ПОЛУЧЕНИЕ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЭМФИЗЕМАТОЗНОГО КАРБУНКУЛА ЖВАЧНЫХ ИЗ МЕСТНОГО ШТАММА И ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЕЕ ИММУНОГЕННОСТИ

С.Л. ГРИГОРЯН, М.А. ОГАНЕСЯН, А.А. ВАРДАНИЯ

Армянская сельскохозяйственная академия, кафедра эпизоотологии и паразитологии,
375009, Ереван

Проведен сравнительный анализ иммуногенности российской вакцины и вакцины местного штамма *Clostridium chauvoei*, в процессе приготовления которой в качестве адьюванта использован 3%-ный гель бентонита, испытанный на морских свинках. Вакцина из местного штамма оказалась более иммуногенной, чем российская. У морских свинок, вакцинированных данной вакциной, сформировался напряженный иммунитет. Эффективность предложенной нами вакцины была в два раза выше, чем российской, и поствакцинальный иммунный фон был более ярким.

Ճովախոզուկների վրա կատարվել է ռուսական արտադրության և *Clostridium chauvoei* տեղական շտամից պատրաստված պատվաստանյութերի ինունաօին հատկությունների համեմատական անալիզ: Տեղականում որպես ադյուվանտ օգտագործվել է 3% բենտոնիտի հել: Պարզվել է, որ տեղական տարատեսակից պատրաստված վակցինան ավելի ինունաօին է: Տվյալ վակցինայով վակցինացված ծովախոզուկների մոտ ձևավորվել է լարված ինունիտետ: Մեր վակցինայի արդյունավետությունը 2 անգամ ավել էր ռուսականից և հետպատվաստային ինունիտետը ևս գերազանցում է ներկրվող վակցինայի արդյունքներին:

The comparative analysis of immunogenity between Russian vaccine, Guinea pigs blackleg and vaccine locally separated from *Clostridium chauvoei* were performed. 3% bentonit suspension was used as adjuvant. The local vaccine was more immunogenic that Russian one. Guinea pigs vaccinated by local vaccine have shown earlier immune response and course was more intensive. Effectiveness of our vaccine was two times higher than Russian one and the residual immunity was higher.

Clostridium chauvoei - штамм - вакцина - корпускулярный гемоантиген -
сенсibilизированный лимфоцит - иммунная розетка

Для профилактики эмфизематозного карбункула жвачных (эмкар) до 1929г. применяли формолвакцину, а с 1960г. ее заменила концентрированная гидроокись алюминиевая (ГОА) формолвакцина [4]. Профилактика этой инфекции, возбудителем которой является спорообразующий анаэробный микроб, относящийся к роду клостридий, в Армении предусмотрена в плане противозoonотических мероприятий и финансируется государством. Для вакцинации восприимчивого поголовья используется ГОА формолвакцина, импортируемая из России. Однако нередко случаи падежа среди вакцинированного поголовья, а в течение пастбищного периода крупный рогатый скот прививается 3-4 раза, что обусловлено нерегулярной доставкой вакцины, с низкой эффективностью ее применения и большими затратами. Чаше наблюдаются вспышки инфекций в виде энзоотии, что причиняет огромный экономический ущерб животноводству, так как заболевшие животные, как правило, не выживают, а трупы павших от эмкара животных уничтожаются. Кроме того, результаты проверки активности ГОА вакцины

российского производства к местному штамму возбудителя были неудовлетворительны. Это объясняется антигенной специфичностью штаммов возбудителя эмкара [6, 7]. Еще в 1929 на 11-ом Международном конгрессе Риньяр предложил применение аутовакцины, полученной из местного штамма *Clastridium chauvoei* [8].

Учитывая это обстоятельство, была поставлена задача получить инактивированную вакцину из местного штамма *Cl. chauvoei* и изучить в сравнительном аспекте ее иммуногенную активность в организме привитых животных.

Материал и методика. Местный H_{98} штамм возбудителя эмкара выделен на кафедре эпизоотологии из патологического материала пораженных мышцы 3-летнего крупного рогатого скота, павшего от эмкара [1]. Для определения вирулентности выделенного местного штамма разными дозами цельной и разведенной в 1:5-1:20 физиологическом р-ре 24-часовой бульонной культуры внутримышечно заражали морских свинок, живой массой 400-450г. 50%-ную смертельную дозу $5LD_{50}$ местного штамма *Cl. chauvoei* для морских свинок определяли по методу Рида и Менча [5]. В процессе изготовления вакцины на основе местного штамма H_{98} по инструкции ГНКВП [2] были внесены некоторые изменения. В качестве матрасной культуры использовали проведенную через организм морской свинки и подвергнутую последующим высевам 24-часовую бульонную культуру штамма H_{98} , в объеме 1-2% от общего объема питательной среды. Для получения вакцинной микробной массы использовали питательную среду Китта-Тароци с 0,5%-ным содержанием глюкозы. Посевы выращивали в термостате при 37° в течение 20 ч, чтобы, по возможности, избежать спорообразования, так как для инаktivации спор возбудителя требуется более высокое содержание формальдегида, что в свою очередь снижает иммуногенные свойства вакцины. После выращивания и освобождения полученной культуры от кусочков печени инаktivацию 20-часовой микробной культуры проводили добавлением 0,5 % по объему, разбавленного в 1:1 физиологическом растворе формалина, с содержанием формальдегида не менее 36 %. Для полного инаktivирования микробной массы смесь выдерживали в термостате 3 дня, регулярно перемешивая. После проверки на стерильность инаktivированную культуру микроскопически исследовали. К формализированной микробной культуре в качестве адьюванта взамен гидроокиси алюминия добавляли 3 %-ный гель бентонита, в объеме 15 %. После перемешивания смесь оставляли при комнатной температуре 3-4 дня до полного просветления. 2/3 надосадочной жидкости удаляли и добавляли к оставшейся смеси стерильного агар-агара в объеме 0,1 %. С помощью ИН раствора едкого натрия рН вакцины доводили до 7,4 и в стерильных условиях разливали во флаконы. Проверку готовой вакцины на стерильность, безвредность и иммуногенность осуществляли согласно инструкции [7]. Для сравнительной оценки иммуногенности бентонитовой и импортной ГОА (производства Ставропольской биофабрики) вакцин против эмкара в одинаковые сроки прививали 2 группы интактных морских свинок по 45 голов, подкожно в дозе 0,4 мл. До вакцинации определяли плотность (количество микробных клеток в 1 мл) бентонитовой и ГОА вакцин по мутности оптического стандарта (1 млрд/мл). Реактогенность оценивали 5-дневной термометрией, в течение которой привитые животные оставались под наблюдением. В организме вакцинированных бентонитовой и ГОА вакцинами морских свинок иммунобиологические перестройки изучали на клеточном уровне модифицированным методом иммунных розеток [3]. Сущность метода - лимфоциты иммунизированного бараньими эритроцитами организма *in vitro* связывают эритроциты барана, образуя иммунные розетки (за иммунную розетку принимают лимфоцит с 3 и более адсорбированными эритроцитами). Специфическая адгезия эритроцитов обусловлена наличием у лимфоцитов соответственных антигенных рецепторов. В наших опытах в качестве антигена для *in vitro* реагирования использован корпускулярный гемоантиген (адсорбированный на эритроцитах барана местный штамм *Cl. chauvoei*). Для получения корпускулярного гемоантигена испытывали инаktivированные и живые 18-часовые бульонные культуральные центрифугаты местного штамма *Cl. chauvoei* при взаимодействии с эритроцитами барана в соотношениях 5/1, 10/1 и 20/1.

Иммунокомпетентные клетки получены из селезенки иммунизированных морских свинок с помощью стеклянного гомогенизатора, который обеспечивает около 85% выхода

жизнеспособных клеток. В полученной суспензии селезенки определяли абсолютное количество спленоцитов в камере Горяева, а относительное количество лимфоцитов - в мазках, приготовленных из суспензий селезенки. Полученная лимфоцитная смесь при взаимодействии с корпускулярным гемоантигеном (инкубация при 37° 30 мин, потом при 4° 18ч, фиксация образующихся иммунных розеток 2.5%-ным раствором глутаральдегида в конечной концентрации 0.6 % и отмывка) образует иммунные розетки, относительное количество которых определяли в приготовленных мазках, окрашенных по Романовскому. Абсолютное количество розеток выявляли, умножая абсолютное количество лимфоцитов на относительное количество розеток. Образующиеся иммунные розетки определяли по количеству связанного гемоантигена (с 3, 4, 5 и более прикрепившимися гемоантигенами).

Для изучения иммунитета привитые местной бентонитовой и импортной ГОА вакцинами морские свинки были забиты цервикальной дислокацией по 3 головы на 5, 12, 19, 30, 60, 90, 120, 150, 180 и 210-е дни после иммунизации.

Одновременно напряженность иммунитета и иммуногенную активность вакцины определяли: на 15, 110 и 170-е дни после вакцинации двумя вакцинами морские свинки по 5 голов с 5-и контрольных, непривитых животных одновременно были заражены 5-кратной 50%-ной смертельной дозой местного штамма *Cl. chauvoei* (0,5 мл 24-часовой бульонной культурой в разведении 1/27).

Результаты и обсуждения. Учитывая высокую резистентность возбудителя эмкара при ее выделении, взятый патологический материал высушивали в термостате при 37° 25 дней для уничтожения вегетативных форм посторонней микрофлоры. Перед посевами пробы обрабатывали 5%-ным раствором карболовой кислоты или этиловым спиртом на пламени спиртовки. Для получения чистой культуры *Cl. chauvoei* использовали МППБ или среду Китта-Тароцци. При определении вирулентности выделенного H_{98} штамма *Cl. chauvoei* выяснили, что внутримышечно зараженные 24-часовой бульонной культурой морские свинки пали в течение 16-24 ч. Результатами титрации местного штамма возбудителя установлено, что LD_{50} для морских свинок при внутримышечном заражении является 0,5 мл 24-часовая бульонная культура, в разведении 1/135.

При изготовлении вакцины в полученной 20-часовой культуре отсутствуют споровые формы возбудителя, благодаря чему для полноценной инактивации вегетативных форм требуется более низкое содержание формальдегида. Использование бентонита в качестве адьюванта имеет ряд преимуществ. Как местное, доступное минеральное сырье бентонит имеет слабощелочной рН, обладает гидрофильностью, коллоидными и выраженными адсорбирующими свойствами. Гидроокись алюминия - амфотерное соединение и может изменить рН вакцины, не влияя на связывание остаточного формальдегида. Бентонит не обладает амфотерными свойствами и не может изменить установленный рН вакцины, способен адсорбировать некоторое количество формальдегида, что обеспечивает длительное сохранение иммуногенных свойств вакцины.

При проверке на стерильность выяснилось, что посевам на МПБ, МПА и МППБ из бентонитовой вакцины оставались стерильными в течение 15 дней. Определение безвредности вакцины показало, что привитые подкожным методом в дозе по 2 мл 4 морские свинки остались живыми без поствакцинальных осложнений. Для определения иммуногенности вакцины привитые 5 морских свинок вместе с 5-ю контрольными непривитыми животными через 18 дней после вакцинации были заражены смертельной дозой 24-часовой культуры *Cl. chauvoei*. Привитые животные остались живыми, а

контрольные пали в течение 12-20ч.

Проверка реактогенности двух вакцин показала, что при использовании бентонитовой вакцины у привитых животных местная реакция в местах инъекций и термическая реакция более выражены и длительны, что указывает на выраженную иммуногенную активность этой вакцины. Нужно отметить, что у животных, привитых той и другой вакциной, поствакцинальные осложнения не наблюдались.

Определение плотности двух вакцин по оптическому стандарту выявило существенные различия: в 1 мл бентонитовой вакцины содержится 16 млрд микробных клеток, а в ГОА вакцине — 12 млрд/мл, не считая плотности надосадочной прозрачной жидкости, которая в обоих случаях равнялась 3 млрд/мл. То есть, в организм привитых одинаковой 0,4 мл дозой морских свинок при использовании бентонитовой вакцины вводится 6,4 млрд микробных клеток, а при ГОА вакцине — 4,8 млрд. Микроскопическое исследование двух вакцин выявило, что в бентонитовой вакцине возбудители в виде прямых, толстых, коротких или длинных палочек, а в ГОА вакцине они длинные, тонкие и изогнутые. Важно отметить, что в первом случае споры не обнаруживались, во втором случае спорообразование достигало 20%.

Для получения корпускулярного гемоантигена была выбрана 18-часовая, убитая формалином микробная культура местного штамма, где споровые формы возбудителя отсутствовали (у спор способность к адсорбированию менее выражена, а живая культура вызывает гемолиз эритроцитов). При получении гемоантигена наилучшие результаты достигнуты после инкубации антигена местного штамма с эритроцитами барана в соотношении 10:1. Микроскопическое исследование мазков из гемоантигена выявило, что при инкубации 10:1 адсорбируются в среднем 2-3 палочки *Cl. chauvoei*, при инкубации 5:1 получают излишки эритроцитов, которые мешают дальнейшим работам (спонтанное накопление эритроцитов, которое можно спутать с иммунными розетками), а при соотношении 20:1 остается в несвязанном виде очень большое количество антигена *Cl. chauvoei*, накопление которого затрудняет выявление иммунных розеток. В иммунном розеткообразовании участвуют Т, В- лимфоциты и плазматические клетки. Последние две клетки, отвечающие за гуморальный иммунитет, а также синтезирующие специфические иммуноглобулины, *in vitro* механически реагируют с антигеном, образуя иммунные розетки. У Т-лимфоцитов, особенно супрессоров и хелперов, поверхностные специфические рецепторы к антигену появляются после непосредственного контакта, обеспечивая в дальнейшем иммунологическую память и возможность иммунорозеткообразования. Это явление строго специфично, сенсibilизированные к данному антигену иммунокомпетентные лимфоциты, обладающие соответственными поверхностными рецепторами, узнают антиген и в результате, по принципу ключ-замок, образуются специфические розетки. Необходимо отметить, что в физиологическом аспекте лимфоциты морских свинок не обладают рецепторами против бараньих эритроцитов, что наблюдается у лимфоцитов людей и белых мышей. Следовательно, в этом случае спонтанное розетообразование между лимфоцитами морской свинки и эритроцитами барана невозможно. По тому же принципу у непривитых контрольных свинок иммунные розетки не образуются, так как в организме

животных лимфоциты не сенсibilизированы к антигену *Cl. chauvoei*, а спонтанное розеткообразование в этом случае исключено.

Результаты изучения формирования, напряженности и длительности иммунитета с помощью розеткообразования представлены в табл. 1.

Из табл. 1 видно, что в процессе изучения иммунитета розеткообразование в группе, привитой бентонитовой вакциной, в абсолютном и относительном количествах превышает показатели при применении ГОА вакцины российского производства. Результаты розеткообразования на 5-й день изучения показали, что при использовании бентонитовой вакцины у животных полноценный иммунный ответ формируется в течение первых пяти дней, в эти сроки начинается и синтез специфических антител (13% розеткообразования, с 2 % долей иммунных розеток, с 5 и более корпускулярным гемоантигеном). Последующие сроки исследования иммунитета выявили у привитых двумя вакцинами групп напряженный гуморальный иммунитет, длительность которого при использовании бентонитовой вакцины превышает 6 месяцев (на 180-й день 42% розеткообразования, где доля иммунных розеток, содержащих более 3 гемоантигенов, составляет 25 %). У привитых ГОА вакциной морских свинок иммунитет к 6-му месяцу после вакцинации практически отсутствует (на 180-й день - всего 26% розеткообразования с 12%-ной долей розеток, с более 3 гемоантигенов). Через 6 месяцев после вакцинации у животных, привитых местной бентонитовой вакциной, формируется более стойкий выраженный поствакцинальный иммунный фон (29% розеткообразования).

Результаты проверки напряженности иммунитета и эффективности использования двух вакцин с помощью контрольного заражения представлены в табл. 2.

Контрольное заражение на 15-й день после вакцинации выявило 100%-ную эффективность в I группе, привитой бентонитовой вакциной (зараженные животные не заболели), тогда как во II группе, привитой ГОА вакциной, эффективность составила 80% (из 5-ти привитых свинок одна пала через 30 ч, со специфическими эмкару клиническими и патоморфологическими изменениями, из трупа была выделена чистая культура *Cl. chauvoei*). Заражение на 110-й день после вакцинации показало в 2-х привитых группах 100%-ную эффективность, однако в привитой ГОА вакциной группе заболевшие 2 свинки выздоровели. Контрольное заражение на 170-й день выявило 40%-ную эффективность в группе, привитой бентонитовой вакциной, а в привитой ГОА вакциной группе - 20%-ную. Если в I группе выжили 3 свинки, из которых одна не заболела, а у другой угнетение длилось 3 дня, то в II группе одна выжившая тяжело заболела.

Все зараженные контрольные, непривитые морские свинки погибли в течение 12-24 часов. Лабораторные исследования и патоморфологические изменения подтвердили причину гибели свинок от эмкара.

Таким образом, из полученных результатов можно заключить: полученный местный штамм возбудителя эмкара обладает высокой вирулентностью, бентонитовая вакцина, приготовленная на основе местного штамма, иммуногенной активностью превышает ГОА вакцину российского производства; использование бентонита в качестве адьюванта не только безвредно и экономически выгодно, но и не снижает иммуногенные свойства вакцины.

P<0,05

Таблица 1. Динамика розеткообразования в течение иммунофронтирования вакцинированных животных

M±m

Дни исследования иммуни- тета	Количество иммунных розеток по количеству соединившегося гемоантигена в группе морских свинок, привитых бентонитовой вакциной								Количество иммунных розеток по количеству соединившегося гемоантигена в группе морских свинок, привитых ГОА вакциной							
	абсолютное, млн				относительное, %				абсолютное, млн				относительное, %			
	С 3 гемо- анти- генами	С 4 гемо- анти- генами	С 5 и более гемо- анти- генами	Всего	С 3 гемо- анти- генами	С 4 гемо- анти- генами	С 5 и более гемо- анти- генами	Всего	С 3 гемо- анти- генами	С 4 гемо- анти- генами	С 5 и более гемо- анти- генами	Всего	С 3 гемо- анти- генами	С 4 гемо- анти- генами	С 5 и более гемо- анти- генами	Всего
5	18,11±3,58	7,85±1,89	2,23±0,9	28,19±5,99	8,3±1,51	3,7±0,95	1,0±0,41	13,0±1,92	12,57±1,53	4,1±1,52	0,65±1,69	17,32±4,27	6,0±1,00	2,0±0,71	-	8,0±1,69
12	63,14±8,89	41,76±7,65	29,84±2,7	134,74±3,31	21±2,65	14±2,65	10,0±1,15	45,0±1,18	43,86±4,34	31,58±8,58	18,56±0,55	94,0±12,06	15,0±1,73	10,33±1,76	6,67±1,5	32,0±4,04
19	92,46±9,16	55,82±3,05	70,59±8,87	264,59±18,6	31±1,73	34,3±1,76	23,7±2,4	89,0±3,79	87,54±5,89	90,09±4,48	49,83±10,11	227,45±12,1	22,0±1,53	26,0±2,08	30,0±3,21	78,0±2,49
30	78,89±2,03	92,82±3,54	87,29±3,46	259±7,91	28,7±1,2	33,7±0,96	28,3±2,54	94,0±2,52	72,87±1,42	77,65±12,32	72,35±4,84	222,87±8,52	25,0±2,65	27,33±3,48	32,67±2,33	85,0±4,04
60	67,39±2,42	89,98±5,06	76,13±3,2	233,49±9,2	26,3±1,93	35±1,53	29,7±1,5	91,0±4,36	72,51±10,23	74,74±2,59	57,64±4,6	204,89±10,3	28,0±2,08	26,33±1,31	28,67±3,2	83,0±3,51
90	58,55±1	78,5±5,54	53,09±5,6	190,14±4,47	25,3±1,76	33,7±0,96	23,0±3,01	82,0±2,61	60,06±3,41	66,71±4,07	44,64±4,61	171,41±1,39	24,67±1,26	29,0±2,63	24,33±2,85	76,0±1,92
120	63,35±5,57	50,64±4,53	54,03±8,92	168,02±12,23	28,3±2,4	22,7±2,06	24,0±3,61	75,0±4,04	46,46±3,91	44,29±11,23	45,63±8,75	136,39±4,51	22,0±1,15	21,67±1,63	19,33±1,50	65,0±3,51
150	44,47±5,09	34,94±2,6	35,24±2,33	114,65±6,22	21,7±4,78	17,0±0,58	17,3±2,08	58,0±2,65	35,45±3,68	34,09±6,75	24,35±1,99	93,87±12,22	18,33±1,58	17,0±0,58	12,67±1,49	48,0±3,79
180	28,32±5,22	27,66±3,42	8,64±1,87	64,62±7,84	18,3±2,91	18,0±1,53	5,7±0,84	42±3,61	24,71±2,07	14,19±1,85	5,83±1,3	44,7±2,97	14,67±2,4	8,33±0,96	4,0±0,65	26,0±2,41
210	24,61±3,84	17,23±0,09	3,31±1,33	45,16±4,51	19,3±1,2	14,0±1,52	2,7±1,2	29,0±2,12	16,32±2,11	12,23±1,7	1,16±0,43	29,71±2,57	10,67±1,86	6,33±0,96	1,0±0,17	18,0±2,26

Примечание: при исследовании иммунитета каждый раз проверены по 3 головы морских свинок из двух групп, привитых бентонитовой и ГОА вакцинами.

Таблица 2. Результаты контрольного заражения.

Группы	Доза заражения SDL ₅₀ , мл	Дни заражения после прививки								
		15			110			170		
		Заражено	Пало	Эффективность, %	Заражено	Пало	Эффективность, %	Заражено	Пало	Эффективность, %
I. Привитая бентонитовой вакциной	0,5	5	0	100	5	0	100	5	3	40
II. Привитая ГОА вакциной	0,5	5	1	80	5	0	100	5	4	20
Контроль, непривитая	0,5	5	5	0	5	5	0	5	5	0

Получение корпускулярного гемоантигена и использование его в методе иммунных розеток дает возможность применять этот метод при других инфекциях, а также исследовать напряженность и длительность иммунитета, выявить в иммунизированном организме даже малейшие иммунобиологические перестройки.

Метод иммунных розеток как дополнительный диагностический тест можно использовать для обнаружения и дифференцирования в качестве антигена не только *Cl. chauvoei*, но и других возбудителей инфекционных заболеваний.

Основываясь на результатах исследований, предлагаем в условиях Армении в качестве активного профилактического препарата массовое применение приготовленной на основе местного штамма *Cl. chauvoei* бентонитовой вакцины против эмкара жвачных животных.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Գրիգորյան Ս.Լ., Գոլիանցիսյան Ս.Դ.* Ազրոզիտոբյուց, 6, 277-280, 2002:
2. Биологические и химиотерапевтические ветеринарные препараты. (под ред. С.Г. Колесова, Н.В. Лихачева), М., изд. сельхозлит., журн. плакатов, 195-203, 1963.
3. Иммунологические методы (под ред. Г. Фримелья), М., Медицина, 234-239, 1987.
4. *Каган Ф.И., Колесова А.И.* Усовершенствование формолвакцины против эмкара методом концентрации, Тр. ГНКИ, 7, 224-228, 1957.
5. Руководство по общей вирусологии (под ред. проф. Сюрина) изд., Колос, 124-127, 1966.
6. *Award F.I., Gadalla M., Farrag I.* Studies on the antilogy of Blackquarter in Egyptian cattle Egypt. Journ. of Veter. Sc. N 10, 45-51, 1973.
7. Rinjard Эфмизематозный карбункул, Recueil Med. Veter publ. TC7, N3, 76-79, 1931.
8. *Swrczek T.W.* Blachleg in cattle Univ. of Kentucky press. 176-179, 1992.

Поступила 10.X.2002