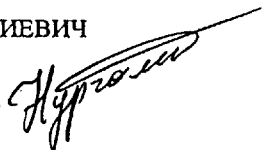


На правах рукописи

НУРГАЛИЕВ ФАРИТ МУЛЛАГАЛИЕВИЧ



АССОЦИИРОВАННАЯ ИНАКТИВИРОВАННАЯ ВАКЦИНА ПРОТИВ
ПАРВОВИРУСНОЙ БОЛЕЗНИ, СТРЕПТОКОККОЗА И САЛЬМОНЕЛЛЕЗА
СВИНЕЙ, ОЦЕНКА ЕЕ ИММУНОГЕННЫХ СВОЙСТВ

16.00.03 - ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология
03.00.07 - микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Казань – 2006

Работа выполнялась на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии в ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э Баумана» и в лаборатории по изучению болезней молодняка сельскохозяйственных животных ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности - ВНИВИ» (г. Казань)

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук, профессор
Госманов Рауис Госманович

Научный консультант: доктор ветеринарных наук, профессор
Гаффаров Харис Зарипович

Официальные оппоненты: – доктор ветеринарных наук, профессор
Сафин Марат Абдрахманович
– доктор ветеринарных наук,
Фомин Алексей Максимович

Ведущая организация: Институт ветеринарной медицины ФГОУ ВПО
«Омский государственный аграрный университет»

Защита состоится «27» декабря 2006 г. в 14 часов на заседании диссертационного совета Д – 220.0034.01 при ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э Баумана» (420074, Казань, ул. Сибирский тракт, 35)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э Баумана»

Автореферат разослан « » 2006 г.

Учёный секретарь диссертационного совета,
профессор

М.С. Ежкова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Нарушения воспроизводительной способности свиноматок могут вызывать различные микроорганизмы и приводить к гибели плода на различных стадиях внутриутробного развития. Бактериальные и вирусные болезни являются причиной до 40% всех нарушений функций органов репродуктивной системы свиней. Причиной этой патологии у животных может быть инфицирование парвовирусом свиней, вирусом репродуктивно-респираторного синдрома, хламидиями, стрептококками, сальмонеллами, бруцеллами, кишечной палочкой, лептоспирами и микоплазмами. Влияние на нарушения в воспроизводстве потомства оказывают также ящур, чума свиней, болезнь Ауески, грипп свиней, трансмиссивный гастроэнтерит свиней, африканская чума свиней, японский В-энцефалит, везикулярный стоматит и другие инфекции (Х.З. Гаффаров и др. 2004; S. Cvetnić 1984; T. Grøndalen et al. 1986).

Почти повсеместное распространение парвовирусной болезни свиней (ПВБС) в странах с интенсивно развитым свиноводством, в том числе и в Российской Федерации делает борьбу с ней одним из основных условий, необходимых для обеспечения нормального процесса воспроизводства свиного поголовья (Б.Г. Орлянкин и др. 1989; Т.З. Байбиков и др. 2005).

На сегодняшний день установлено наиболее важное значение условно-патогенной микрофлоры (стрептококков, сальмонелл) в этиологии инфекционных заболеваний, характеризующихся гибелью эмбрионов и плодов. Так, например, частота выделения патогенных стрептококков различных серологических групп от маститных свиноматок из вагинального секрета и абортированных плодов составляет в среднем 51,6 %, 51,5 % и 15,9 % случаев соответственно. (Е.В.Малик 2000).

Большое значение в профилактике смешанных форм инфекционных болезней у свиноматок имеет вакцинопрофилактика. При иммунизации животных моновалентными вакцинными препаратами сложно охватить весь спектр микроорганизмов, участвующих в данной патологии свиноматок. В связи с этим наибольшее значение приобретают разработка и применение ассоциированных (комплексных) вакцин (Х.З. Гаффаров и др. 2003).

В этой связи представляется весьма актуальной разработка ассоциированной вакцины против парвовирусной болезни, стрептококкоза и сальмонеллеза свиней, которая одновременно обеспечивала бы защиту животных от этих инфекционных заболеваний.

Цель и задачи исследований. Целью данной работы явилась разработка лабораторного регламента технологии изготовления и оценка эффективности применения ассоциированной инактивированной вакцины против парвовирусной болезни, стрептококкоза и сальмонеллеза свиней.

В соответствии с целью работы были поставлены следующие задачи:

- изучить этиологическую структуру наблюдаемых нарушений воспроизводительной функции свиноматок в хозяйствах зоны Среднего Поволжья и Предуралья;
- выделить возбудителей парвовирусной болезни, сальмонеллеза и стрептококкоза, вызывающих поражения репродуктивной системы свиноматок и изучить основные биологические свойства выделенных микроорганизмов;
- отобрать наиболее перспективные штаммы для изготовления вакцины, отличающиеся высокой иммуногенной активностью;
- изготовить и изучить антигенные свойства ассоциированных сорбированной и эмульгированной вакцин против парвовируса, стрептококкоза и сальмонеллеза в лабораторных и производственных условиях;

- испытать профилактическую эффективность изготовленной вакцины против парвовирусной болезни, стрептококкоза и сальмонеллеза свиней;
- разработать нормативно-техническую документацию на ассоциированную вакцину против парвовирусной болезни, стрептококкоза и сальмонеллеза свиней.

Научная новизна. Впервые на основе результатов клинико-эпизоотологического мониторинга и лабораторных исследований при инфекционных заболеваниях свиноматок, вызывающих нарушения воспроизводительной функции в ряде свиноводческих комплексов регионов Среднего Поволжья и Предуралья, показаны преимущественное распространение и циркуляция среди поголовья свиней возбудителей парвовирусной болезни, стрептококкоза и сальмонеллеза, проявляющиеся как моноинфекции так и в ассоциации.

Выделены и отобраны штаммы сальмонелл и стрептококков по степени патогенности для восприимчивых лабораторных животных, морфологическим, биохимическим и антигенным свойствам, а парвовируса «У-13» – по способности репродуцироваться в культуре клеток с характерными цитопатическими изменениями и антигенной идентичности его с референтными штаммами. Отобранные штаммы соответствуют основным требованиям, предъявляемым к штаммам микроорганизмов, пригодных для изготовления биопрепаратов.

На лабораторных и естественно восприимчивых животных установлены оптимальные концентрации и соотношение инактивированных антигенов микроорганизмов каждого штамма в вакцинном препарате, определена прививная доза для свиноматок.

Получены экспериментальные данные, указывающие на высокую антигенную и иммуногенную активность ассоциированной вакцины.

Испытание разработанной вакцины как в лабораторных, так и в производственных условиях показали ее эффективность.

Практическое значение. На основе проведенных исследований разработана и предложена для внедрения в ветеринарную практику «Ассоциированная инактивированная гидроокисьалюминиевая вакцина против парвовирусной болезни, стрептококкоза и сальмонеллеза свиней». На основе полученных результатов разработаны нормативно-технические документы: инструкция по изготовлению и контролю, технические условия, инструкция по применению.

Апробация работы. Основные положения диссертации доложены и обсуждены на: Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 45-летию ФГУ ВНИВИ «Проблемы экотоксикологического, радиационного и эпизоотологического мониторинга» (Казань, 2005); Международном симпозиуме «Научные основы обеспечения защиты животных от экотоксикантов, радионуклеотидов и возбудителей опасных инфекционных заболеваний» (Казань, 2005); Международной научно-производственной конференции ФГОУ ВПО «КГАВМ» (Казань, 2006); конференции молодых ученых и специалистов КГАВМ им. Н.Э. Баумана (Казань 2006);

Публикации. По теме диссертации опубликовано 5 научных работ, в том числе в «Ученых записках КГАВМ» (в списке изданий ВАК).

Основные положения диссертационной работы, выдвигаемые для защиты:

- этиологическая структура инфекционных заболеваний свиноматок с патологией органов репродуктивной системы в свинокомплексах регионов Среднего Поволжья и Предуралья;

- научное обоснование целесообразности создания ассоциированной вакцины против парвовирусной болезни, стрептококкоза и сальмонеллеза свиней;

- лабораторный регламент технологии изготовления, контроля и применения ассоциированной вакцины;

— установление антигенной и иммуногенной активности ассоциированной вакцины на лабораторных животных и свиноматках;

— показатели профилактической эффективности ассоциированной вакцины в производственных условиях.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 158 страницах машинописного текста и включает: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследований, выводы, практические предложения и список использованной литературы, состоящий из 200 источников, в том числе 92 иностранных. Диссертация иллюстрирована 12 таблицами и 3 рисунками.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы исследований

Работа выполнялась на кафедре микробиологии, вирусологии и иммунологии в ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им Н.Э. Баумана» и в лаборатории по изучению возбудителей болезней молодняка сельскохозяйственных животных ФГУ «Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности - ВНИВИ» (г. Казань) и в ряде свиноводческих хозяйств, расположенных в регионах Среднего Поволжья и Предуралья, в соответствии с тематическим планом НИР ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ».

Этиологию инфекционных болезней свиноматок с нарушением воспроизводительной функции изучали в 35 сельскохозяйственных предприятиях, расположенных в регионах Среднего Поволжья и Предуралья, из них 24 – в Республике Татарстан (РТ), 2 – в Республике Башкортостан (РБ), 6 – в Республике Марий Эл (РМ), 1 – Республике Чувашия, 1 – Кировской области, 1 – Ульяновской области.

Эпизоотологическое обследование и анализ ситуации в неблагополучных хозяйствах проводили согласно рекомендациям,

разработанным Бакуловым И. А. с соавт. (1975) и Джупиной С. И. (1991).

Изучение этиологии данной формы патологии проводилось бактериологическим, вирусологическим и серологическим исследованиями 96 абортированных плодов, мертворожденных и новорожденных поросят до приема молозива, 937 сывороток крови свиноматок и хряков с целью выявления возбудителей ПВБС, хламидиоза свиней, репродуктивно-респираторного синдрома свиней (PPCC), стрептококкоза, сальмонеллеза и бруцеллеза.

В процессе выполнения диссертационной работы были выделены из абортированных плодов свиноматок, отобранные, депонированы и использованы в качестве производственных штамм "У-13" парвовируса, штамм "С-05" стрептококкоза, штамм "К-03" сальмонеллеза.

При проведении экспериментов использовали лабораторных и естественно восприимчивых животных: свиноматки – 4515 голов, кролики – 18 голов; морские свинки – 5 голов; белые крысы – 25 голов; белые мыши – 100 голов;

Диагностика ПВБС осуществлялась в соответствии с «Методическими указаниями по диагностике парвовирусной болезни свиней», утверждены ГУВ Госагропрома СССР 24.01.89. Выделение и изучение биологических свойств культур стрептококков из биоматериала проводили в соответствии с «Методическими указания по лабораторной диагностике стрептококкоза животных», утверждены ГУВ МСХ СССР 30.08.83 г. Серологическую идентификацию и определение принадлежности стрептококков к группам по Лэнсфильду проводили в реакции латексной агглютинации с использованием набора Slidex Strepto. Выделение и изучение биологических свойств культур сальмонелл проводили в соответствии с «Методическими указаниями по бактериологической диагностике сальмонеллезов животных» рекомендованы ГУВ МСХ СССР 30.12.71 г и «Лабораторная

диагностика сальмонеллезов человека и животных, обнаружение сальмонелл в кормах, продуктах питания и объектах внешней среды». Методические указания, утверждены ГУВ при ГК СМ СССР по продовольствию и закупкам (1990).

При изготовлении лабораторных образцов ассоциированной вакцины использовали инаktivированные формалином бактериальные взвеси стрептококков, сальмонелл и парвовирусную суспензию. Составление ассоциированной вакцины проводили с таким расчетом, чтобы в 1 мл готового препарата содержалось 0,33 мл парвовирусной суспензии с геммагглютинирующей активностью 512 ГАЕ, $3,3 \times 10^9$ м.к. штамма стрептококков, $3,3 \times 10^9$ м.к. штамма сальмонелл, а также гель гидрата окиси алюминия, полученный из ФГУП «Щелковский биокомбинат», из расчета 10% к общему объему вакцины. Все компоненты тщательно перемешивали, доводили pH вакцины до 7,2-7,4, расфасовывали вакцину по флаконам и этикетировали.

В представленной работе для сравнительного изучения эффективности биопрепарата использовали вакцину, приготовленную с использованием масляного адьюванта (МА), на основе минерального масла Донковского химкомбината Липецкой области.

Антигенную активность вакцины изучали в опытах на белых крысах, кроликах и свиньях по способности вызывать у них выработку специфических антител к антигенам штаммов «У-13» Parvovirus suis в реакции торможения геммагглютинации (РТА), «С-05» Streptococcus suis и «К-05» Salmonella choleraesuis в реакции агглютинации (РА). Все операции с животными осуществляли в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утверждены МСХ СССР от 31 июля 1978 года.

Изучение особенностей клеточного иммунитета проводилось на кроликах после иммунизации ассоциированной вакциной. Т- и В-лимфоциты выделяли на градиенте плотности методом центрифугирования, их

идентификацию осуществляли в одном препарате методом Е-РОК и ЗС₃-РОК.

Оценку эффективности ассоциированной вакцины в производственных условиях осуществляли в 54-тысячном свиномкомплексе ГУСП «Совхоз Рошинский» РБ на основании сравнения фактических данных по получению жизнеспособных поросят до применения вакцины и после применения вакцины.

Полученные данные лабораторных исследований обрабатывали классическими методами вариационной статистики по известным программам на компьютере (Д.А. Старик, 1996; С. Фишер и др., 1997).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Мониторинг инфекционных болезней свиноматок с патологией органов воспроизводства в регионах среднего Поволжья и Предуралья

В период 2003-2006 гг. проведено исследование 1033 проб биоматериалов для диагностики на парвовирусную болезнь свиней, стрептококкоза и сальмонеллеза, полученных из 35 хозяйств 2 областей и 4 республик Среднего Поволжья и Предуралья. Доля хозяйств, где имеются сероположительные животные, составляет 97%.

Применение вакцин против ПВБС производства НПО «Нарвак» в условиях крупных свиномкомплексов «Совхоз Рошинский» РБ и «Камский бекон» РТ привело к сокращению случаев аборт и рождения мертвых и нежизнеспособных поросят. Однако проблема полностью не была решена, несмотря на то, что титры антител к ПВБС были достаточно высокими и напряженность поствакцинального иммунитета была оценена как вполне надежной. Вместе с тем частота случаев нарушения воспроизводительной функции возрастала, проявляющаяся в виде рождения мертвых и нежизнеспособных поросят. Поэтому в дальнейшем основное внимание было уделено

выяснению причин возникновения спорадических случаев аборт и рождения мертвых плодов путем обнаружения в РТГА специфических антител к парвовирусу свиней и проведения бактериологического анализа 105-патологических материалов – абортированных плодов до 70-го дня развития и мертворожденных поросят, а также абортированных плодов свиней на последнем месяце супоросности, полученных из четырех крупных свиногомплексов.

В результате проведенных исследований из биоматериалов «Совхоза Рощинский» и «Камский бекон» высевались патогенные по отношению к белым мышам микроорганизмы, идентифицированные как гемолитические стрептококки и сальмонеллы, а в двух других (совхоз «Кисинский» Аксубаевского района и ООО «Шинник» Нижнекамского района РТ) свиногомплексах из паренхиматозных органов абортированных плодов и мертворожденных поросят выделены патогенные микроорганизмы, типизированные как сальмонеллы.

Обнаружение специфических антител в транссудатах грудной и брюшной полостей у мертворожденных поросят из этих хозяйств свидетельствовало об их внутриутробном инфицировании, что косвенно подтверждает постоянную циркуляцию парвовируса свиней среди восприимчивого поголовья.

Таким образом, вирусологическим, бактериологическим и серологическим исследованиями нами было показано, что нарушения функции репродуктивных органов свиноматок в обследованных свиноводческих комплексах чаще всего вызывают парвовирус свиней, стрептококки и сальмонеллы, которые способны преодолевать плацентарный барьер и вызывать указанные заболевания как моноинфекции, так и в смешанной форме.

Выделение и изучение биологических свойств этиологических агентов, вызывающих нарушения воспроизводительной функции у свиней

В нашей работе был использован штамм «У-13» ПВС, выделенный в 1997 году сотрудниками лаборатории контроля и индикации возбудителей болезней молодняка сельскохозяйственных животных ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (Гаффаров Х.З., Абдеева М.З.). Культивирование штамма «У-13» ПВС проводили в перевиваемой линии культуры клеток почки поросенка «казанская» ППК. Для определения гемагглютинирующей способности изучаемого штамма парвовируса использовали реакцию гемагглютинации. Определение инфекционной активности штамма «У-13» парвовируса проводили путем титрования его на перевиваемой культуре клеток ППК. Инфекционный титр вируса вычислили по методу Рида и Менча, который составил $7,3 \pm 0,4 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{мл}}$.

При бактериологическом исследовании 43 абортированных плодов свиней, 31 мертворожденного поросенка и 3 околоплодных оболочек с применением различных питательных сред были выделены гемолитические и не гемолитические бактерии.

Выделенные гемолитические микроорганизмы, патогенные для белых мышей, отнесли к роду *Streptococcus*. Наиболее перспективной в плане дальнейшего использования в качестве производственного штамма в сравнительном изучении оказалась культура стрептококков условно обозначенная как «С-05». Данная культура была выделена из головного мозга мертворожденного поросенка, полученного из свиного комплекса «Камский бекон» Тукаевского района республики Татарстан. Серологическую идентификацию и определение принадлежности штамма «С-05» стрептококка к группам по Лэнсфильду провели в реакции латексной агглютинации (РЛА) с использованием набора Slidex Strepto. Штамм «С-05» стрептококка по результатам исследований отнесли к серогруппе В.

Выделенные негемолитические бактерии, патогенные для белых мышей, по результатам биологических и серологических исследований отнесли к роду *Salmonella*. В качестве производственного штамма для изготовления вакцины была отобрана наиболее вирулентная культура сальмонелл, выделенная нами из селезенки абортрованного плода, полученного из свинокомплекса совхоза «Кисинский» Аксубаевского района Республики Татарстан. Ее условно обозначили как штамм «К-05» *Salmonella choleraesuis*.

Лабораторный регламент технологии изготовления гидроокисьалюминиевой и эмульгированной ассоциированных вакцин против парвовирусной болезни, стрептококкоза и сальмонеллеза свиней

Технология изготовления ассоциированной инактивированной вакцины включает получение и инактивацию биомассы с максимально возможным сохранением антигенных и иммуногенных свойств отобранных штаммов.

Наработку биомассы штамма «У-13» ПВС проводили в культуре клеток ППК. Инактивировали вирусную суспензию штамма «У-13» парвовируса формалином. Контроль полноты инактивации вирусной суспензии проверяли в культуре клеток ППК путем проведения трехкратных слепых пассажей.

Для выращивания штамма «С-05» *Streptococcus suis* использовали МПА с содержанием 1% глюкозы и 5-10% дефибринированной крови барана. Штамм «К-03» *Salmonella choleraesuis* для получения бактериальной массы культивировали на МПА в матрацах. Инактивацию бактериальных масс проводили формалином. Контроль полноты инактивации осуществляли путем посева инактивированных бактериальных масс на глюкозно-кровяной МПА, МПА, МПБ, МППБ и среду Сабуро.

Перед нами была поставлена задача — подобрать адъювант для вакцины, обеспечивающий высокую антигенную активность и обладающий при этом низкой реактогенностью для животных. В качестве депонатора мы

использовали гель гидрата окиси алюминия (ГОА) и масляный адъювант (МА), состоящий из минерального масла с ланолином.

Для приготовления ассоциированной ГОА вакцины использовали гель гидрата окиси алюминия, из расчета 10 мл геля на 100 мл вакцинного препарата. Вирусную суспензию штамма ПВС, обладающую до инактивации гемагглютинирующей активностью 1:512, смешивали с бактериальными суспензиями сальмонелл и стрептококков, содержащих в 1 мл по 10 млрд.м.к., в равных соотношениях, тщательно перемешивали, доводили pH вакцины до 7,2-7,4, расфасовывали по флаконам, обкатывали алюминиевыми колпачками и этикетировали.

Для изготовления ассоциированной эмульсионной инактивированной вакцины вирусную суспензию ПВС концентрировали, путем сухого диализа используя полиэтиленгликоль-6000, при этом получали гемагглютинирующую активность суспензии 1:1024 и инактивировали ее, затем смешивали с бактериальными суспензиями сальмонелл и стрептококков, содержащих в 1 мл по 40 млрд.м.к., в соотношении 2:1:1. Полученную массу в равном соотношении объединяли с масляным адъювантом, тщательно перемешивали в размельчителе тканей марки «РТ-1» при 4000 об./мин в течение 3 минут, с последующим увеличением скорости до 8000 об./мин в течение 6 минут. Биопрепарат расфасовывали во флаконы объемом 100 или 200 мл, закрывали резиновыми пробками, обкатывали алюминиевыми колпачками и этикетировали.

Проведенный контроль каждой серии вакцины на стерильность, остаточную вирулентность и безвредность показал, что биопрепараты соответствуют требованиям, предъявляемым к инактивированным вакцинам.

Изучение антигенной и иммуногенной активности

гидроокисьалюминиевой и масляной ассоциированных вакцин на лабораторных животных

Изучение антигенной активности моно- и ассоциированной гидроокисьалюминиевых вакцин на белых крысах и кроликах

Для оценки антигенной активности и совместимости антигенов изготовленной ассоциированной вакцины использовали белых крыс и кроликов, иммунизируя их моно- и ассоциированной вакцинами против парвовирусной болезни, стрептококкоза и сальмонеллеза свиней.

В опыте было использовано 5 групп крыс живой массой 150-200гр, состоящих из 5 животных каждая. Крысам первой группы вводили моновакцину, изготовленную на основе антигенов штамма «К-03» сальмонелл, второй группы – штамма «С-05» стрептококков, третьей группе – штамма «У-13» ПВС, четвертой группе – ассоциированную вакцину, пятая группа крыс служила контролем. В одном миллилитре моновакцин против сальмонеллеза содержалось – 10 млрд.м.к., против стрептококкоза – 10 млрд.м.к., против ПВС – 512 ГАЕ. Вакцинацию проводили парентерально: моновакцины крысам вводили по 0,5 мл подкожно, ассоциированную вакцину – 1,5 мл. От подопытных крыс кровь брали тотальным обескровливанием через 14 дней после иммунизации. Титры специфических антител в пробах сывороток крови к антигенам ПВС определяли в РТГА, к антигенам стрептококков и сальмонелл – в РА, они составили в первой группе $7,4 \pm 0,27 \log_2$ к штамму «К-03» *Salmonella choleraesuis*, в второй группе $6,4 \pm 0,27 \log_2$ – «С-05» *Streptococcus suis*, в третьей группе $6,6 \pm 0,27 \log_2$ – «У-13» *Parvovirus suis*, в четвертой $6,4 \pm 0,27 \log_2$, $6,4 \pm 0,27 \log_2$, $6,6 \pm 0,27 \log_2$ соответственно, у пятой группы специфических антител обнаружено не было.

Сравнительный анализ результатов испытания моновакцин и ассоциированной вакцины на белых крысах показал, что различия антигенной активности у животных первой, второй и третьей групп по отношению к четвертой статистически не достоверны ($P > 0,05$),

Далее провели сравнительную оценку антигенной активности изготовленных образцов вакцины на кроликах. Вакцинные препараты вводили двукратно с интервалом в 14 дней в дозе по 1 мл для моновакцин и 3 мл для ассоциированной вакцины. Кроликов первой группы иммунизировали

моновакциной из штамма «У-13» *Parvovirus suis*, второй – моновакциной из штамма «С-05» *Streptococcus suis*, третьей – моновакциной из штамма «К-03» *Salmonella choleraesuis*, четвертой – ассоциированной вакциной. С целью изучения динамики накопления специфических антител у кроликов взятие проб крови осуществляли из ушной вены до иммунизации и на 14, 28 дни после вакцинации. Результаты исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1.

Уровень специфических антител в сыворотках крови кроликов, иммунизированных моно- и ассоциированной вакцинами

№ группы животных	Титр специфических антител в сыворотках крови								
	К парвовирусному антигену в РТГА ($\log_2$)			К стрептококковому антигену в РА ($\log_2$)			К сальмонеллезному антигену в РА ($\log_2$)		
	До вакц.	Через 14 дней	Через 28 дней	До вакц.	Через 14 дней	Через 28 дней	До вакц.	Через 14 дней	Через 28 дней
1	отр	7,6±0,4	10,0±0						
2				отр	5,6±0,4	7,6±0,4			
3							отр	8,6±0,4	10,6±0,4
4	отр	7,6±0,4	9,3±0,4	отр	5,3±0,4	7,6±0,4	отр	8,3±0,4	10,0±0

Результаты, представленные в таблице 1 показывают, что у всех подопытных кроликов, до введения вакцин, антитела к специфическим возбудителям отсутствовали, а после первой и второй вакцинации в сыворотках крови отмечалось увеличение титров антител. Таким образом, результаты проведенных исследований по изучению антигенной активности моно- и ассоциированной ГОА вакцин против парвовирусной болезни, стрептококкоза и сальмонеллеза свиней показали, что биопрепараты после двукратного введения лабораторным животным обеспечивают выработку специфических антител против антигенов парвовируса, *Str. suis* и *S. choleraesuis*.

Изучение иммуногенной активности гидроокисьюалюминиевой и масляной ассоциированных вакцин на кроликах

Сравнительная оценка антигенной активности изучаемой ассоциированной вакцины против парвовирусной болезни, стрептококкоза и

сальмонеллеза свиней нами проведена с добавлением к ней масляного адьюванта или геля гидрата окиси алюминия.

В опыте использовали 2 группы кроликов, состоящих из трех животных каждая. Кроликам первой группы вводили вакцину с МА внутримышечно в дозе 2 мл двукратно с интервалом 14 дней, второй группы – вакцину с добавлением ГОА внутримышечно в дозе 3 мл двукратно. Взятие крови для исследований осуществляли из ушной вены до иммунизации, на 14, 30, 60, 90, 120, 150 и 180-е дни после вакцинации. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Из таблицы видно, что на введение ассоциированной вакцины с добавлением МА у животных в сыворотках крови обнаруживаются специфические антитела больше, чем на вакцину с ГОА. Однако выявленные отличия статистически недостоверны ($P > 0,05$).

Изучение особенностей клеточного иммунитета проводилось на кроликах после иммунизации двумя вариантами ассоциированной инактивированной вакцины. Кроликов первой группы иммунизировали вакциной с добавлением МА в дозе 2 мл, второй группы вакциной с ГОА в дозе 3 мл, третью группу не иммунизировали – контрольная. Вакцины вводили двукратно с интервалом 14 дней внутримышечно. Взятие крови для исследований осуществляли из ушной вены до иммунизации и через 14 дней после каждой вакцинации.

Выделение лимфоцитов из крови кроликов проводили на градиенте плотности методом центрифугирования. Идентификацию и процентное соотношение Т- и В-лимфоцитов проводили в одном препарате методом Е-РОК и ЗСЗ-РОК. Результаты исследований количественных характеристик Т- и В-лимфоцитов в периферической крови кроликов до вакцинации, через 14 дней после первой и второй вакцинации представлены в таблице 3.

Исследования показали, что количество Т-лимфоцитов в крови кроликов статистически достоверно повышалось у животных первой и второй групп после второй вакцинации ($P < 0,01$). Статистически достоверное

Таблица 2

Динамика уровня специфических антител в сыворотке крови кроликов, привитых двумя типами вакцин ($M \pm m$, $n=3$)

№ гр. животных	Антигены	Титры антител (log ₂)							
		До вакц.	Через 14 дней	Через 30 дней	Через 60 дней	Через 90 дней	Через 120 дней	Через 150 дней	Через 180 дней
Кролики, иммунизированные вакциной с МА									
1	Parvovirus suis	отр.	6,67±0,41	9,67±0,41	11,33±0,41	11,0±0	11,0±0	10,67±0,41	10,33±0,41
	Str. suis	отр.	5,0±0	7,41±0,41	9,0±0	8,67±0,41	8,67±0,41	9,0±0	8,33±0,81
	S. choleraesuis	отр.	6,67±0,41	9,67±0,41	10,67±0,41	10,33±0,81	10,67±0,41	10,33±0,41	10,0±0
Кролики, иммунизированные ГОА вакциной									
2	Parvovirus suis	отр.	7,67±0,41	9,33±0,41	10,66±0,41	10,33±0,41	10,66±0,41	10,0±0,71	9,66±0,41
	Str. suis	отр.	5,33±0,41	7,67±0,41	8,67±0,41	8,33±0,41	8,33±0,41	8,67±0,41	7,67±0,41
	S. choleraesuis	отр.	8,33±0,41	10,0±0	11,0±0,71	11,33±0,41	10,67±0,41	11,0±0	9,66±0,41

Таблица 3

Содержание Т- и В-лимфоцитов в крови кроликов, привитых двумя типами вакцин

№ № Группы	Лимфоциты (%)					
	До вакцинации		После первой вакцинации		После второй вакцинации	
	Т-	В-	Т-	В-	Т-	В-
1 Использована вакцина с МА	52,9 $\pm$ 1,8	16,9 $\pm$ 0,2	55,7 $\pm$ 2,0	19,9 $\pm$ 0,1	57,4 $\pm$ 1,3	22,9 $\pm$ 1,4
2 Использована вакцина с ГОА	52,7 $\pm$ 1,6	16,4 $\pm$ 0,4	55,2 $\pm$ 1,5	19,2 $\pm$ 0,2	58,2 $\pm$ 0,9	23,5 $\pm$ 0,5
3 Контрольная	52,1 $\pm$ 0,2	16,5 $\pm$ 0,4	52,3 $\pm$ 0,1	16,7 $\pm$ 0,2	52,6 $\pm$ 0,4	16,7 $\pm$ 0,2

увеличение В-лимфоцитов у животных первой и второй групп, отмечалось после первой и второй вакцинации ($P < 0,001$) по отношению к контрольной группе. Отличия между результатами первой и второй опытных групп статистически недостоверны ($P > 0,05$).

Таким образом, результаты проведенных исследований по изучению ассоциированной инактивированной вакцины против парвовирусной болезни, стрептококкоза и сальмонеллеза свиней на кроликах показали, что она с добавлением ГОА или МА обладает антигенной и иммуногенной активностью и обеспечивает формирование напряженного иммунитета.

Изучение антигенной активности гидроокисьюалюминиевой ассоциированной вакцины на свиноматках

Для определения оптимальной дозы ассоциированной ГОА вакцины опыты проводили в условиях свинофермы ООО «Оршанский сельхозпром» Оршанского района РМ на 3 группах свиноматок, состоящих из 5 животных каждая.

При исследовании сывороток крови свиноматок до опыта специфических антител к антигенам ПВС в РТГА, стрептококкозу и сальмонеллезу в РА обнаружено не было.

Свиноматок иммунизировали ассоциированной ГОА вакциной внутримышечно в область шеи двукратно, первый раз за 2-3 недели до осеменения и второй раз — через 21 день. Первую группу свиноматок вакцинировали в дозе 3 мл, вторую группу — в дозе 5 мл, третью группу — в дозе 7 мл, четвертая группа свиноматок служила контролем. Взятие крови осуществляли из хвостовой вены через 14 дней после повторной вакцинации. Результаты исследования проб сывороток крови свиноматок представлены в таблице 4.

Из таблицы 4 видно, что после вакцинации у животных во всех группах отмечалось увеличение титров специфических антител в сыворотке крови. При этом сравнительный анализ результатов испытания различных доз препарата у животных при использовании доз 5 и 7 мл показал, что

достоверно ($P < 0,05$) достигаются более высокие титры антител по сравнению с дозой 3 мл.

Клиническое наблюдение за вакцинированными свиньями показало, что двукратное введение вакцины не оказывало отрицательного влияния на

Таблица 4

Уровень специфических антител в сыворотке крови иммунизированных свиноматок на 14 день после второй вакцинации.

№№ группы животных	Доза вакцины, мл	№№ животного	Уровень специфических антител в пробах сывороток крови		
			к парвовирусу в РТГА	к стрептококкозу в РА	к сальмонеллезу в РА
1	3	$M \pm m$	$9,4 \pm 0,27$	$5,6 \pm 0,27$	$9,0 \pm 0,35$
2	5	$M \pm m$	$10,8 \pm 0,42$	$6,4 \pm 0,27$	$9,8 \pm 0,22$
3	7	$M \pm m$	$11,2 \pm 0,55$	$6,6 \pm 0,27$	$10,0 \pm 0,35$

общее состояние организма. На месте введения биопрепарата наблюдали незначительную припухлость, которая исчезала через 10-14 дней. После осеменения у всех подопытных животных супоросность прошла без осложнений, на одну свиноматку было получено в первой группе $10,2 \pm 0,41$, второй – $10,6 \pm 0,57$, третьей – $10,4 \pm 0,57$, четвертой – $10,4 \pm 0,57$ поросят.

Таким образом, была определена наиболее оптимальная прививная доза ассоциированной ГОА вакцины против парвовируса свиней, стрептококкоза и сальмонеллеза свиней, которая составила 5 мл.

Производственное испытание вакцины ассоциированной инактивированной вакцины против парвовирусной болезни, стрептококкоза и сальмонеллеза

Производственное испытание опытных серий «Ассоциированной инактивированной вакцины против парвовирусной болезни, стрептококкоза и сальмонеллеза свиней» проводили в условиях крупного свиноводческого комплекса ГУСП «Совхоз Рошинский» Стерлитамакского района РБ.

Свинокомплекс ГУСП «Совхоз Рошинский» рассчитан на 54 тыс. голов свиней, где в последние 5 лет наблюдались аборт; в отдельные месяцы, достигавшие 10-12% у супоросных свиноматок. В комплексе

регистрировались инфекционные заболевания свиноматок, характеризующиеся рассасыванием эмбрионов, мумификацией плодов, абортами, рождением мертвых и нежизнеспособных поросят.

Как показали проведенные исследования, причиной наблюдаемой патологии свиноматок является комплекс факторов. В одних случаях они были обусловлены тем, что в хозяйстве циркулируют потенциальные возбудители инфекционных абортс свиноматок – парвовирус и хламидии, в других случаях они были обусловлены смешанной инфекцией, чаще всего парвовирусом, стрептококками и сальмонеллами, которые вызывали у взрослых животных латентную инфекцию и протекали бессимптомно, но у супоросных свиноматок вызывали нарушения репродуктивной функции.

С учетом полученных нами результатов исследований для специфической профилактики парвовирусной болезни, стрептококкоза и сальмонеллеза свиноматок было решено провести производственное испытание в данном хозяйстве опытно-производственных серий ассоциированной вакцины против этих заболеваний.

Основных свиноматок вакцинировали первый раз за 2-3 недели до осеменения и второй раз через 21-23 дня, ремонтных свиноматок – первый раз за 3-4 недели до осеменения и второй раз через 21-23 дня. Хряков-производителей первый раз вакцинировали в 6-7 месячном возрасте, а затем через каждые 6 месяцев. Испытание ассоциированной инактивированной гидроокись алюминиевой вакцины против парвовирусной болезни, стрептококкоза и сальмонеллеза для вакцинации свиноматок и хряков производителей было проведено на 4500 гол. свиней в производственной зоне свиного комплекса «Совхоз Рощинский».

С целью определения уровня поствакцинального иммунитета у свиноматок, вакцинированных ассоциированной вакциной против парвовирусной болезни, стрептококкоза и сальмонеллеза свиней, проводили выборочные серологические исследования сывороток крови. Для этого кровь брали на 14 день после их повторной иммунизации. При этом установили

накопление специфических антител к парвовирусу в титрах $9,44 \pm 0,19 \log_2$, к стрептококку – $5,88 \pm 0,19 \log_2$ и сальмонеллам – $7,88 \pm 0,19 \log_2$, что служит количественной характеристикой антигенной активности биопрепарата.

Проведенный сравнительный анализ получения и сохранности приплода у иммунизированных свиноматок показал, что применение ассоциированной вакцины против парвовируса, стрептококкоза и сальмонеллеза способствовало увеличению выхода поросят. Так, если в группе иммунизированных свиноматок ассоциированной вакциной было получено 85% жизнеспособных и 15% мертворожденных и нежизнеспособных поросят, то в контрольной группе – оказалось соответственно 77,5%, и 22,5% поросят. Применение предложенной нами вакцины на свиноматках позволило увеличить выход поросят на 7,5%.

Следовательно, разработанная ассоциированная ГОА вакцина против парвовирусной болезни, стрептококкоза и сальмонеллеза свиней обуславливает формирование напряженного иммунитета и создает защиту плодов от этих возбудителей, и тем самым обеспечивает увеличение выхода поросят.

Таким образом, разработана и предложена для внедрения в ветеринарную практику «Ассоциированная инактивированная гидроокисьалюминиевая вакцина против парвовирусной болезни, стрептококкоза и сальмонеллеза свиней». На основе полученных результатов разработаны нормативно-технические документы: инструкция по изготовлению и контролю, технические условия, инструкция по применению вакцины.

ВЫВОДЫ

1. Клинико-эпизоотологическим обследованием свиноводческих комплексов в регионах Среднего Поволжья и Предуралья установлено, что инфекционные болезни у свиноматок, вызываемые инфекционными агентами вирусной и бактериальной природы, характеризуются гибелью эмбрионов и

плодов на разных стадиях внутриутробного развития, что проявляется в виде их мумификации, абортами (выкидышами), мертворождением и бесплодием.

2. Вирусологическим, бактериологическим и серологическим исследованиями показано, что нарушения функции репродуктивных органов свиноматок, вызывают парвовирус свиней, стрептококки и сальмонеллы, которые способны преодолевать плацентарный барьер и вызывать указанные заболевания как моноинфекции, так и в смешанной форме.

3. По степени антигенной активности и патогенности для восприимчивых лабораторных животных в качестве производственных микроорганизмов отобраны штаммы «К-03» сальмонелл и «С-05» стрептококков, а по способности репродуцироваться в культуре клеток с характерными цитопатическими изменениями и антигенной идентичности его по отношению к референтному парвовирусу — штамм «У-13» парвовируса свиней.

4. Сравнительным исследованием антигенной и иммуногенной активности ассоциированной инактивированной вакцины на кроликах установлено, что ее масляный вариант в прививной дозе 2 мл и сорбированный на ГОА в прививной дозе 3 мл, обеспечивают максимальное накопление специфических антител к парвовирусу $11,33 \pm 0,41 \log_2$ и $10,66 \pm 0,41 \log_2$ в РТГА, к стрептококку $9,0 \pm 0 \log_2$ и $8,67 \pm 0,41 \log_2$ в РА, сальмонеллам $10,67 \pm 0,41 \log_2$ и $11,0 \pm 0,71 \log_2$ в РА соответственно на 60 день после двукратного, с интервалом 14 дней, внутримышечного введения. Следовательно, в результате проведенных экспериментов показано, что оба варианта вакцин, содержащих в одной прививной дозе равное количество антигенов каждого штамма, обладают выраженной иммуногенной активностью.

5. Испытанием антигенной активности ассоциированной инактивированной гидроокисьалюминиевой вакцины на 3 группах свиноматок, состоящих из 5 животных в каждой, в условиях благополучного

по инфекционным заболеваниям хозяйства установлена оптимальная прививная доза.

6. Применение предложенной ассоциированной инактивированной гидроокисьалюминиевой вакцины в крупном свиноводческом комплексе вызывает образование специфических антител у животных к парвовирусу $9,44 \pm 0,19 \log_2$ в РТГА, к стрептококку $5,88 \pm 0,19 \log_2$ в РА и сальмонеллам $7,88 \pm 0,19 \log_2$ в РА, что служит количественной характеристикой антигенной активности биопрепарата. Двукратная иммунизация свиноматок ассоциированной вакциной за 2-3 недели до осеменения с интервалом 21-23 дня в дозе по 5 мл позволила увеличить выход поросят на 7,5% в сравнении с периодом до применения вакцины.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

На основе проведенных исследований разработана и предложена для внедрения в ветеринарную практику «Ассоциированная инактивированная гидроокисьалюминиевая вакцина против парвовирусной болезни, стрептококкоза и сальмонеллеза свиней». Подготовлены нормативно-технические документы, регламентирующие изготовление, контроль и применение данного биопрепарата, в частности:

- Выделены, отобраны и депонированы в лаборатории по хранению и изучению штаммов возбудителей особо опасных болезней ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» штаммы «У-13» *Parvovirus suis*, «С-05» *Streptococcus suis*, «К-03» *Salmonella choleraesuis*, соответствующие основным требованиям, предъявляемым к производственным штаммам (24.01.2006 г.),

- «Временная инструкция по изготовлению и контролю ассоциированной инактивированной вакцины против парвовирусной болезни, стрептококкоза и сальмонеллеза свиней» (утверждена ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» 24.01.2006 г.),

- «Технические условия на ассоциированную инактивированную вакцину против парвовирусной болезни, стрептококкоза и сальмонеллеза свиней» (утверждены ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» 15.02.2006 г.),

– «Временная инструкция по применению ассоциированной инактивированной вакцины против парвовирусной болезни, стрептококкоза и сальмонеллеза свиней (в порядке производственного опыта)» (утверждена ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» 15.02.2006 г.),

– материалы диссертации используются в учебном процессе ФГОУ ВПО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им Н.Э. Баумана».

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Нургалиев, Ф.М. Мониторинг заболеваний свиноматок с патологией воспроизводства в регионе среднего Поволжья и Предуралья / Ф.М. Нургалиев, М.З. Абдеева, Х.З. Гаффаров, Р.Г. Госманов, А.Г. Кузнецов // Всероссийская научно-практическая конференция, посвященная 45-летию ФГНУ ВНИВИ. – Казань, 2005. – С. 341-348.

2. Нургалиев, Ф.М. Иммунобиологическая характеристика эпизоотологически значимых возбудителей, обуславливающих патологию репродуктивной функции свиней / Ф.М. Нургалиев, М.З. Абдеева, Г.Н. Спиридонов, Х.З. Гаффаров, Р.Г. Госманов // Международный симпозиум – Казань, 2005. – Т. 2. – С. 247-251.

3. Нургалиев, Ф.М. Совместимость антигенов в ассоциированной вакцине против парвовирусной болезни, стрептококкоза и сальмонеллеза свиней / Ф.М. Нургалиев, Х.З. Гаффаров, Р.Г. Госманов // Мат. межд. науч.-произ. конференции, КГАВМ – Казань, 2006. – С. 38-42.

4. Нургалиев, Ф.М. Об этиологии инфекционных болезней свиноматок с нарушением воспроизводительной функции / Ф.М. Нургалиев // Мат. конференции молодых ученых и специалистов КГАВМ им. Н.Э. Баумана – Казань, 2006. – С. 49-50.

5. Нургалиев, Ф.М. Разработка технологии изготовления ассоциированной вакцины против парвовирусной болезни, стрептококкоза и сальмонеллеза свиней / Нургалиев Ф.М., Гаффаров Х.З., Госманов Р.Г. // Ученые записки КГАВМ. – Казань, – 2006. – Т. 183 – С. 171-176.

Подписано к печати 22.11.06.
Заказ 269 Тираж 100 экз.
Бумага офсетная

Формат 60х84/16
Усл.-печ. л. 1.0
Печать RISO

Центр информационных технологий КГАВМ
420074, Казань, Сибирский тракт, 35.

