А. С. КАЗАРЯН

ПРЕВЕНТИВНЫЕ СВОЙСТВА СЫВОРОТОК КРОВИ КРОЛИКОВ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ ТРЕМЯ ВАКЦИНАМИ РАЗДЕЛЬНО, КОМПЛЕКСНО И АССОЦИИРОВАННО

Работа посвящена выяснению эффективности одновременной иммунизации кроликов вакцинами против бруцеллеза и лептоспироза; бруцеллеза и пастереллеза; лептоспироза и пастереллеза; бруцеллеза, лептоспироза и пастереллеза. Приводятся данные по исследованию защитных способностей крови кроликов, иммунизированных раздельно, комплексно и ассоциированно в отношении лептоспирозных и бруцеллезного антигенов.

В наших предыдущих опытах [3, 9, 10, 11, 12] при одновременном применении трех указанных вакцин была установлена совместимость, а также отсутствие суммации реактогенных и сенсибилизирующих свойств этих антигенов. Изучение превентивных свойств сывороток крови на 240 белых мышях в отношении пастереллезного антигена показало, что сыворотки, полученные от комплексно и ассоциированно иммунизированных кроликов, защитили от гибели зараженных мышей в 77,5—80,0% случаев, тогда как сохраняемость белых мышей, получивших иммунные сыворотки от раздельно иммунизированных одной пастереллезной вакциной, оказалась несколько ниже—75,5%. Из мышей, получавших сыворотки от интактных кроликов, выживало всего 25,0% при 100% гибели белых мышей, не получивших сыворотки.

Проведенное в настоящей работе изучение защитных свойств сывороток крови у одновременно иммунизированных кроликов в отношении лептоспирозных антигенов проводилось на 45-й день после вакцинации против лептоспироза, бруцеллеза и пастереллеза в разных вариантах сочетания.

Серотерапию при лептоспирозных заболеваниях людей впервые при инфекционной желтухе, болезни Васильева-Вейла применили в Японии [18]. При этом установлено, что сыворотка реконвалесцентов обладает защитным действием. Впоследствии А. А. Варфоломеевой [4] антилептоспирозная сыворотка против болезни Васильева-Вейла была получена путем иммунизации животных взвесью органов морской свинки, зараженной культурами лептоспир. Полученные сыворотки обладали терапевтической активностью. Многие авторы [4, 6, 8, 14, 17] считают, что гуморальные показатели иммунитета—агглютинины, лизины и превентивные свойства сывороток крови тесно связаны с высокими показателями реакции РЭС (ретикулоэндотелиальной системы)

и, в частности, с наивысшим содержанием клеток плазмоцитарного ряда—продуцентами антител в лимфатических узлах и селезенке.

В качестве тест-объекта по изучению превентивных свойств сывороток крови мы использовали крольчат и морских свинок, высокая восприимчивость которых к лептоспирозам доказана многими исследователями [1, 13, 14].

Изучая иммунобиологическую перестройку организма к лептоспирозной поливалентной вакцине, состоящей из 5 серотипов, при ее раздельном, комплексном и ассоциированном применении с бруцеллезной и пастереллезной вакцинами, мы полученной сывороткой пассивно иммунизировали лабораторных животных, затем заражали культурой лептоспир не отдельными серотипами, а смесью пяти серотипов с целью выяснения иммунобиологической активности сывороток крови по всем пяти серотипам. Как при изучении серологических показателей по РМАЛ, так и при контрольном заражении лабораторных животных в качестве антигена применяли живые вирулентные *leptospir* из пяти серотипов.

Для определения защитных свойств сывороток крови в отношении лептоспирозных антигенов под опытом имелось пять групп иммунизированных кроликов по 12 в каждой. I группа была иммунизирована раздельно против лептоспироза, II—комплексно против лептоспироза и бруцеллеза, III—лептоспироза и пастереллеза, IV—лептоспироза, бруцеллеза и пастереллеза (также комплексно), V—против трех инфекций ассоциированно.

С целью определения летальной дозы (D₅₀) лептоспир для крольчат смесь пяти серотипов вирулентной культуры в разных дозах вводили интубирующе 15—20-дневным крольчатам 5 групп (по три крольчонка в каждой).

Для титрации культуры *leptospir* применяли 8—10-дневный посев. Перед инъекцией культуры проверяли под микроскопом (темное поле) и применяли только те, в которых имелось не менее 150—200 особей в поле зрения микроскопа (10×10) подвижных, нормальных лептоспир с концевыми крючками, не имеющих деформированных, а также самоагглютинирующих (спонтанная агглютинация) особей в культуре.

Крольчата, которым вводили по 0,5 мл смеси культуры лептоспир, остались живыми. Из трех крольчат, зараженных по 1 мл, один пал на 75-ом часу заражения, а крольчата, получившие по 2 мл культуры, погибли в течение 44—50 часов с характерными клинико-анатомическими признаками остро протекающего лептоспироза.

При бактериологическом исследовании павших крольчат почти во всех случаях были выделены исходные культуры (из почек, мочи, а иногда и из печени, селезенки, крови и сердца). Посевы производили в жидкой среде Терских, а посев из крови—в бессывороточной среде, т. е. 0,5 мл крови в 7—8 мл просто кипяченой или фосфатно-буферной воде Зеренсека с рН 7,2—7,4. Большинство посевов дали рост лепто-

спир на 7—8-е сутки после инкубации в термостате при температуре 26—28°C.

Таким образом, при титрации смеси культур лептоспир из 5 серотипов (romona, icterohaemorrhagiae, grippotyphosa, canicola, tarassovi) выяснилось, что минимальная смертельная доза этой культуры для крольчат равна 1 мл ($D_{cl}=1$), а летальная доза—2 мл ($D_{cl}=2$). Мы применяли летальную дозу ($D_{cl}=2$), для чего у отдельно иммунизированных против лептоспироза (I гр.), комплексно против лептоспироза и бруцеллеза (II гр.), лептоспироза и пастереллеза (III гр.), лептоспироза, бруцеллеза и пастереллеза (IV гр.) и ассоциированно против лептоспироза, бруцеллеза и пастереллеза (V гр.) кроликов через 45 дней после повторной вакцинации брали кровь и выделенной сывороткой пассивно иммунизировали соответствующие группы 18—20-дневных крольчат. Сыворотка вводилась крольчатам по 1 мл подкожно. Перед введением сыворотка проверялась по РМАЛ, при этом средний агглютинационный титр у вакцинированных кроликов был в пределах 1:162—1:301 разведения сыворотки, тогда как сыворотки от интактных кроликов не вызывали агглютинации антигенов даже в разведении 1:10. В каждой группе имелось по 6 крольчат. Контролем служили две группы по 6 крольчат в каждой. Одна группа (VI) получала сыворотки от интактных кроликов, другая (VII) сывороток не получала (контроль культуры).

Заражение всех упомянутых групп крольчат проводили через 24 часа после введения сывороток. С этой целью использовали заранее протитрованную культуру лептоспир из пяти серотипов в вышеуказанной дозе.

О защитной эффективности иммунных сывороток судили по выживаемости крольчат и по данным клинико-бактериологических исследований.

Зараженные крольчата в течение 15 дней находились под наблюдением. При этом гибели крольчат, получивших иммунные сыворотки, не наблюдали. В то же время крольчата контрольных (VI, VII) групп погибли (100%) в течение 5—7 дней с характерными признаками лептоспироза. В большинстве случаев от павших при посеве выделена исходная культура. Причем разницы в активности сывороток, полученных от кроликов, иммунизированных одной лептоспирозной вакциной и лептоспирозной вакциной в комплексе и в ассоциации с бруцеллезной и пастереллезной, не отмечалось.

Как видно, иммунные сыворотки всех групп, имеющие агглютинационный титр не менее 1:162, 1:301, обеспечивали 100%-ную сохранность пассивно иммунизированным крольчатам при заражении летальной дозой вирулентной культуры лептоспир из пяти серотипов при 100%-ной гибели контрольных, получивших сыворотки от интактных животных с отрицательным титром по РМАЛ, а также контрольных, не получивших сывороток.

Этот факт доказывает высокую специфичность лептоспирозных ге-

моагглютининов и лизинов для живых лептоспир, что хорошо видно при серологических исследованиях по реакции микроагглютинации и лизиса.

Полученные данные, вероятно, говорят об отсутствии угнетающего влияния пастереллезного и бруцеллезного компонентов на антителогенез лептоспирозной вакцины как при комплексном, так и при ассоциированном применении смеси указанных трех вакцин.

Изучение защитных свойств сывороток крови у отдельно, комплексно и ассоциированно иммунизированных кроликов в отношении бруцеллезного антигена проводилось на 45-й день после их вакцинации. Испытано 66 проб сывороток крови на 260 белых мышах.

Прежде чем приступить к определению защитных свойств иммунных сывороток в отношении бруцеллезного антигена проводили титрацию бруцеллезной культуры с целью определения летальной дозы для белых мышей. По данным П. А. Вершиловой и Х. С. Котляровой [5], белые мыши легко заражаются всеми типами бруцелл как подкожно, так и перорально, для чего достаточно 10—50 бруцелл типа мелитензис и 100—500—типа абортус. При этом генерализация процессов начинается не позже, чем через 15—20 дней после заражения. Однако в эксперименте добиться гибели белых мышей от бруцеллеза трудно даже при применении больших доз. Имеется ряд работ, показавших, что при внутрибрюшинном заражении мышей бруцеллами любого типа в дозах около 0,5—1—2 млрд микробных тел можно вызвать острое заболевание животных со смертельным исходом в течение 5—7 дней после заражения. По мнению авторов, гибель мышей при таком массивном заражении объясняется интоксикацией.

Титрация культур *Bg. abortus* на белых мышах нами проводилась таким же способом, как и при пастереллезе и лептоспирозе, т. е. применялось несколько заражающих доз до выявления или определения минимальной смертельной дозы.

В последнее время титрация бактериальных культур с целью определения летальной дозы (LD_{50}) проводится по методу Рида и Менча (по [7]), который справедливо подвергся критике Э. А. Замайским [7], В. Д. Беляковым [2] и другими как необоснованный, при котором не учитывается цель эксперимента и назначение изучаемого препарата, что приводит к неверным выводам. Поэтому включать в опыт несколько заражающих доз, на наш взгляд, является более правильным, чем применять LD_{50} . При этом устраняется необходимость весьма трудоемкой работы по точной подтитровке рабочей дозы, которая иногда колеблется от опыта к опыту в значительных пределах.

При титрации трехсуточной глюкозопеченочно-агаровой культуры *Bg. abortus* из штамма 54 нами было использовано 6 доз от 1 до 3,5 млрд микробных клеток (мк). Минимальная смертельная доза равнялась 2,5 млрд мк суспензии бруцелл, которая и применялась в последующих опытах.

Защитные свойства иммунных сывороток определялись индивидуальными и групповыми способами. При испытании превентивных свойств

Таблица

Превентивные свойства сывороток крови кроликов в отношении
бруцеллезного антигена

Группа и метод вакцинации кроликов (против)	Метод применения сывороток	Количество		Белые мыши после заражения								
		проб сывороток (кро- ликов)	белых мышей до зара- жения	п а л и								
				в подгруппах						в группе		
				дни гибели (от—до)				всего	% леталь- ности	средн. пр.д. жизни	всего	% леталь- ности
1—3	4—7	8—12										
I Монобруцеллеза	индиви- дуальный	1	5	—	—	—						
		1	5	1	—	—						
		1	5	—	1	—	4	13,3	6,5			
	групповой	1	5	—	—	—						
		1	5	—	1	—						
		6	10	1	1	—	2	20,0	4,5	6	15,0	
Комплексно	II бруцеллеза и лептоспи- роза	индиви- дуальный	1	5	—	—	—					
			1	5	—	—	—					
			1	5	—	2	—	3	10,0	6,0		
		групповой	1	5	—	—	—					
			1	5	—	—	—					
			6	10	1	2	—	3	30,0	5,3	6	15,0
	III бруцеллеза и пасте- реллеза	индиви- дуальный	1	5	—	1	—					
			1	5	—	1	—	4	13,3	5,7		
			1	5	1	—	—					
		групповой	1	5	—	—	1					
			1	5	—	—	—					
			6	15	1	1	1	3	30,0	5,7	7	17,5
IV бруцелле- за, лепто- спироза и пастерел- леза	индиви- дуальный	1	5	—	—	—						
		1	5	—	—	—						
		1	5	—	1	—	3	10,0	6,3			
	групповой	1	5	—	—	I						
		1	5	—	—	—						
		6	10	1	2	—	3	30,0	4,6	6	15,0	
V Ассоциированно бруцеллеза, леп- тоспироза + пасте- реллеза	индиви- дуальный	1	5	—	—	1						
		1	5	—	—	—						
		1	5	1	—	—	3	10,0	6,6			
	групповой	1	5	—	1	—						
		1	5	—	—	—						
		6	10	—	2	—	2	20,0	5,0	5	12,5	
VI Контроль сы- воротки	групповой	6	30	1	6	2	9	30,0	5,6	9	30,0	
VII Контроль культуры		—	30	6	8	3	17	56,6	4,9	17	56,6	

сывороток крови в отношении бруцеллезного антигена сыворотку вводили подкожно по 0,2 мл. При индивидуальном способе определения превентивных свойств сывороток, полученных от 6 кроликов из каждой группы (I, II, III, IV, V, VI), они вводились подопытным мышам соответствующих групп в отдельности, т. е. сыворотку от одного кролика вводили 5 белым мышам. При групповом способе сыворотки, полученные от 6 кроликов, поровну смешивали, и эту смесь вводили 10 белым мышам также по 0,2 мл под кожу. Контролем сыворотки и культуры служили две группы по 30 белых мышей в каждой.

Как и в предыдущих опытах, спустя 24 часа после пассивной иммунизации белых мышей вместе с контрольными заражали вирулентной культурой *Bg. abortus* из штамма 54 летальной дозой ($D_{100} = 2,5$ млрд мк). После заражения мыши были под наблюдением в течение 12 дней. Активность защитных сил иммунных сывороток определялась по количеству павших мышей, проценту летальности и средней продолжительности их жизни.

Судя по данным таблицы, можно сказать, что во всех группах после заражения вирулентной культурой *Bg. abortus* сохраняемость белых мышей очень высокая. Так, выживаемость по монобруцеллезной группе в целом составляла 85,0%. Аналогичные результаты получены во второй и четвертой группах, которые получили сыворотку от комплексно иммунизированных кроликов против бруцеллеза с лептоспирозом, бруцеллеза с лептоспирозом и пастереллезом. Несколько ниже процент выживаемости у мышей, получивших иммунные сыворотки от комплексно иммунизированных против бруцеллеза и пастереллеза кроликов — 82,5, причем продолжительность жизни павших мышей составляла 5,7 дней. Сравнительно высокий процент сохраняемости (87,5) отмечался у белых мышей V группы, которые получали сыворотки от ассоциированно иммунизированных кроликов, привитых смесью трех вакцин, где 90,0% выживаемости отмечено в индивидуальной подгруппе со средней продолжительностью жизни белых мышей 6,6 дней. Надо отметить, что процент сохраняемости белых мышей контрольной группы, получивших сыворотки от интактных кроликов, также высок (70,0), при этом средняя продолжительность жизни павших мышей составляла 5,6 дней. Белых мышей, не получивших никаких сывороток, погибло всего 56,6%. Эти данные показывают, что 100%-ную гибель невозможно вызвать при заражении вирулентной культурой *Bg. abortus*. Однако полученные данные по группам животных дают возможность правильно оценить иммунобиологическую перестройку организма вакцинированных кроликов.

Из таблицы видно, что у белых мышей, получивших сыворотку от комплексно и ассоциированно иммунизированных кроликов, особенно от вакцинированных тремя вакцинами, процент выживаемости более высокий, чем у мышей, получивших сыворотку от кроликов, иммунизированных одной бруцеллезной вакциной. Это говорит о том, что не только отсутствие взаимоугнетающего действия на иммуногенез бруцел-

лезного антигена со стороны лептоспирозного и пастереллезного антигенов, но и их присутствие, особенно лептоспирозного, в какой-то мере стимулирует иммунообразовательный процесс в организме, вследствие чего защитная сила сывороток кроликов у ассоциированно иммунизированных групп оказалась несколько выше (87,5%), чем в сыворотке, полученной от кроликов, привитых одной бруцеллезной вакциной (85,0%).

Аналогичные результаты при определении превентивных свойств сывороток крови в отношении бруцеллезного антигена получили многие исследователи. В опытах Г. А. Шакаряна [16] при подкожном заражении активно иммунизированных против бруцеллеза мышей культурой *Bt. abortus* выживаемость составляла 83,4—94,5%, при внутрибрюшинном заражении она составляла 72,3%, когда сохраняемость контрольных мышей была равна 40,0%.

Подытоживая полученные данные при испытании превентивных свойств сывороток крови раздельно, комплексно и ассоциированно иммунизированных кроликов в отношении пастереллезного, лептоспирозного и бруцеллезного антигенов, можно заключить, что они совместимы и что между этими антигенами конкуренция отсутствует.

Ереванский зооветеринарный
институт

Поступила 22/VII 1974 г.

Հ. Ս. ՂԱԶԱՐՅԱՆ

ԻՄՈՒՆԱՑՎԱԾ ԾԱԳԱՐՆԵՐԻ ԱՐՅԱՆ ՇԻՃՈՒԿԻ ՀԱԿԱՔՐՈՒՑԵԼՈԶԱՑԻՆ ՀԱՏՎՈՒԹՅՈՒՆԸ

Ա. մ. փ. ռ. փ. ռ. մ.

Ճագարներին հակաբրուցելոզային վակցինայով առանձին, հակալեպտոսպիրոզային ու հակապատերելոզային վակցինաների հետ համալիր և ասոցիացված եղանակներով իմունացվելուց 45 օր հետո վերցրած արյան շիճուկներով պատիվ իմունացված սպիտակ մկներին բրուցելլոզի վիրուսներու կոլտուրայով վարակելուց հետո պարզվել է, որ անկախ վակցինացման եղանակից, բոլոր իմուն շիճուկներն էլ օժտված են ակտիվ պրեվենտիվ հատկությամբ, առավել ևս այն շիճուկները, որոնք ստացվել են երեք վակցինաներով համատեղ իմունացված ճագարներից: Այսպես, եթե հակաբրուցելոզային միավակցինայով իմունացված ճագարներից ստացված շիճուկներով պատիվ իմունացված մկներից, կոնտրոլ վարակումից հետո, կենդանի մնացին 85,0%, ապա երեք վակցինաներով համատեղ իմունացված ճագարներից ստացված շիճուկները մկներին պահպանեցին ավելի քան 87,5%:

Այս և նախորդ փորձերի տվյալները վկայում են այն մասին, որ նշված երեք վակցինաները համատեղ կիրառելիս օրգանիզմում նրանց նկատմամբ սինթեզվում է կայուն և տևական իմունիտետ:

Л И Т Е Р А Т У Р А

1. Ананьин В. В. ЖМЭИ, 1948, 5, стр. 8.
2. Беляков В. Д. Иммунопрофилактика в эпидемиологии. М., 1961.
3. Бояхчян А. Б., Казарян А. С. Тезисы докладов научной конференции Ереванского зооветеринарного института. Ереван, 1972, стр. 56.
4. Варфоломеева А. А. Лептоспирозные заболевания человека. М., 1949.
5. Вершилова П. А. и Котлярова Х. С. Методика лабораторных исследований по изучению экспериментального бруцеллеза. М., 1950.
6. Газарян В. С. Ветеринария, 1946, 7, стр. 24.
7. Замайский Э. А. ЖМЭИ, 1956, 1, стр. 77.
8. Зильбер Л. А. Основы иммунологии. М., 1958.
9. Казарян А. С. Тезисы докладов научной конференции «Актуальные вопросы животноводства и ветеринарии в Армянской ССР». Ереван, 1974, стр. 154.
10. Казарян А. С. Биологический журнал АН Арм. ССР, т. XXVII, 11, стр. 103.
11. Казарян А. С. Журн. exper. и клинич. медицины АН Арм. ССР, 1974, 6, стр. 8.
12. Казарян А. С. Журн. exper. и клинич. медицины АН Арм. ССР, 1975, 1, стр. 35.
13. Любашенко С. Я., Новикова Л. С., Щербакова И. Г. ЖМЭИ, 1950, 6, стр. 37.
14. Терских В. И. Микробиология, 1933, 11, 1, стр. 100.
15. Терских В. И. Микробиология, 1933, 2, 1, стр. 107.
16. Шакарян Г. А. Труды Ер. ЗВИ, в. 9, стр. 3.
17. Ширвинская А. И., Перова К. С. Лабораторное дело, 1961, 1, стр. 39.
18. Inada, Kaneko, Ido, Ito, Hoki. J. Exp. Med., 1916, 23, 3.