

*На правах рукописи*



**Тяпин Владимир Валерьевич**

**СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СХЕМ  
СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ  
БРУЦЕЛЛЁЗА МАРАЛОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
ЖИВОЙ СЛАБОАГГЛЮТИНОГЕННОЙ  
ВАКЦИНЫ ИЗ ШТАММА *Brucella abortus* 75/79-AB**

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

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата ветеринарных наук

Барнаул 2005

Работа выполнена в ГНУ Всероссийском научно-исследовательском институте пантового оленеводства СО РАСХН и ИВМ Алтайского государственного аграрного университета.

**Научный руководитель** - доктор ветеринарных наук, профессор  
**Луницын Василий Герасимович**

**Научный консультант** - доктор ветеринарных наук  
**Никифоров Иван Порфирьевич**

**Официальные оппоненты:** доктор ветеринарных наук, профессор  
**Димов Сергей Константинович;**

кандидат ветеринарных наук  
**Огнёв Сергей Ильич**

**Ведущая организация** - Всероссийский научно-исследовательский институт бруцеллёза и туберкулеза животных

Защита диссертации состоится «13» мая 2005 г. в 10:00 часов на заседании диссертационного совета Д 220.002.02 в Алтайском государственном аграрном университете по адресу: 656922, Алтайский край, г. Барнаул, ул. Попова 276, ИВМ АГАУ.

Факс (385-2) 31-30-48.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке АГАУ.

Автореферат разослан «8» апреля 2005 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
доктор ветеринарных наук,  
профессор



**П.И. Барышников**

## 1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Бруцеллёз сельскохозяйственных животных является одной из основных проблем ветеринарной науки и практики, актуальность которой определяется, прежде всего, опасностью для здоровья человека, а также широкой распространённостью данного заболевания.

Уже давно стало очевидным, что успешная борьба с этой зооантропонозной инфекцией в широких масштабах практически невозможна без использования средств специфической профилактики (Косилов И.А., 1985, 1992; Шумилов К.В., 1987; Салмаков К.М., 1975, 1987; Димов С.К., 1993; и др.).

Теория и практика управления эпизоотическим процессом бруцеллёза в популяциях животных неблагополучных и угрожаемых зон за счет рациональных схем вакцинации диктует необходимость обеспечения перманентного иммунитета. При этом не менее важно иметь максимальную возможность бесприпятственного проведения комплексной посвакцинальной диагностики бруцеллёза в целях быстрого оздоровления ферм и последующего объективного эпизоотологического контроля за их благополучием (Никифоров И.П., 1980, 1981, 1985; Косилов И.А., 1985, 1992; Орлов Е.С., Шумилов К.В., 1992; Сайченко В.И., 1995).

Таким требованиям, в частности, в большей степени соответствует широко используемая в настоящее время в нашей стране на маралах и крупном рогатом скоте вакцина из слабоагглютиногенного штамма *Brucella abortus* 82.

Указанная вакцина обладает достаточно высоким уровнем иммуногенности и противоэпизоотической эффективности, однако имеет и ряд недостатков, связанных, прежде всего, с продолжительной персистенцией антител в крови иммунизированных маралов, длительной приживаемости и возможности миграции штамма от вакцинированных к невакцинированным животным (Хлыстунов А.Г. с соавт., 1997). На нестабильность биологических свойств и abortогенность штамма 82 у крупного рогатого скота указывают исследования ряда авторов: К.М. Салмаков (1975), С.К. Димов (1993), В.Г. Ощепков (1998).

Исходя из вышеизложенного, очевидна необходимость поиска новых, более совершенных противобруцеллёзных вакцин, лишённых

этих недостатков. Одной из таких вакцин является вакцина из штамма *Brucella abortus* 75/79-AB, которая была селекционирована и комплексно изучена И.П. Никифоровым (1979-1996) на крупном рогатом скоте.

Изучение указанного штамма на маралах с позиций требований, предъявляемых к вакцинам, никто не проводил.

**Цель исследований** - изучить основные свойства вакцины из штамма *Brucella abortus* 75/79-AB на маралах.

**Задачи исследований:**

1. Изучить эпизоотическую ситуацию по бруцеллёзу маралов в Алтайском крае и противоэпизоотическую эффективность вакцины из штамма *Brucella abortus* 82.

2. Изучить приживаемость и возможность миграции вакцинного штамма 75/79-AB в организме маралов.

3. Изучить иммуногенные свойства вакцины из штамма *Brucella abortus* 75/79-AB на маралах, отработать оптимальную иммунизирующую дозу.

4. Сравнить иммунологическую эффективность вакцин из штаммов 82 и 75/79-AB, изучить их антигенные свойства.

**Научная новизна.** Впервые на маралах изучены приживаемость, возможность миграции, а также иммуногенные свойства вакцины из штамма 75/79-AB, при этом определена оптимальная иммунизирующая доза. Проведена сравнительная оценка иммуногенных и антигенных свойств вакцин из штаммов *Brucella abortus* 82 и *Brucella abortus* 75/79-AB на маралах; отработана методика эутоназии маралов миорелаксантом «Адилин-супер».

**Практическая значимость.** В ходе проведённых исследований разработаны рекомендации «Диагностика, профилактика и меры борьбы с бруцеллёзом маралов» (2005), утвержденные учёным советом ВНИИПО (протокол № 1 от 11 февраля 2005 г.), и рекомендованы к внедрению научно-техническим советом управления ветеринарии администрации Алтайского края (протокол № 2 от 18 марта 2005 г.).

**Апробация работы.** Результаты исследований доложены, обсуждены и одобрены на научно-практической конференции молодых ученых «Вопросы пантового оленеводства и болезней сельскохозяйственных животных» (г. Барнаул, 2003); региональной научной студенческой конференции «Достижения и перспективы студенческой науки в АПК» (г. Барнаул, 2003); Международной научно-практи-

ческой конференции молодых ученых СО РАСХН «Новейшие направления развития аграрной науки в работах молодых ученых» (Новосибирская область, п. Краснообск, 2004); Международной конференции «Развитие международного сотрудничества в области изучения инфекционных заболеваний» (Новосибирская область, ГНЦ ВБ «Вектор», 2004); учёных советах ВНИИ пантового оленеводства (2001-2004) и научно-техническом совете управления ветеринарии администрации Алтайского края (2005).

**Публикации результатов исследований.** По теме диссертации опубликовано 7 научных работ.

**Выносятся на защиту:**

1. Анализ эпизоотической ситуации по бруцеллёзу маралов в Алтайском крае и противоэпизоотической эффективности вакцины из штамма *Brucella abortus* 82.

2. Приживаемость и возможность миграции вакцинного штамма *Brucella abortus* 75/79-AB в организме маралов.

3. Определение иммуногенных свойств вакцины из штамма 75/79-AB, изыскание оптимальной иммунизирующей дозы для маралов.

4. Определение сравнительной иммунологической эффективности и антигенных свойств вакцин из штаммов *Brucella abortus* 82 и *Brucella abortus* 75/79-AB на маралах.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена на 144 страницах и включает введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение результатов исследований, выводы, практические предложения, библиографический список, приложение. Библиографический список включает 183 источника, в том числе 33 зарубежных. Работа иллюстрирована 4 фотографиями, 21 рисунком и 11 таблицами.

## **2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1. Материалы и методы исследования**

Работа выполнялась с 2001 по 2005 гг. во Всероссийском научно-исследовательском институте пантового оленеводства, на кафедре эпизоотологии и ВСЭ ИВМ АГАУ, а также в мараловодческих хозяйствах Алтайского края.

Эксперименты проводились на 50 маралах, 20 из которых маралухи 4-5-летнего возраста и 30 телята 6-месячного возраста.

Материалом для изучения и анализа эпизоотической ситуации по бруцеллёзу маралов послужили данные годовой ветеринарной отчётности Алтайского края за период с 1969 по 2003 гг.

Для иммунизации маралов использовались вакцины из слабоагглютиногенных штаммов *Brucella abortus* 82 и *Brucella abortus* 75/79-AB, которые вводили в дозах 50 и 100 млрд м.к. подкожно, в область средней трети шеи, в объёме 5 мл.

Реактогенные свойства вакцин изучали в течение 13 суток путем пальпации места инъекции. При этом учитывали болезненность, температуру на месте введения препарата, размеры отека и её консистенцию, общее состояние животных, а также проводили термометрию опытных и контрольных животных по общепринятой в ветеринарии методике.

Всего подвергнуто комплексному исследованию на бруцеллёз 503 пробы сыворотки крови. При постановке серологических реакций в качестве диагностических тестов применяли РБП, РА, РСК с S- и R(*ovis, bovis*)-антигенами, постановку и учёт которых проводили согласно регламентированным методикам. При постановке РБП использовали цветной антиген (антиген бруцеллёзный для РБП, производства Щёлковского биокомбината, серия 4, годен до 12.2005 г.); для РА и РСК - единый бруцеллёзный биофабричный S- и R-антигены: *ovis* (изготовленный 01.2003 г. НПФ «Биоцентр», г. Омск, серия 1, контроль 1, срок годности - 12 месяцев) и *bovis* производства ВНИИБТЖ (из штамма 16/4 - Л.В. Дегтяренко). Пластинчатую РА на стекле изучали с S- и R-бруцеллёзными сыворотками и трипафлавином.

Забор и приготовление образцов сыворотки крови от маралов проводили следующим образом: животных фиксировали в панторезном станке (после заражения в специальном расколе), с правой стороны шеи, в области яремной вены выстригали шерсть, накладывали жгут, место укола дезинфицировали 70%-ным раствором спирта. Взятие крови осуществляли кровобрательной иглой Боброва А-26×4017И52. Пробы крови отбирали в пробирки Флоринского в количестве 3-4 мл с трилоном-Б (3-4 капли), а для приготовления сыворотки - в бактериологические пробирки по 10-15 мл. Для получения сыворотки кровь помещали в термостат на 3 часа при температуре 37°C, после ретракции сгусток осаждали центрифугировани-

ем (1000-1500 об/мин). Сыворотку сливали и исследовали в течение 10 дней свежую либо замораживали, сохраняя в таком виде непосредственно до исследования.

В цельной крови определяли общее количество лейкоцитов и эритроцитов (в камере Горяева в 1 мкл крови); в сыворотке крови - содержание общего белка рефрактометрическим методом (ИФР-22), фракции белка - нефелометрическим методом по И.П. Кондрахину (1985).

Для заражения животных использовали культуру вирулентного штамма *Brucella abortus* 544 (музейный штамм, ГНУ ВНИИБТЖ СО РАСХН) в дозах 15 и 30 млн м.к., которую вводили конъюнктивально, по 0,1 мл суспензии в каждый глаз, содержащей, соответственно, 7,5 и 15 млн м.к. бруцелл.

Пробы биоматериала для установления диагноза лабораторным методом отбирали согласно требованиям, предъявляемым к патологическому материалу при бруцеллёзе крупного рогатого скота.

Патологическую картину бруцеллёза у вынужденно убитых телят маралов изучали методом полного патологоанатомического вскрытия по методике М.С. Жакова (1977).

Отбор материала, приготовление и окраску гистологических срезов проводили согласно регламентированным методикам.

Для культивирования бруцелл использовали питательные среды с добавлением глюкозы и глицерина, а именно: мясопептонный печёночный глюкозо-глицериновый агар (МППГГА) и бульон (МППГГБ).

Порядок посева и идентификацию выделенных культур проводили по общепринятым методикам.

Достоверность результатов подтверждали путем статистической обработки с помощью критерия Стьюдента. Результат считали достоверным при  $P < 0,05$ .

### **3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

#### **3.1. Противоэпизоотическая эффективность вакцины из штамма *Brucella abortus* 82 при бруцеллёзе маралов**

Полученные аналитические данные годовой ветеринарной отчетности Алтайского края за период 1969-2003 гг. свидетельствуют о неблагополучии четырех маралоферм по бруцеллёзу: «Абайский» - 2 фермы, «Чергинский» - 1 ферма, «Шебалинский» - 1 ферма.

В первые два года работы в этих хозяйствах осуществляли 2-3-кратное исследование маралов на бруцеллёз в РА и РСК. Животных исследовали в основном в летние и осенние месяцы с последующим убоем реагирующих.

По данным ветеринарной отчётности, в 1969-1971 гг. при исследовании 3224 проб сывороток крови, взятых от маралов разного пола и возраста на 4 фермах трех хозяйств, было выделено 610 реагирующих животных в РА и РСК (18,9%). По данным Н.Т. Третьяка, который в то время занимался проблемой искоренения бруцеллёза маралов и испытывал на них противобруцеллёзные препараты, при исследовании 697 маралов в одном из хозяйств Республики Алтай он выделил 240 (34,5%) серопозитивных животных, причём в РСК реагировало 147 (21,1%), а в РА - 93 (13,3%) голов.

От животных с выраженными клиническими признаками (поражения суставов, баланопаститы) и имеющими высокие титры в РА (1:200 и выше) был отобран биоматериал для лабораторного исследования, в ходе которого были изолированы бруцеллы вида *Abortus*. В результате этого с 1976 г. было принято решение иммунизировать все поголовье маралов неблагополучных ферм вакциной из штамма *V. abortus* 82 в дозе 100 млрд м.к. Кроме этого маралов-перворожков и маралушек ежегодно ревакцинировали в течение последующих 4-5 лет, что составило 269-1426 голов в год в зависимости от полученного приплода.

В последующие годы при применении вакцины из штамма 82 количество серопозитивных животных резко уменьшилось, и к 1983 г. данные фермы были объявлены свободными от бруцеллёза. С них были сняты ограничения и разрешена продажа и вывоз ценных маралов не только в другие хозяйства Алтайского края, но и в другие регионы страны.

Однако в следующие 10-12 лет при исследовании сывороток крови в серологических тестах стали выявляться от 1 (0,06% из 1593 исследованных) до 43 (3,07% из 1400 исследованных) реагирующих животных. Взятый биоматериал исследовали лабораторно, при этом бруцеллёз был исключён, а в ряде случаев была выделена культура вакцинного штамма 82.

Кроме этого зарегистрированы случаи выделения серопозитивных маралов по истечении 5 лет после вакцинации (совхоз «Тумановский» и ТОО «Медведевское» Солонешенского района). С

1992 по 1997 гг. реагировало от 5,4 до 8,27% рогачей (в РА 1:50-1:100; РСК 1:5-1:40; часть в тест-системе с ОПС-антигеном).

Применение данной вакцины в комплексе общих ветеринарно-санитарных мероприятий на маралах позволило в значительной степени ослабить напряженность эпизоотического процесса и оздоровить маралохозяйства Алтайского края от бруцеллёза, но при этом возникла проблема серопозитивности животных в отдалённые сроки после прививок, что, в свою очередь, затрудняет диагностику заболевания.

### **3.2. Изучение приживаемости и возможности миграции вакцинного штамма *Brucella abortus* 75/79-АВ в организме маралов**

Изучение приживаемости и возможности миграции вакцинного штамма *B. abortus* 75/79-АВ проводили в ОПХ «Новоталицкое» Чарышского района на 20 маралуках 4-5-летнего возраста, ранее не вакцинированных никакими противобруцеллёзными вакцинами.

Животных в количестве 15 голов иммунизировали вакциной из штамма 75/79-АВ в дозе 50 млрд м.к. и содержали совместно с 5 невакцинированными маралуками в течение 4 месяцев.

Динамику появления и угасания серологических реакций изучали, исследуя сыворотку крови в РА и РСК с единым бруцеллёзным биофабричным S- и R(*ovis*)-антигеном на 15, 33, 55, 89 и 122-й день после иммунизации.

Данные серологических тестов свидетельствуют, что иммунологические реакции в РА и РСК с S-антигеном у всех животных в указанные сроки отсутствовали. Отмечена положительная РСК с R(*ovis*)-антигеном через 15 дней после иммунизации у 7 вакцинированных животных из 15 в титрах от 1:5 до 1:20, через 33 дня - у 2 из 12 в титре 1:10, а через 55 дней - у 1 маралуки из 9 в титре 1:10. Общий процент реагирующих в РСК с R(*ovis*)-антигеном составил 66,7.

В последующие сроки серодиагностики (89-й и 122-й день), реагирующих в тест-системах не было.

В группе контрольных животных серопозитивные во все сроки исследования не выявлены.

В каждый срок, после взятия крови, проводили убой 4 маралух (3 из опытной и 1 из контрольной групп) с последующим отбором

биоматериала и бактериологическим исследованием. От каждого животного были взяты от 18 до 24 объектов биоматериала (лимфатические узлы, печень, селезёнка).

Высевы из каждой пробы проводили на 1 пробирку мясопептонного печёночного глюкозо-глицеринового бульона (МПШТБ) и 2 пробирки с агаром (МППГГА).

Посевы инкубировали в термостате в течение 30 суток при температуре 37-38°C. Первичный рост наблюдали на 5-е сутки. На 15-й день изолировано три, на 33 день - одна и на 55 день - также одна культура вакцинного штамма 75/79-AB.

В результате бактериологического исследования из биоматериала контрольной группы маралух ни в одном случае культур вакцинного штамма 75/79-AB не выделено.

Таким образом, вакцинный штамм *B. abortus* 75/79-AB приживается в организме маралов в течение 55 дней. При совместном содержании иммунизированных маралух с неиммунизированными явление миграции не установлено.

### **3.3. Изучение иммуногенных свойств вакцины из штамма *Brucella abortus* 75/79-AB, определение оптимальной иммунизирующей дозы**

Изучение иммуногенных свойств вакцины из штамма *B. abortus* 75/79-AB проводили в ОПХ «Новоталицкое» Чарышского района на 15 телятах 6-месячного возраста. При этом была поставлена задача определить оптимальную иммунизирующую дозу.

Животных первой группы в количестве 5 голов привили вакциной из штамма 75/79-AB в дозе 50 млрд м.к., второй группы (5 голов) - в дозе 100 млрд м.к. Группа из 5 интактных тёлочек была контролем. Животных опытных и контрольной групп содержали совместно на протяжении всего опыта.

Спустя 6 месяцев после иммунизации всех саюшек заразили культурой вирулентного штамма *B. abortus* 544 в дозе 15 млн м.к. бруцелл.

Динамику появления и угасания серологических реакций изучали, исследуя сыворотку крови в РА и РСК с единым бруцеллёзным биофабричным S- и R(ovis)-антигеном, через 15, 33, 55, 89, 122 и 143 дня после иммунизации, а также перед заражением и через 16, 22, 28, 35 и 41 день после него.

Результаты исследования показали, что иммунологические реакции в РА и РСК с S-антигеном у телят всех групп в указанные сроки до искусственного инфицирования отсутствовали. Отмечена положительная РСК с R-антигеном через 15 дней после вакцинации у 9 животных из привитых 10 в титрах от 1:5 до 1:20, через 33 дня - у 2 животных в титрах 1:5 и 1:10.

В группе контрольных животных, реагирующих во все сроки исследования до инфицирования не выявлено.

Данные исследования сывороток крови после заражения свидетельствуют, что агглютинины у одной самочки первой опытной группы были обнаружены только через 22 и 28 дней в титре 1:25.

Во второй опытной группе саюшек наблюдали появление агглютининов на 22-й день у 3 животных в титре 1:25 с последующим нарастанием к 35-му дню. Комлементсвязывающие антитела в РСК с S-антигеном появились также на 22-й день и лишь у 1 животного, а спустя 35 дней - у 3. На 41-й день реагировали в РА 1, а в РСК с S-антигеном 2 тёлочки.

В группе контрольных животных агглютинины были выявлены на 16-й день у 2 телят из 5 в титрах 1:25 и 1:100, через 22 дня - у 3 в титрах 1:50 и 1:100, через 28 - у 4 телят в титрах от 1:25 до 1:100, а через 35 дней - у всех 5. Комлементсвязывающие антитела в РСК с S-антигеном появились на 22-й день у 1 животного в титре 1:10 с последующим нарастанием к 41-му дню. В день последнего исследования чисто реагирующих в РА и РСК с S-антигеном составило 4 саюшки.

В РСК с R(ovis)-антигеном реагирующих телят во всех группах в указанные сроки исследования не выявлено.

Исследования морфобиохимического состава крови годовалых саюшек показали, что возрастание эритроцитов у животных опытных групп (от 7,8 до  $11,2 \times 10^{12}$  л) связано с повышением температуры окружающей среды, а снижение и увеличение их числа в контрольной группе (8,1 - 6,1 -  $12,4 \times 10^{12}$  л) - с мобилизацией защитных сил организма на ликвидацию инфекционного агента.

Колебания белых кровяных телец у телят первой группы не имели чёткой динамики, а во второй группе совсем не изменялись. Лейкоциты у животных контрольной группы на протяжении всего опыта повышались (от 3,9 до  $5,6 \times 10^9$  л), лишь незначительно снижались в последний день исследования до  $4,8 \times 10^9$  л, что свидетельствует о развитии инфекционного процесса.

На данное обстоятельство указывало также снижение количества общего белка у животных контрольной группы (от 64,7 до 53,4 г/л). Содержание общего белка у саюшек опытных групп повышалось от 56,1 до 67,2 г/л.

У телят первой группы альбумины имели тенденцию к возрастанию (от 42,6 до 54,5%), а во второй группе - как к возрастанию, так и к снижению. В первом случае гамма-глобулины чаще снижались (от 26,4 до 21,0%), а во втором повышались (от 20,0 до 27,5%).

Количественные показатели альбуминов у животных контрольной группы как снижались, так и повышались, предопределяя противоположные значения в данные сроки, гамма-глобулинов.

Значения альфа- и бета-глобулинов у тёлочек трёх групп не имели чёткой динамики.

По истечении 41 дня телят трёх групп подвергли эутаназии с помощью миорелаксанта «Адилин-супер», который вводили внутримышечно, в среднюю треть шеи, в дозах 0,09; 0,135; 0,18; 0,27; 0,36 и 0,45 г сухого вещества соответственно в 1,0; 1,5; 2,0; 3,0; 4,0 и 5,0 мл 3,5%-ного раствора.

Наблюдения за клиническими критериями проявления фармакодинамики «Адилина-супер» показали, что животным, которым вводили препарат в дозах 0,18; 0,27, 0,36 и 0,45 г сухого вещества через 2-3 мин падали на живот, подгибая под себя конечности. Лишь на 1 телёнка миорелаксант действовал через 1 мин.

Повышение температуры тела выше границ физиологической нормы (38,0-39,0) у исследуемых животных не отмечали.

После наступления действия препарата у опытных маралов обвисали уши, голова опускалась на пол, нижняя челюсть отвисала, и из ротовой полости вытекала вязкая слюна, язык выпячивался, глаза были открыты, зрачки расширены. Дыхательные движения, болевой и глазной рефлексы, акт руменации, тактильная чувствительность отсутствовали. Также было отмечено выпячивание ануса и незначительное выделение мочи и каловых масс.

Следует отметить, что при наступлении комы сердечные сокращения с элементами аритмии не прекращались в интервале от 8 до 18 мин в зависимости от дозы препарата, общего состояния и веса телёнка. В дальнейшем наступала смерть животного, характеризующаяся необратимым прекращением деятельности всех физиологических функций организма.

Малые дозы препарата (0,09; 0,135 г) не вызвали падения животного и дальнейшей гибели. Они вызвали заторможенное состояние: животные стояли как в оцепенении некоторое время, без лишнего беспокойства, но при непосредственном приближении к ним вдруг делали несколько шагов и вновь останавливались. Дыхательные движения, болевой и глазной рефлекс, акт руменации были сохранены. Такое состояние продолжалось 20 мин (время наблюдения). Не добившись необходимого эффекта, телятам вводили ещё 2 мл раствора, после чего наступала гибель животного.

В результате эксперимента минимальной летальной дозой при эутаназии маралов можно считать дозу, равную 0,18 г сухого вещества в 2 мл 3,5%-ного раствора.

Видимых патологоанатомических изменений у телят опытных групп не отмечали. В группе контрольных животных были увеличены в 1,5-2 раза лимфатические узлы головы (подчелюстные, заглочные и околушные).

Высевы из каждой пробы проводили на 1 пробирку мясопептонного печёночного глюкозо-глицеринового бульона (МППГБ) и 2 пробирки агара (МППГА).

Посевы инкубировали в термостате в течение 30 суток при температуре 37-38°C. Первичный рост наблюдали на 7-е сутки. На агаре бруцеллы формировали мелкие, блестящие, выпуклые, с ровными краями и гладкой поверхностью просвечивающиеся колонии, имевшие в отражённом свете голубоватый оттенок.

В результате бактериологического исследования из органов телят первой группы бруцелл не выделено, во второй группе была изолирована одна культура патогенного штамма бруцелл.

В группе контрольных животных из биоматериала всех 5 телят были выделены культуры бруцелл референтного штамма 544 в количестве 14 из высеянных 98 объектов.

Таким образом, по результатам проведённых исследований оптимальной иммунизирующей дозой для маралов является 50 млрд м.к., так как создаёт стойкий иммунитет у подопытных животных при их искусственном заражении через 6 месяцев после иммунизации.

### **3.4. Изучение сравнительной иммунологической эффективности и антигенных свойств противобруцеллезных вакцин из штаммов *Brucella abortus* 82 и *Brucella abortus* 75/79-AB в опыте на маралах**

Изучение иммунологической эффективности противобруцеллезных вакцин из штаммов *B. abortus* 82 и 75/79-AB в опыте на маралах проводили в ОПХ «Новоталицкое» Чарышского района на 15 телятах 6-месячного возраста. При этом была поставлена задача изучить их антигенные свойства.

Животных первой группы в количестве 5 голов привили вакциной из штамма 82 в дозе 50 млрд м. к., второй группы (5 голов) - штаммом 75/79-AB в той же дозе. Группа из 5 интактных тёлочек была контролем. Животных опытных и контрольной групп содержали совместно на протяжении всего опыта.

Оценку реактогенных свойств штаммов 82 и 75/79-AB проводили ежедневно в течение 13 суток. При учёте реакции через 24 часа у телят обеих опытных групп на месте подкожного введения отмечали выраженную припухлость плотной консистенции, горячую и болезненную, размером 3 x 3 см. Разливной отёк при этом не развивался. Данное состояние места инъекции сохранялось в течение 8 суток. В последующем (с 9-го по 13-й день) отмечали снижение температуры и болезненности, а также размеров припухлости.

При наблюдении за общим состоянием телят снижения аппетита, угнетения не отмечали ни в первый, ни в последующие дни.

Спустя 6 месяцев после иммунизации всех телят заразили культурой вирулентного штамма *B. abortus* 544 в дозе 30 млн м.к. бруцелл.

Динамику появления и угасания серологических реакций у подопытных животных изучали, исследуя сыворотку крови на бруцеллез в РБП, РА, РСК с S- и R(*bovis, ovis*)-антигенами до вакцинации и через 5, 10, 13, 29, 62, 91, 125, 153 дня после нее, а также перед заражением и через 7, 14, 21, 28, 35, 42, 50 дней после него.

Результаты исследования показали, что агглютинины у 2 из первой и 1 саюшки из второй опытных групп выявлялись с 5-го дня в титре 1:25. Титры в РА у теленка первой группы сохранились вплоть до заражения. Во второй группе животных агглютинины начинали выпадать с 29-го дня, а к 62-му дню исследования они уже не выявлялись.

Реагирующие в РСК с S-антигеном начали выявляться во всех группах иммунизированных телят с 10-го дня исследования и сохранились в первой до 153-го дня, а во второй группе реакции угасли уже к 62-му дню.

Комплементсвязывающие антитела в РСК с R(bovis)-антигеном появились у всех телят опытных групп с 5-го дня исследования. Во второй группе саюшек реакции угасали на 153-й день, а в первой сохранились у 2 животных вплоть до заражения.

В РСК с R(ovis)-антигеном антитела имели тенденцию выявления также с 5-го дня: у 3 животных из второй и лишь у 1 самочки из первой групп. В РСК с R(ovis)-антигеном реакции у телят второй группы полностью исчезли к 125-му дню исследования, чего нельзя сказать о животных первой группы, имеющих серопозитивность в данном диагностическом тесте до 125-го дня.

У саюшек контрольной группы во все указанные сроки исследования реакции были отрицательные.

При исследовании проб сывороток крови до инфицирования была установлена положительная РА в титре 1:50 и РСК с R(bovis)-антигеном в титре 1:10 у одного, а также в РСК с R(ovis)-антигеном в титре 1:20 второго животного первой опытной группы. У телят маралов второй группы реакции отсутствовали.

При серологическом исследовании сывороток крови после заражения у саюшек первой группы агглютинины были обнаружены на 7-й день у 1 животного из 4 в титре 1:25, а выпадение реакций наблюдали на 42-й день. В РСК с R(bovis)-антигеном в данный период реагировала также 1 саюшка в титре 1:10, а к 50-му дню реагировали 3 самочки в титре от 1:5 до 1:10.

Во второй группе телят наблюдали появление агглютининов лишь на 21-й день у 1 самочки из 5 в титре 1:25. Комплементсвязывающие антитела в РСК с R(bovis)-антигеном появились на 14-й день у одного животного в титре 1:5 с последующим возрастанием как титра антител, так и животных (до 3 голов) к 28-му дню. На 50-й день реагировала в РСК с R(bovis)-антигеном 1 саюшка в титре 1:5.

Положительные реакции в РСК с R(ovis)-антигеном появились в опытных группах животных в титрах 1:5 и 1:10 на 21-й день (по одной саюшке в каждой группе) и сохранились до убоя в первой у 2, а во второй у 3 телят.

В РСК с S-антигеном в данных группах во все сроки реагирующие не выявлялись.

Среди контрольных животных агглютинины были выявлены на 14-й день после заражения у 2 телят в титре 1:50 и 1:100, через 21 день - у 4 в титрах от 1:25 до 1:100, а через 28 дней - у всех контрольных саюшек в титрах от 1:25 до 1:100 с последующим нарастанием титров к 50-му дню. Комплементсвязывающие антитела (РСК с S-антигеном) появились на 28-й день у 2 животных в титрах 1:5 и 1:10. К 50-му дню в данном тесте реагировали 4 телёнка в титрах 1:10 и 1:20. Животные серопозитивные в РСК с R(*bovis, ovis*)-антигенами во все сроки исследования не выявлены.

Данные исследований сывороток крови в РБП свидетельствуют, что реакции у саюшек опытных групп появились на 10-е сутки после иммунизации. Однако у телят второй группы они полностью угасли к 91-му дню, а у животных первой сохранились вплоть до заражения. После инфицирования серопозитивность в РБП у самочек первой опытной группы отсутствовала, а во второй опытной группе реакция сохранилась у 1 телёнка до убоя.

В группе контрольных саюшек реакции появились на 7-й день после заражения и сохранились до убоя.

Сопоставляя результаты РБП с результатами классических серологических тестов, можно отметить, что в большинстве случаев реакции в РБП совпадали с данными РА и РСК. Это является свидетельством специфичности данного теста при диагностике бруцеллёза маралов.

Исследования морфобиохимического состава крови годовалых саюшек показали, что возрастание эритроцитов у животных опытных групп (от 5,1 до  $12,0 \times 10^{12}$  л) связано с повышением температуры окружающей среды, а снижение и увеличение их числа в контрольной группе (6,0 - 10,9 - 6,2 -  $9,4 \times 10^{12}$  л) - с мобилизацией защитных сил организма на ликвидацию инфекционного агента.

Количество белых кровяных телец у телят первой группы возрастало, лишь снижаясь на 14-й и 42-й дни исследования (от  $3,8$  до  $1,9 \times 10^9$  л; от 6,0 до  $4,2 \times 10^9$  л). У животных второй группы количество лейкоцитов не имело чёткой динамики: их количество то возрастало, то убывало. Лейкоциты у животных контрольной группы на протяжении всего опыта повышались (от 2,7 до  $6,4 \times 10^9$  л), лишь незначительно снижаясь в последний срок исследования до  $6,0 \times 10^9$  л, что характерно для развития инфекционного процесса.

На данное обстоятельство указывало также снижение количества общего белка в контрольной группе (от 62,6 до 53,0 г/л). Количественные показатели общего белка у саюшек опытных групп имели волнообразные значения.

У телят первой группы альбумины имели тенденцию к убыванию (от 53,5 до 37,8%), а во второй группе чаще возрастали (от 34,2 до 45,9%, а также от 32,5 до 39,8%). В первом и во втором случаях гамма-глобулины имели противоположные альбуминам значения.

Альбумины у животных контрольной группы имели колебания своих значений как к снижению, так и к повышению. Показатели гамма-глобулинов чаще совпадали с кривой изменения альбуминов.

Значения альфа- и бета-глобулинов у тёлочек трёх групп не имели чёткой динамики.

По истечении 50 дней телят трёх групп подвергли эутаназии с помощью миорелаксанта «Адилин-супер». Препарат вводили внутримышечно, в дозе 0,18 г сухого вещества в 2 мл (3,5%) раствора.

Из видимых патологоанатомических изменений у телят контрольной группы отмечали увеличение в 1,5-2 раза лимфатических узлов головы, в отдельных случаях они были увеличены в 3-4 раза. Увеличение лимфатических узлов отмечено также у 1 животного первой (в 1,5-3 раза) и 1 второй опытных групп (в 1,5-2 раза).

Высевы из каждой пробы проводили на 1 пробирку мясопептонного печёночного глюкозо-глицеринового бульона (МППГТБ) и 2 пробирки агара (МППГГА).

Посевы инкубировали в термостате в течение 30 суток при температуре 37-38°C. Первичный рост наблюдали на 6-е сутки. На агаре бруцеллы имели вид мелких, блестящих, выпуклых, с ровными краями и гладкой поверхностью просвечивающихся колоний, имеющих в отражённом свете голубоватый оттенок.

У животных первой и второй опытных групп из биоматериала культур бруцелл не выделено, что обеспечило стойкий иммунитет у саюшек данных групп.

В результате бактериологического исследования из органов всех контрольных телят были изолированы культуры бруцелл референтного штамма 544 в количестве 10 из высеванных 83 объектов.

Вакцинный штамм *B. abortus* 82 более агглютиногенен, чем штамм *B. abortus* 75/79-AB, что подтверждается результатами серологических исследований.

### *3.4.1. Патоморфологические изменения при экспериментальном бруцеллёзе маралов*

Материалом для патоморфологического исследования на бруцеллёз послужили органы, взятые от 13 маралов (телята в возрасте 1 года), прошедших экспериментальное заражение культурой вирусного штамма *B. abortus* 544, в том числе от 9 саюшек из опытных и от 4 из контрольной групп.

Из видимых патологоанатомических изменений у животных контрольной группы отмечали увеличение лимфатических узлов в 1,5-4 раза (подчелюстных, заглоточных, предлопаточных и надвыменных). Паренхима лимфоузла сочная, граница коркового и мозгового слоя сглажена, при надавливании истекает опалесцирующая жидкость.

В группах опытных саюшек наблюдали увеличение лимфоузлов у 1 тёлочки первой (правого заглоточного в 3 раза и правого предлопаточного в 1,5-2 раза) и 1 тёлочки второй групп (подчелюстного в 1,5-2 раза). Это, видимо, связано с доброкачественным генерализованным процессом после иммунизации и возможными воспалительными заболеваниями (в одном из лимфоузлов, заглоточном, была обнаружена гнойнонекротическая масса).

В печени и селезёнке изменений макроструктуры органа не наблюдали.

При гистологическом исследовании у саюшек опытных и контрольной групп в лимфатических узлах выявлены: скопления белковой массы и незначительное количество гистиоцитарных и лимфоидных клеток, капсула и трабекула утолщены, образованы плотной соединительной тканью; лимфатические фолликулы увеличены, имеют округлую форму, внутри фолликула отмечается обилие клеточных элементов-лимфоцитов. Корковый и мозговой слои слабо различимы. При этом мякотные шнуры утолщены и инфильтрированы клеточными элементами.

В гистосрезе у животного № 31188 в мозговом веществе лимфоузла наблюдали инфильтрацию ретикулярной ткани многочисленными клеточными элементами, а также наличие единичных лимфоидных узелков (скопления лимфоцитов).

В гистологических препаратах печени у животных контрольной группы дольчатость слабо выражена, и дольки имели вид пяти-

угольника, между ними можно наблюдать узкие прослойки соединительной ткани. Просвет центральной вены расширен или сужен. В отдельных участках печени наблюдали дистрофические процессы, характеризующиеся разрушением печёночных долек, их балочной структуры (разрушение гепатоцитов и разрастание соединительной ткани между печёночными дольками).

В некоторых препаратах печёночные балки частично разрушались, сохранены лишь отдельные возле центральной вены, просвет которой расширен и заполнен эритроцитами.

Помимо двуядерных встречаются единичные одноядерные гепатоциты, в которых ядро оттеснено в сторону клеточной мембраны, что свидетельствует о дистрофических процессах, протекающих в паренхиме органа; отмечается расширение межбалочного синусоидального пространства.

## ВЫВОДЫ

1. Оздоровление маралоферм от бруцеллеза с применением противобруцеллёзной вакцины из штамма 82 вполне приемлемо, однако длительно сохраняющиеся серологические реакции существенно затрудняют диагностику болезни.

2. Слабоагглютиногенный вакцинный штамм *Brucella abortus* 75/79-AB, введённый в дозе 50 млрд м.к., в объёме 5 мл физраствора, в область средней трети шеи, подкожно, приживается в организме маралух 4-5-летнего возраста в течение 55 дней. По результатам серологического и бактериологического исследований явления миграции штамма не установлено.

3. При иммунизации маралат вакцинным штаммом *Brucella abortus* 75/79-AB в возрасте 6 месяце в дозах 50 и 100 млрд м.к. серологические реакции появляются независимо от дозы на 15-й день (РСК), выпадают на 33-й сутки. Защитный эффект при искусственном конъюнктивальном инфицировании животных референтным штаммом *Brucella abortus* 544 через 6 месяцев после вакцинации составил, соответственно, 100 и 80%. Иммунизирующей дозой для вакцинации маралов против бруцеллёза является 50 млрд м.к.

4. Из шести испытанных доз миорелаксанта «Адилин-супер» (0,09; 0,135; 0,18; 0,27, 0,36 и 0,45 г действующего вещества) доза, равная 0,18 г сухого вещества в 2 мл 3,5%-ного раствора, при внутримышечном введении обеспечила эутаназию подопытных животных.

5. Сравнительное изучение иммуногенных и антигенных свойств вакцин из штаммов *Brucella abortus* 82 и 75/79-AB показало, что при одинаковой иммунизирующей дозе 50 млрд м.к. получен равный защитный эффект при искусственном конъюнктивальном инфицировании животных через 6 месяцев после иммунизации. Поствакцинальные серологические реакции у животных, привитых штаммом 82, сохраняются в РА и РСК с R(bovis)-антигеном вплоть до заражения (в течение 6 месяцев), а у вакцинированных штаммом 75/79-AB - в течение 4 месяцев и только в РСК с R(bovis)-антигеном.

6. У контрольных маралов после искусственного заражения в крови повышается в 1,5-2 раза уровень содержания лейкоцитов на протяжении всего срока исследования, чаще понижается количество общего белка и альбуминов. Соответственно, у вакцинированных лейкоциты не имеют чёткой динамики: их количество то возрастает, то убывает, содержание общего белка и альбуминов также неоднозначно, но чаще повышается. При понижении или повышении альбуминов у животных всех групп гамма-глобулиновая фракция чаще имеет противоположные значения.

7. Спустя 50 дней после искусственного заражения контрольных саюшек наблюдали увеличение в 1,5-4 раза лимфоузлов (подчелюстных, заглоточных, предлопаточных и надвыменных). Видимых изменений паренхиматозных органов (печень, селезёнка) не обнаружено. При гистологическом исследовании в лимфатических узлах выявлены изменения, свойственные серозному лимфадениту.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ**

1. При диагностике и ликвидации бруцеллёза маралов следует руководствоваться методическими рекомендациями «Диагностика, профилактика и меры борьбы с бруцеллёзом маралов», утверждёнными учёным советом ГНУ ВНИИПО СО РАСХН (протокол № 1 от 11 февраля 2005) и научно-техническим советом управления ветеринарии администрации Алтайского края (протокол № 2 от 18 марта 2005 г.).

2. В «Наставление по применению вакцины живой сухой из штамма *Brucella abortus* 75/79-AB при бруцеллёзе крупного рогатого скота», утверждённое Департаментом ветеринарии Минсельхоза России (2003 г.) в п. 3.1.4 внести дополнения дозы для маралов

50 млрд м.к. Выделить отдельный пункт по иммунизации маралов согласно данным, изложенным в рекомендациях.

3. При серологической диагностике маралов на бруцеллёз наряду с РА и РСК рекомендуем применять РБП.

4. При проведении экспериментальных исследований на маралах с последующим их убоем и утилизацией применять миорелаксант «Адилин-супер» в дозе 0,18 г сухого вещества в 2 мл 3,5%-ного раствора при внутримышечном введении.

## **СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Солнцева Е.Н., Разумовская В.В., Тяпин В.В. Испытание нового диагностического теста РИГА (реакция непрямой гемагглютинации) в комплексе противобруцеллёзных мероприятий крупного рогатого скота в Алтайском крае // Ветеринария Сибири. - 2003. - №9-10. - С. 68-70.

2. Тяпин В.В. Противозооотическая эффективность вакцины из штамма *Brucella abortus 82* при бруцеллезе маралов // Новейшие направления развития аграрной науки в работах молодых ученых: Сб. тр. междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых СО РАСХН. - Новосибирск, 2004. - С. 225-228

3. Тяпин В.В. Применение миорелаксанта при эутаназии маралов // Достижения и перспективы студенческой науки в АПК: Сб. тр. межрегион. науч. студенч. конф., посвящ. 60-летию Алтайского государственного аграрного университета. - Барнаул, 2004. - Ч. 2. - С. 89-90.

4. Тяпин В.В., Солнцева Е.Н., Луницын В.Г. Изучение приживаемости и возможности миграции противобруцеллёзной вакцины из штамма *B. abortus 75/79-AB* в опыте на маралах // Вопросы пантового оленеводства и болезней сельскохозяйственных животных: Матер. первой науч.-практ. конф. молодых учёных. - Барнаул, 2004. - С. 90-91.

5. Тяпин В.В., Солнцева Е.Н., Луницын В.Г. Изучение антигенных и иммуногенных свойств вакцины из штамма *B. abortus 75/79-AB* в эксперименте на маралах // Вопросы пантового оленеводства и болезней сельскохозяйственных животных: Матер. первой науч.-практ. конф. молодых учёных. - Барнаул, 2004. - С. 92-95.

6. Луницын В.Г., Тяпин В.В. Испытание противобруцеллёзной вакцины на маралах // Развитие международного сотрудничества в области изучения инфекционных заболеваний. - Новосибирск, 2004. - С. 282.

7. Луницын В.Г., Тяпин В.В. Диагностика, профилактика и меры борьбы с бруцеллёзом маралов: Методические рекомендации РАСХН, Сиб. отд-ние, ГНУ ВНИИПО. - Барнаул, 2005. - 19 с.

ЛР № 020648 от 16 декабря 1997 г.

Подписано в печать 30.03.2005 г. Формат 60x84/16. Бумага для множитель-  
ных аппаратов. Печать ризографная. Гарнитура «Times New Roman». Усл.  
печ. л. 1,0. Уч.-изд. л. 0,8. Тираж 100 экз. Заказ № 4

Издательство АГАУ  
656099, г. Барнаул, пр. Красноармейский, 98  
62-84-26

22 АПР 2005



300