

ВЕТЕРИНАРИЯ И ЖИВОТНОВОДСТВА

УДК 616:022.1619;616.981.42

Еспембетов Б.А., Сырым Н.С., Зинина Н.Н., Табынов К.К.,
Рыскельдинова Ш.Ж., Конбаева Г.М.

*РГП «Научно-исследовательский институт проблем биологической безопасности»
КН МОН РК, Жамбылская область, Кордайский район, п.г.т. Гвардейский*

КОНЪЮНКТИВАЛЬНЫЙ СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ МИНИМАЛЬНОЙ ЗАРАЖАЮЩЕЙ ДОЗЫ КОНТРОЛЬНОГО ШТАММА В. ABORTUS 544 ДЛЯ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Аннотация

В статье представлены результаты определения минимальной заражающей дозы штамма *V. abortus* 544 конъюнктивальным способом введения и возможность применения его для контрольного заражения в оценке иммуногенности противобруцеллезных векторных вакцин на крупном рогатом скоте. Штамм *V. abortus* 544 в дозе 500 млн. м.т. может применяться конъюнктивальным способом введения для контрольного заражения при оценке иммуногенности противобруцеллезных векторных вакцин.

Ключевые слова: бруцеллез, штамм, доза, способ, крупный рогатый скот, вакцина

Введение

Известно, что при некоторых инфекционных заболеваниях конъюнктивальные реакции являются показателями иммунологической перестройки организма. На способности конъюнктивы: «реагировать на специфические раздражители» основаны широко используемые в ветеринарной практике методы аллергической диагностики при бруцеллезе.

Конъюнктива обильно снабжена нервами и сосудами и поэтому легко реагирует на всякие раздражения эндо- и экзогенного характера. Благодаря анатомо-физиологическим особенностям (построения из рыхлой соединительной ткани) и наличию большого количества лимфатических путей конъюнктива обладает значительной всасывательной способностью. Целесообразность введения вакцин через слизистые оболочки, кроме удобства, обусловлена также своеобразием анатомо-физиологических особенностей слизистых покровов и, прежде всего, их способностью всасывать различные вещества, в том числе и антигены [1, 2].

Кроме большой всасывающей способности слизистых оболочек важное значение в развитии иммунитета играет и факт наличия (в слизистой и подслизистой) развитой сети лимфатических сосудов и рецепторов, что создает условия, для быстрой мобилизации функций ретикуло-эндотелиальной системы (регионарных лимфатических узлов) и передачи иммунизационного раздражения по организму.

К настоящему времени установлено, что успех иммунизации зависит не только от общей реактивности организма, качества вакцинных препаратов, но и от методов их применения, т.е. способов введения вакцин в организм. Доказана возможность создания активного иммунитета при нанесении на неповрежденные слизистые оболочки некоторых токсинов, анатоксинов и вакцин [3]. А также при иммунизации противобруцеллезной вакциной определенную роль играет изучение заражающей дозы контрольного штамма. Совершенно очевидно, что для получения воспроизводимых результатов эта доза в каждом опыте должна быть строго определенной величины.

Целью наших исследований являлось определение минимальной заражающей дозы контрольного штамма *B. abortus* 544 конъюнктивальным методом для оценки иммуногенности векторной противобруцеллезной вакцины в опыте на крупном рогатом скоте.

Материалы и методы исследований

Освежение эталонного контрольного штамма *B. abortus* 544 с целью проведения биоконтроля проводилось путем его пересева *in vitro* на питательной среде Brucella Agar Base с добавками (агар-агар, глюкоза, глицерин, L-цистин, дрожжевой экстракт), а также *in vivo* через организм морских свинок, массой 250-300 г. Далее для восстановления вирулентных свойств лиофилизированного штамма *B. abortus* 544 провели пассирование через организм морских свинок до 7 пассажного уровня.

В экспериментальных исследованиях для определения заражающей дозы, были использованы: 9 телок в возрасте от 1,5 до 2 лет, живой массой 100-150 кг.

Уровень развития патологического процесса в организме животных учитывали клиническим наблюдением с термометрией тела животного и путем систематического еженедельного взятия сыворотки крови с постановкой иммунологических реакций: розбенгал пробы (РБП), реакции агглютинации (РА) и реакции связывания комплемента (РСК).

Биоконтроль и фенотипические свойства бруцелл штамма *B. abortus* 544 изучали путем использования культурально-морфологических, серологических, биохимических и других методов исследований по общепринятой схеме ФАО/ВОЗ [4,5,6].

Результаты исследований и их обсуждение

В результате проведенных исследований установлено, что контрольный штамм *B. abortus* 544, подвергнутый биоконтролю сохранил свои исходные типовые свойства, согласно паспортным характеристикам данного штамма.

После освежения и проведения полного биологического контроля контрольного штамма *B. abortus* 544 перешли к проведению основного эксперимента - определению минимальной заражающей дозы на крупном рогатом скоте. Для данного опыта были взяты 9 телок, из которых созданы 3 группы в каждой по 3 головы. Животным трех групп вводили шт. *B. abortus* 544 в разных дозах: 1 группа – 60 млн. м. т./см³, 2 группа – 240 млн. м. т./ см³. 3 группа – 500 млн. м. т./ см³ конъюнктивально в объеме по 0,5 см³ в каждый глаз.

После заражения, за животными ежедневно велись клинические наблюдения, с обязательным проведением ректальной термометрии и взятием крови с интервалом 7, 14, 21, 28 суток для серологических исследований. Термометрия является важным обязательным диагностическим показателем, который позволяет проследить динамику состояния животного в период заражения. Результаты термометрии, клинических наблюдений представлены на рисунках 1 и 2.

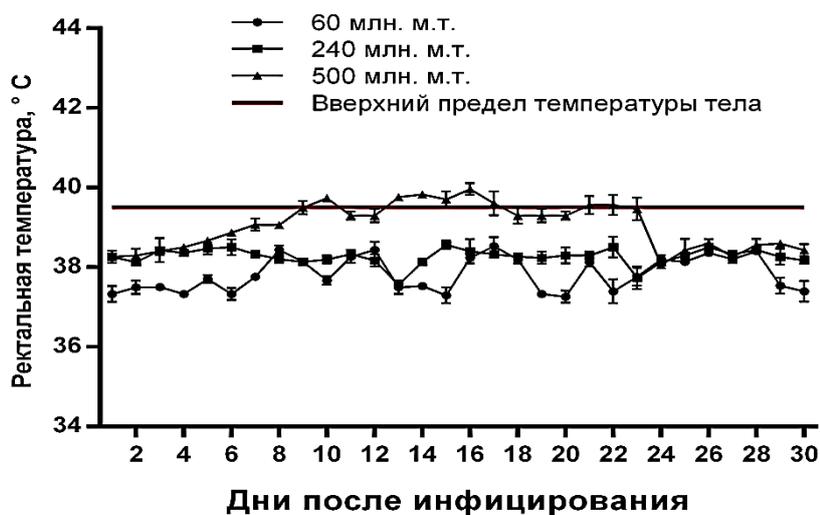


Рисунок 1 – Результаты термометрии телок зараженных *B. abortus* 544

Клиническое наблюдение за телками в течение опытного периода показало, что температура тела в 1 и 2 группах животных значительных колебаний не отмечалось: утром 37,8 °С, а вечером 38,3 °С. Оптимальной нормой для этого возраста животных температура тела считается предел от 37,5 °С до 39,5 °С. По нашим данным разница между вечерней и утренней термометрией составляло 0,5 градусов, что является нормой.

При клиническом наблюдении у телок 3-ей группы отмечено незначительное угнетение общего состояния организма, слюнотечение, конъюнктивит, увеличение предлопаточных лимфоузлов и повышение температуры тела от 40,0 до 41,5°С в течение 3 суток (рис. 2).



Рисунок 2 – Состояние глаз у животных зараженных конъюнктивальным методом.

Как видно из рисунка 2, на 7-9 сутки у животных 3-й группы, зараженных бруцеллезом конъюнктивально происходило опухание и покраснение века зараженного глаза и истечение гноя, что подтверждает тем самым вирулентность вышеуказанного штамма.

До заражения и с момента заражения от животных через каждые 7 суток, взята кровь для серологического исследования на бруцеллез в РБП, РА и РСК. Результаты исследования сывороток крови взятых от опытных животных представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты серологических исследований при определении минимальной заражающей дозы контрольного штамма Br.abortus 544 для КРС.

Дни	Вид иссл	Разве дения	Дозы заражения для телок шт.В.abortus 544								
			60 млн.м.т./см ³			240 млн.м.т./см ³			500 млн.м.т./см ³		
			Инв. № 03135	Инв. № 05105	Инв. № 33239	Инв. № 141 10	Инв. № 13510	Инв. № 17133	Инв. № 14555	Инв. № 22115	Инв. № 03285
7-е сутки	РПБ		-	-	-	-	+	-	+	+	+
	РСК	1:5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		1:10	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	РА	1:50	-	-	-	-	-	-	+++	+++	++
		1:100	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++
		1:200	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++
	1:400	-	-	-	-	-	-	++	++	++	
14-е сутки	РБП		-	-	-	-	-	-	#	+++	+++
	РСК	1:5	-	-	-	-	-	-	#	#	#
		1:10	-	-	-	-	-	-	+	#	#
	РА	1:50	-	-	-	-	-	-	#	#	#
		1:100	-	-	-	-	-	-	#	#	#
		1:200	-	-	-	-	-	-	#	#	+++
	1:400	-	-	-	-	-	-	#	+++	+	
21-е сутки	РПБ		+	+	+	+	-	-	#	#	#
	РСК	1:5	-	-	-	-	-	-	++	#	#
		1:10	-	-	-	-	-	-	#	#	#
	РА	1:50	-	-	-	-	-	-	#	#	#
		1:100	-	-	-	-	-	-	#	#	#
		1:200	-	-	-	-	-	-	#	+++	+++
	1:400	-	-	-	-	-	-	#	+++	+++	
28-е сутки	РБП		-	-	+	-	+	+	+++	+++	#
	РСК	1:5	-	-	-	-	-	-	#	#	#
		1:10	-	-	-	-	-	-	#	#	#
	РА	1:50	-	-	-	-	-	-	+++	+++	+++
		1:100	-	-	-	-	-	-	++	+++	++
		1:200	-	-	-	-	-	-	++	++	++
	1:400	-	-	-	-	-	-	+	+	+	

Примечания: «#» - положительная реакция на 4 креста
 «-» - отрицательная реакция

Данные из таблицы 1 показывают, что исследованные пробы сывороток крови телок 1-ой и 2-ой группы до заражения и в последующие сутки после заражения штаммом В.abortus 544 в серологических тестах были отрицательными. Тогда как в РБП с сыворотками крови от телок 3 группы через 7 сут наблюдали мелкозернистый агглютинат, а начиная с 10 суток отмечали крупнозернистую агглютинацию с выраженным просветлением. Начиная, с 14 суток после заражения у телок выявляли

комплемента связывающие антитела в РСК, а реакция агглютинации 14 суток была положительной почти у всех экспериментальных животных 3 группы и при дальнейших наблюдениях существенного различия в титрах не отмечено.

Проведенные серологические тесты, с позитивными результатами указывают на то, что в организме подопытных животных 3-ей группы циркулирует возбудитель бруцеллеза.

После заражения через 30 суток проведено патологоанатомическое вскрытие телок и отобраны для бактериологического исследования органы (печень, почки, селезенка), лимфоузлы (заглоточный, средостенный, бронхиальный, брыжеечный, правые и левые предлопаточные, паховые, портальный, параортальный, тазовый, надвыменной) и костный мозг. Далее проведены высевы из вышеуказанных органов, лимфоузлов и костного мозга на питательные среды. Результаты бактериологических исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты бактериологических исследований

Доза заражения	Инв № жив-х	Результаты бактериологических исследований									Индекс инфек-ти (ИИ)
		Лимфоузлы					Органы			Кост-ный мозг	
		Загл О точ	Пред лопат	Пахо-вый	Тазо-вый	Пара орт	Пе чень	Поч ки	Селе zenка		
60 млн м.т./см ³	03135	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	05105	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	33239	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
240 млн м.т./см ³	14110	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	13510	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	17133	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
500 млн м.т./см ³	14555	+	+	+	+	+	+	+	+	+	91,7±3,1
	22115	+	+	+	+	+	+	+	+	+	93,3±2,7
	03285	+	+	+	+	+	+	+	+	+	92,9±4,1

Культуры бруцелл были выявлены на питательной среде, посевного материала из всех исследуемых лимфоузлов и из органов животных 3 группы (500 млн. м.т./см³). Важно отметить, что выделенная исходная культура штамма *B. abortus* 544 после заражения телок в дозе 500 млн.м.т. /см³ вызывала генерализованный процесс, средний индекс инфицированности (ИИ) составлял - $92,7 \pm 3,1$ в организме животного подтверждая тем самым вирулентность вышеуказанного штамма (таблица 3).

Таблица 3 – Высеваемость бруцелл из селезенки коров, зараженных контрольным штаммом *B. abortus* 544

Дозы заражения	Инв. № животных	ИВС (индекс веса селезёнки)	Значение (P)
60 млн. м.т см ³	03135	0.64±0.38	<0.01
	05105	0.66±0.34	<0.001
	33239	0.16±0.23	<0.005
240 млн. м.т см ³	14110	0.22±0.31	<0.001

	13510	1.21±0.25	<0.005
	17133	1.160±0.19	<0.001
500 млн. м.т см ³	14555	3.13±0.57	<0.005
	22115	3,36±0.31	<0.001
	03285	3.28±0.51	<0.005

Данные таблицы 3 показывают, что у животных 3 группы был высоким индекс веса селезёнки (ИВС), равный в среднем $3,25 \pm 0,46$, и средний индекс инфицированности (ИИ) - $92,7 \pm 3,1$. Эти животные реагировали позитивно в серологических реакциях. Все эти результаты свидетельствуют о генерализованной форме инфицирования бруцеллезом.

Выводы

По результатам проведённых экспериментальных исследований минимальная заражающая доза штамма *B. abortus* 544 для крупного рогатого скота конъюнктивальным способом составила 500 млн м.т./см³, вызывающих генерализованный процесс бруцеллезной инфекции. Следовательно, отработанная заражающая доза шт. *B. abortus* 544 конъюнктивальным методом может использоваться для контрольного заражения при оценке иммуногенности противобруцеллезных векторных вакцин.

Литература

1. Селиванова А. Иммунизация животных живой противобруцеллезной вакциной через неповрежденные слизистые оболочки. Дисс... канд.вет.нак.- М.1971.- С.37.
2. Онищенко Г.Г. Актуальные проблемы профилактики инфекционных болезней на современном этапе. Микробиология. М.2010. - С.13–22.
3. Жарова Л.В. Эффективность конъюнктивального метода иммунизации овец против бруцеллеза вакциной из штамма 19. Дисс. канд. вет. наук. - Омск, 2002. - 106 с.
4. Панкова, Е.В. Фенотипический контроль стабильности при хранении музейных и производственных штаммов возбудителей бруцеллеза/ Е.В. Панкова // Ветеринарный врач. - Казань. - 2012. - С.23-24.
5. Techniques for the brucellosis laboratory. Institut national de la recherche agronomique 147, rue de l'Université, 75007//IJRA Paris J. – 1988. – ISBN № – 2 – 7380 – 0042-8. - P.145.
6. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees) Sixth Edition Volume 2, 2008.

Еспембетов Б.А., Сырым Н.С., Зинина Н.Н., Табынов Қ.Қ.,
Рыскельдинова Ш.Ж., Қонбаева Г.М.

В. ABORTUS 544 БАҚЫЛАУ ШТАМЫНЫҢ ІРІ ҚАРАҒА КОНЪЮНКТИВТЫ ЕНГІЗУ ӘДІСІМЕН МИНИМАЛЬДЫ ДОЗАСЫН АНЫҚТАУ

Андатпа

Бұл мақалада *B. abortus* 544 штаммының конъюнктивты әдісімен егу бағыты кезінде ең төменгі жұқпалы дозасын анықтауы және оны жұқпалы бақылау үшін мал бруцеллезге қарсы векторлы вакциналардың иммуногендігін бағалау кезінде нәтижелері ұсынылған. 500 млн. м.т дозада *B. abortus* 544 штаммын конъюнктивты әдісімен егу үшін пайдалануға болады.

Кілт сөздер: бруцеллез, штамм, доза, ірі қара мал, әдіс, вакцина.

Yespembetov B.A., Syrym N.S., Zinina N.N., Tabynov K.K.,
Ryskeldinova S.Z., Konbaeva G.M.

METHOD FOR DETERMINING THE MINIMUM CONJUNCTIVAL INFECTION DOSE CONTROL STRAINS B. ABORTUS 544 FOR CATTLE

Annotation

This paper presents the results of determining the minimum infective dose of B. Abortus 544 strain conjunctival route of administration and the possibility of using it to challenge in the evaluation of the immunogenicity antibrucellar vector vaccines in cattle. B. abortus 544 strain at a dose of 500 million microbial cells can be used for the method of administration conjunctival challenge in assessing the immunogenicity antibrucellar vector vaccines.

Keywords: brucellosis, strain, dose, method, cattle, vaccine.

ӘОЖ 619:615. 35:616.07

Кеңесхан Ж., Қазиев Ж.І., Мурсалимова М.

Қазақ ұлттық аграрлық университеті

АС ҚОРЫТУ ЖҮЙЕСІ АУРУЛАРЫ КЕЗІНДЕГІ ҚАНДАҒЫ ЖАЛПЫ БЕЛОК ЖӘНЕ БЕЛОК ФРАКЦИЯЛАРЫНА ГРЕК ЖАҢҒАҒЫ ТҮНБАСЫНЫҢ ӘСЕРІ

Аңдатпа

Мақалада грек жаңғағы тұнбасының жалпы белок және белоктық фракцияларға әсер ету нәтижелері келтірілген. Бұл препараттардың сондай-ақ басқа фракцияларға да қуаттандырып әсер ететіндігі жайлы деректер бар.

Кілт сөздер: диспепсия, қайнатпа, тұнба, тұнбаша, антибиотиктер, белок, глобулин, фосфор, альбумин, процесс.

Кіріспе

Мал шаруашылығы алдында тұрған негізгі мәселелердің бірі – төлдер арасындағы ауруларды болдырмай, малдардың өсіп-көбею мүмкіндігін жоғарылату. Сонымен қатар, ғылым алдында тұрған ең маңызды мәселелердің бірі ауыл шаруашылық мал организмінің физиологиялық және өсіп-өну қабілетін жоғарлататын арзан да тиімді, әсері күшті биопрепараттар шығару болып табылады. Қазіргі кездегі көптеген ғалымдардың зерттеулеріне сүйенсек, ас қорыту жүйесі ауруларына ермен, жусан, зығыр және тағы басқа өсімдіктердің тұнбаларын қолдану жақсы нәтижелер беретіні айтылған. Бірақ, әлі де болса сапалы, қол жетерлік, қарапайым дәрілік заттарды өндіріске енгізудің маңызы өте зор [1, 2]. Осыған орай, біз өзіміздің зерттеулерімізде грек жаңғағы тұнбашасын, тұнбасын немесе қайнатпасын бұзаулардың диспепсиясына қарсы қолданып, біршама көңіл толарлық нәтижелер алдық. Бұл нәтижелердің бірі – грек жаңғағы тұнбасы немесе қайнатпасының ауру бұзаулар ағзасындағы жалпы белок және оның фракцияларына әсері.

Зерттеу материалдары мен әдістері

Грек жаңғағынан жасалынған тұнбаның немесе қайнатпаның ас қорыту жүйесіне әсерін зерттеу мақсатындағы ғылыми жұмысты орындау барысында шаруашылықтағы ауру бұзауларды диспепсияның жеңіл түрінің клиникалық белгілеріне қарай, 5 бастан, екі топ құрдық. тәжірибелік топтағы 5 бұзауға грек жаңғағы тұнбасын немесе қайнатпасын (50 мл тұнбаша + 50 мл су немесе 100-200 мл қайнатпасы) емізік шөлмек арқылы