, из результатов исследований следует, что по истечении 4 месяцев после введения вакцины практически можно уже осуществлять диагностику бруцеллеза или эпизоотический контроль за привитым поголовьем.

По данным многих исследователей, однократная иммунизация баранов не обеспечивает оздоровления неблагополучных хозяйств от ИЭ. Следовательно, необходимы повторные прививки. Динамика угасания поствакцинальных реакций при вторичном иммунном ответе в результате неоднократных реиммунизаций конъюнктивальным методом вакциной из штамма 19 в дозе 4 млрд. м.к. и составляла предмет последующих исследований.

Результаты исследований показали, что при вторичном иммунном ответе в аналогичных условиях опыта (метод введения вакцины, доза) продукция комплементсвязывающих антител происходит активнее, чем при первичном иммунном ответе.

Так, после однократной прививки в РСК реагировало на 20-й день 11,2%, а после ревакцинации – 89,4% животных, на 60-й соответственно 3,9% и 55,9%, а на 90 – 4,6% и 13,4%. Если на 120-й день после однократной прививки РСК утасла полностью, то после многократной прививки реагировало 4,2% животных. Однако к 150-му дню, независимо от кратности введения вакцины, РСК утасла полностью. Что касается РА, то значительных различий (как в случае с РСК) в динамике накопления, персистенции и угасания антител у животных при первичном и вторичном ответе не отмечено. Так, после однократной прививки в РА реагировало на 20-й день 13,8%, а после ревакцинации – 20,4%, на 60-й соответственно – 5,9% и 8,2%, а на 90 – 0% и 2,9% животных. К 120-му дню после ревакцинации РА утасла полностью.

Что касается синтеза антител, выявляемых в РИД с О-ПС антигеном, то и здесь отмечается общая закономерность: более активная продукция их при вторичном иммунном ответе. Если при первичном иммунном ответе РИД не зарегистрирована, то после неоднократной конъюнктивальной иммунизации она отмечалась на 20-й день у – 8,4% животных и на 60-й день – у 1,4%. В последующие сроки исследования животных, реагирующих в РИД, не выявлено.

Из результатов изучения динамики поствакцинальных РА, РСК и РИД с О-ПС антигеном у животных, многократно привитых конъюнктивальным методом вакциной из штамма 19 в дозе 4 млрд м.к., следует, что, независимо от кратности введения вакцины, у иммунизированных животных РИД с О-ПС антигеном к 3-м месяцам, а РА и РСК к 5-ти месяцам после введения вакцины полностью угасают. Практически в эти сроки можно осуществлять диагностику бруцеллеза или эпизоотический контроль за привитым поголовьем.

Следует подчеркнуть, что, на протяжении опыта РДСК была отрицательной.

2.2.4. Провоцирующие свойства различных вакцин при конъюнктивальном методе введения баранам неблагополучного по ИЭ хозяйства.

Параллельно с изучением реактогенных, агглютиногенных и иммуногенных свойств вакцины из штамма 19 мы проводили исследования по выявлению способности препарата вызывать провокацию специфических овисных (R-) антител у баранов – скрытых носителей возбудителя ИЭБ

С этой целью был поставлен опыт в хозяйстве, неблагополучном по ИЭБ, но благополучном по бруцеллезу мелкого рогатого скота. Перед постановкой опыта всех баранов (149 гол.) исследовали комплексно: серологиче-

ским (РСК, РДСК со стандартным овисным антигеном) и клиническим методами. При этом выявили 21 больного барана (14,1%). От трех реагирующих баранов бактериологически исследовали семенники (после кастрации), в одном случае выделили культуру *V. ovis*. Больных изолировали, а остальных по принципу аналогов разделили на три группы.

Животных первой группы иммунизировали вакциной из штамма 19 конъюнктивально в дозе 4 млрд м.к., второй – вакциной из штамма Rev-1 также конъюнктивально в дозе 100 млн м.к. и третьей (контрольной) – не вакцинировали до конца наблюдений. Сыворотки крови всех животных на 14-й и 21-й дни после прививки исследовали в РСК, РДСК с овисным антигеном.

Результаты исследований показали, что в обеих опытных группах на 14-й и 21-й день после иммунизации, независимо от свойств вакцины, значительно увеличивается количество выявляемых в РСК и РДСК животных.

Из таблицы 3 видно, что на 14-й день после введения вакцины из штамма 19 выявлено 22,6% реагирующих, а после иммунизации штаммом Rev-1- в два раза меньше (9,8%). Аналогичная тенденция отмечена при исследовании животных на 21-й день после вакцинации: в группе привитых штаммом 19 реагировало 28,3% баранов, а штаммом Rev-1 - 21,5%.

Указанные показатели превышали таковые по контрольной группе животных, не подвергавшихся иммунизации: в группе животных, привитых вакциной из штамма 19 – на 14-й день в 5,4 раза, на 21-й день – в 3,4 раза; в группе животных, привитых вакциной из штамма Rev-1 – в 2,3 и 2,6 раза соответственно.

Таблица 3 - Уровень выявления скрытого носительства возбудителя ИЭ у баранов в разные сроки после иммунизации различными вакцинами

Группа	Количество животных	Вакцина (метод введения, доза)	Дни исследования	Реагировало					
				всего		в том числе в			
						РСК		РДСК	
				го- лов	%	го- лов	%	го- лов	%
1	53	шт.19, конъюнктивально, 4 млрд м.к.	14	12	22,6	10	18,9	6	11,3
			21	15	28,3	14	26,4	7	13,2
2	51	шт. Rev-1, конъюнктивально, 100 млн м.к.	14	5	9,8	5	9,8	3	5,9
			21	11	21,5	10	19,6	9	17,6
3	24	контрольная	14	1	4,2	1	4,2	1	4,2
			21	2	8,3	2	8,3	1	4,2

Таблица 4 - Динамика вторичного иммунного ответа у баранов-скрытых носителей возбудителя ИЭ

Группа	Количество животных	Вакцина (метод и доза введения)	Реагировало на 14 день				Из них сохранилось на 21-й день**, %			Появились реакции к 21-му дню			
			всего		в том числе*, %		все го	в том числе, %		всего		в том числе*, %	
			голов	%	РСК	РДСК		РСК	РДСК	голов	%	РСК	РДСК
1	53	шт. 19, конъюнктивально, 4 млрд м.к.	12	22,6	18,9	11,3	<u>11,5</u> 50	<u>9,4</u> 41,7	<u>5,7</u> 25	9	17	17	9,4
2	51	шт. Рев-1 конъюнктивально 100 млн м.к.	5	9,8	9,8	5,9	<u>7,8</u> 80	<u>7,8</u> 80	<u>3,9</u> 40	7	13,7	11,8	9,8
3	24	кон-трольная	1	4,2	4,2	4,2	<u>4,2</u> 100	<u>4,2</u> 100	<u>4,2</u> 100	1	4,2	4,2	

Примечания: * % животных от исследованных;

** в числителе – % животных от исследованных, в знаменателе – от реагирующих

На 21-й день реакции сохранялись после введения вакцины из штамма 19 у 50,0% животных, после иммунизации штаммом Рев-1- у 80,0%. К указанному сроку серологические реакции дополнительно проявились соответственно у 17,0 и 13,7% исследованных животных (табл. 4).

Провоцирующие свойства у вакцины из штамма 19, по сравнению с Рев-1, оказались в 1,7 раза выраженнее.

РСК, значительно превосходила по чувствительности РДСК при исследовании животных в оба срока.

Эпизоотическая опасность животных-бруцеллоносителей, спровоцированных вакциной из штамма 19, подтверждена в 50% случаев результатами бактериологического исследования (биопроба на морских свинках).

Таким образом, очевидна целесообразность использования метода провокации антител для выявления латентно больных животных с помощью комплекса РСК и РДСК на 14-21 дни после иммунизации вакциной из штамма 19 конъюнктивально.

2.2.5. Эффективность конъюнктивного метода иммунизации баранов вакциной из штамма *V. abortus* 19 в оптимальной дозе в системе противэпидидимитных мероприятий.

Противозпизоотическую эффективность конъюнктивного метода иммунизации вакциной из штамма 19 в дозе 4 млрд м.к. изучали в не благополучном по инфекционному эпидидимиту баранов ОАО «Чистовское» Омской области.

В течение года при четырехкратных комплексных исследованиях животных было выявлено 109 больных (12,5% от общего поголовья).

При последнем исследовании перед вакцинацией выявили 29 больных баранов (7,1%), в том числе серологически – 18 (4,4%), клинически – 11 (2,7%). При бактериологическом исследовании биоматериала от трех баранов у двух выделен возбудитель ИЭБ.

Не реагирующих баранов прививали вакциной из штамма 19 конъюнктивно в дозе 4 млрд м.к. Затем, используя метод провокации антител, через 20 дней после вакцинации сыворотку привитых животных исследовали серологически в РДСК/РСК с овисным антигеном. В результате выявлено 22 реагирующих барана или 5,7% (таблица 5).

Через 3 и 6 месяцев после первичной прививки поголовье баранов хозяйства было исследовано серологическим и клиническим методами. При этом выявлено 7 больных, или 1,1%, (в том числе 0,3% клинически).

При исследовании баранов через 12 месяцев после однократной иммунизации, т.е. перед реиммунизацией, выявлено 6 больных животных или 1%

Таблица 5 - Результаты исследования сывороток крови баранов неблагополучного по ИЭ хозяйства после иммунизации вакциной из штамма 19 конъюнктивным методом

Срок исследования	Исследовано проб	Реагировало								
		всего		в том числе						
		го-лов	%	РСК+ РДСК		РСК		РДСК		
				го-лов	%	го-лов	%	го-лов	%	
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
до вакцинации	160 б/п	9	5,6	3	1,9	5	3,1	1	0,6	
	246 б/п	9	3,7	7	2,8	1	0,4	1	0,4	
20 дней после вакцинации	151 б/п	12	8	8	5,3	3	2	1	0,7	
	233 б/п	10	4,3	7	3	3	1,3	-		

Продолжение таблицы 5

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
3 мес. после вакцинации	330	4	1,2	2	0,6	1	0,3	1	0,3
6 мес. после вакцинации	282	1	0,4	-		1	0,4	-	
12 мес. после вакцинации	280 б/п 349 б/р	4 1	1,4 0,3	4 -	1,4 -	- -	- -	- 1	- 0,3
20 дней после ревакцинации	267 б/п 347 б/р	6 1	2,2 0,3	5 -	1,9 -	1 -	0,4 -	- 1	- 0,3
3 мес. после ревакцинации	374	3	0,8	2	0,5	-	-	1	0,3
6 мес. после ревакцинации	369	-	-	-	-	-	-	-	-
12 мес. после ревакцинации	197 б/п 309 б/р	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
13 мес. после ревакцинации	393	-	-	-	-	-	-	-	-

Примечание: б/п – бараны-производители, б/р – бараны-ремонтники

(в том числе клинически – 0,2%). Баранов реиммунизировали вакциной из штамма 19 конъюнктивально в дозе 4 млрд м.к. Поголовье исследовали в РДСК с овисным антигеном через 20 и 90 дней после ревакцинации и выделили 10 животных. (1%) реагирующих. При последующих трех исследованиях положительно реагирующих в РДСК и клинически больных ИЭБ не выявлено, что послужило основанием для снятия ограничений с хозяйства.

В ОАО «Степное» Курганской области, неблагополучном по ИЭБ, при оздоровлении отар баранов без применения средств специфической профилактики добиться стабильных двукратных отрицательных результатов не удалось в течение трех лет. За этот период выявлено более 30% больных животных.

3. ВЫВОДЫ

1. При конъюнктивальном введении баранам живой вакцины из штамма Rev-1 в дозе 100 млн м.к. клинических признаков проявления реактогенности не установлено. РДСК с овисным антигеном и РИД с О-ПС бруцеллезным антигеном были отрицательными во все сроки исследований после иммунизации. РА и РСК с единым бруцеллезным антигеном полностью угасли у всех привитых животных к 90 дню.

2. У баранов, привитых убитой адьювант-вакциной из штамма *B. melitensis* Rev-1 в дозах, содержащих 50 и 500 млн м.к., через 250 дней на месте введения вакцины сохранялись воспалительные отеки размером 2-5 см с образованием абсцессов и свищей у 20-35% животных.

3. В сыворотках крови животных, привитых убитой адьювант-вакциной из штамма *B. melitensis* Rev-1 в дозах, содержащих 50 и 500 млн м.к., через 250 дней бруцеллезные антитела в различных титрах сохраняются в РА у 85,7 и 90% животных соответственно, в РСК – у 85,7 и 60%, в РИД с О-ПС антигеном – у 46,2 и 50%. Овисные антитела в РДСК во все сроки исследований в сыворотках крови опытных животных отсутствуют.

4. При конъюнктивальном введении баранам живой вакцины из штамма *B. abortus* 19 в разных дозах (500 млн м.к., 4 и 10 млрд м.к.) внешних признаков проявления реактогенности не установлено. У животных, привитых вакциной в дозах 500 млн м.к. и 4 млрд м.к., угасание РА и РСК с бруцеллезным единым антигеном произошло к 90-му дню. РИД с О-ПС бруцеллезным антигеном отсутствовала в этих группах на протяжении всего опыта у всех животных. В группе животных, привитых вакциной в дозе 10 млрд м.к., РА и РСК с бруцеллезным единым антигеном отмечена на 60 день у 57,9 и 45,5% животных соответственно, а на 120 день (срок наблюдения) – у 21,1 и 5,3%, РИД с О-ПС антигеном угасла к 90 дню. РДСК с овисным антигеном были отрицательными во все сроки исследований во всех опытных группах.

5. В экспериментальных условиях иммунитет к искусственному заражению вирулентным возбудителем ИЭБ у животных, привитых живой вакциной из штамма Rev-1 конъюнктивально в дозе 100 млн м.к., составил 66,7%; у привитых убитой адьювант-вакциной из штамма Rev-1 подкожно в дозе 500 млн м.к. и живой вакциной из штамма 19 конъюнктивально в дозе 4 млрд м.к., был одинаковым – 77,8%.

6. У животных, привитых живой вакциной из штамма 19 конъюнктивально в дозах 4 и 10 млрд м.к., иммунитет к искусственному заражению вирулентным возбудителем ИЭБ составил 83,3%; у животных, привитых этой же вакциной конъюнктивально в дозе 500 млн м.к. – 50%.

7. Живые вакцины из штаммов Rev-1 и 19 при конъюнктивальном методе введения в уменьшенных дозах не реактогенны, не препятствуют проведению диагностических исследований на бруцеллез и ИЭБ и обеспечивают

высокий уровень иммунитета к заражению баранов вирулентным возбудителем ИЭБ. Оптимальной является иммунизация баранов живой вакциной из штамма 19 конъюнктивально в дозе 4 млрд м.к.

8. В неблагополучной по ИЭБ отаре у баранов на 14 и 21 день после иммунизации живой вакциной из штамма 19 конъюнктивально в дозе 4 млрд м.к. провоцируются овисные антитела у 22,6 и 28,3% животных соответственно, что превышает аналогичные показатели у животных этой же отары, привитых живой вакциной из штамма Rev-1 конъюнктивально в дозе 100 млн м.к., соответственно в 2,3 и 1,3 раза.

9. Двукратная с интервалом один год иммунизация баранов-производителей и ремонтных баранов вакциной из штамма 19 конъюнктивальным методом в дозе 4 млрд м.к. в сочетании с серологическими исследованиями, основанными на рациональном использовании провоцирующих свойств вакцины, обеспечивает оздоровление неблагополучных по ИЭБ хозяйств за 1,5 года. Без использования средств специфической профилактики не удалось добиться оздоровления аналогичного по эпизоотической ситуации хозяйства в течение трех лет.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

В целях повышения эффективности противозепидидимитных мероприятий необходимо широко внедрить в ветеринарную практику конъюнктивальный метод иммунизации баранов против инфекционного эпидидимита живой вакциной из штамма В. abortus 19 в сочетании с поствакцинальной диагностикой, основанной на методе провокации овисных антител.

Основные результаты исследований использованы при разработке проекта «Временное наставление по применению вакцины живой сухой из штамма 19 бруцелла абортус конъюнктивальным методом при инфекционном эпидидимите баранов (в порядке широкого производственного испытания)» (рассмотрен и одобрен ученым советом ГНУ ВНИИБТЖ, прот. №4 от 6 апреля 2006 г.).

5. СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Экспериментальное испытание разных средств и методов иммунизации баранов против инфекционного эпидидимита / Соавт.: П.К. Аракелян, И.А. Косилов, Е.Б. Барабанова // Актуальные проблемы ветеринарной медицины: Матер. 4-й межрег. науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения засл. вет. врача РФ И.В. Окунцова / РАСХН. ВНИИБТЖ. – Омск, 2005. – С. 8-13.

2. Сравнительное изучение различных методов и способов иммунизации баранов против инфекционного эпидидимита / Соавт.: П.К. Аракелян, И.А. Косилов, Е.Б. Барабанова и др. // Био. – 2005. – № 2. – С. 10-11.

3. Применение вакцины из штамма *V. abortus* 19 при инфекционном эпидидимите баранов / Соавт.: П.К. Аракелян, И.А. Косилов, Е.Б. Барабанова // Ветеринария. – 2005. – № 12. – С. 20-22.

4. Экспериментальное изучение вакцины из штамма *V. abortus* 19 при инфекционном эпидидимите баранов / Соавт.: П.К. Аракелян, И.А. Косилов, Е.Б. Барабанова // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки – 2005. – № 6. – С. 66-70.

5. Динамика иммунологических реакций у баранов, иммунизированных разными вакцинами / Соавт.: П.К. Аракелян, И.А. Косилов, Е.Б. Барабанова // Научные и практические проблемы животноводства, ветеринарной медицины и перспективы их решения: Матер. 11 Науч. конф. проф.-препадов. сост. и аспирант., посв.60-ти летию победы, 11-13 апреля 2005 / ФГОУ ПО ОмГАУ. – Омск, 2005. – С. 58-61.

6. Состояние и перспективы специфической профилактики ИЭБ / Актуальные проблемы ветеринарной медицины продуктивных и непродуктивных животных: Мат. 5-й межрег. науч.-практ. конф. / РАСХН. ВНИИБТЖ. – Омск, 2006. – С. 38-40.

БОНДАРЕВА ОЛЬГА ВИКТОРОВНА

**ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОНЪЮНКТИВАЛЬНОГО МЕТОДА
ИММУНИЗАЦИИ БАРАНОВ ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННОГО
ЭПИДИДИМИТА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ВАКЦИНЫ
ИЗ ШТАММА V. ABORTUS 19**

**16.00.03. – ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология**

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Подписано к печати 20.04.2006. Формат бумаги 60x84 1/16.
Печать оперативная. Гарнитура Times New Roman
Усл. печ. л. 1,0. Тираж 100 экз.

ГНУ ВНИИБТЖ СО РАСХН

Отпечатано с оригинал-макета
в типографии ООО «Вариант-Омск»
644043, г. Омск, ул. Коммунистическая, 45. Тел./факс: 251-434

2006A
9433

D-9433