

Рис. 1. Внутрицитоплазматическая локализация репродукции вируса ВД

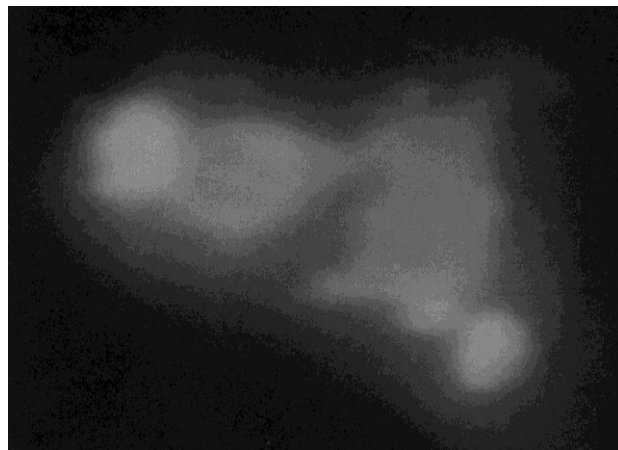


Рис. 2. Интенсивная репродукция вируса ВД.

**Заключение.** Проводимая *in situ* РИФ как непосредственно с патологическим материалом, так и с зараженной культурой клеток информативна в том плане, что при ее использовании в зараженных клетках можно выявить локализованный вирус на различных стадиях репродукции. Особенно важно, при этом, обращать внимание на локализацию (место расположения в клетке) вируса: внутриядерная или внутрицитоплазматическая, так как вирусы, относимые к разным таксономическим группам, отличающиеся различной стратегией вирусного генома репродуцируются в различных структурах клетки и эти данные могут быть использованы с целью дифференциальной лабораторной диагностики смешанных или ассоциированных вирусных инфекций. Так, вирусы ВД, ПГ-3, РСИ репродуцируются в цитоплазме, в то время как вирусы ИРТ и АДВ – в ядре. Также с помощью РИФ можно оценить степень (интенсивность) инфицированности конкретного животного или зараженной культуры клеток по количеству клеток в поле зрения с интенсивно зеленой флуоресценцией.

**Литература.** 1. Будулов Н.П. Респираторные болезни крс в Дагестане.[Текст] : автореф. дис. ... докт. вет. наук. : 16.00.03., 16.00.01./ Н.П. Будулов; – Краснодар, 2009. – 48 с. 2. Вирус-бактериальные инфекции в патологии воспроизводства крупного рогатого скота / Н.П. Четкина, М.П. Павленко, В.Ф. Макеев и др. // Вет. медицина: Міжвід. темат. наук. зб.– X., 2005.– Вып.92.– С.515 – 521. 3. Гуренко І.А. Змішані форми респіраторних хвороб телят [Текст] : автореф. дис. ... канд. вет. наук. : 16.00.03./ І.А. Гуренко; – К, 2002. – 18с. 4. Изучение генитальной вирус (ИРТ)-псевдомонозной инфекции у крупного рогатого скота / Н.П. Четкина, С.И. Вовк, В.Ф. Матвеев // Вет. медицина: Міжвід. темат. наук. зб.– X., 2005.– Т.ІІ, Вып.85.– С.1113 – 1117. 5. Красочко П.А. Моно- и ассоциативные вирусные респираторные инфекции крупного рогатого скота (иммунологическая диагностика, профилактика и терапия) .[Текст] : автореф. дис. ... докт. вет. наук. : 16.00.03., / П.А. Красочко; – Минск, 1997. – 35 с. 6. Красочко П.А. Биотехнологические основы конструирования и использования иммунобиологических препаратов для молодняка крупного рогатого скота. [Текст] : автореф. дис. ... докт. биол. наук. : 16.00.03., 03.00.23 / П.А. Красочко; – М., 2008. – 52 с. 7. Курконбекова З.Д. Эпизоотическая ситуация по респираторно-кишечным болезням у крс в центральных районах Таджикистана [Текст] : автореф. дис. ... канд. вет. наук. : 16.00.03. / З.Д. Курконбекова; – М., 2007. – 23 с. 8. Кучерявенко В.В. методы лабораторної діагностики парагрипу-3 великої рогатої худоби / В.В. Кучерявенко // Вет. медицина: Міжвід. темат. наук. зб.– X., 2009.– Вып.92.– С.262 – 266. 9. Молекулярная диагностика вирус-хламидийных инфекций крупного рогатого скота / В.И. Стеценко, Р.А. Кучерявенко, А.П. Герилевич и др. // Вет. медицина: Міжвід. темат. наук. зб.– X., 2007.– Вып.88.– С.245 – 248. 10. Печура Е.В. Особенности управления эпизоотическим процессом при острых респираторных заболеваниях крупного рогатого скота в уральском регионе [Текст] : автореф. дис. ... канд. вет. наук. : 16.00.03./ Е.В. Печура; – Екатеринбург, 2007. – 16 с. 11. Применение методов ИФА, РИФ и ПЦР при диагностике смешанных инфекций крупного рогатого скота / Н.П. Четкина, Б.Т. Стегний, А.П. Герилевич // Вет. медицина: Міжвід. темат. наук. зб.– X., 2007.– Вып.85.– С.263 – 268. 12. Эффективность комплексной системы мероприятий при генитальной форме герпесвирусного 1 заболевания крупного рогатого скота / Н.П. Четкина, С.А. Михайлова, Е.И. Компаниец и др. // Вет. медицина: Міжвід. темат. наук. зб.– X., 2005.– Т.І, Вып.85.– С.1118 – 1122.

Статья поступила 25.10.2010г.

УДК 619:597.842.11

## ВИРУЛЕНТНОСТЬ И ИММУНОГЕННОСТЬ ЭШЕРИХИЙ

Медведев А.П.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»

Юдасин А.М.

УП «Витебская биофабрика»

*В статье представлены результаты определения иммуногенности производственных штаммов эшерихий в зависимости от факторов их вирулентности.*

*The article presents the results of the determination of immunogenicity of production strains of E. coli, depending on factors of their virulence.*

**Введение.** Эшерихиоз (синонимы: колибактериоз, колиэнтерит, колисепсис) – остро протекающая болезнь молодняка животных многих видов, проявляющаяся обезвоживанием организма, энтеритом,

нарастающей депрессией и слабостью, энтеротоксемией, поражением центральной нервной системы, сепсисом, иногда пневмонией и артритами.

У взрослых животных патогенные эшерихии могут вызывать аборт и артриты.

Впервые возбудителя эшерихиоза *E. coli* выделил из фекалий больного ребенка в 1885 г. немецкий ученый Т. Эшерих. Он описал кишечную палочку следующим образом: «Это неуклюжая, прямая палочка с закругленными концами, нередко приближающаяся к коккобациллам, неспоронная, грамотрицательная и подвижная благодаря наличию жгутиков»

*E. coli* относят к семейству Enterobacteriaceae, роду *Escherichia*. К настоящему времени известно более 9000 серологических вариантов эшерихий по O-, K- и H- антигенам. Однако незначительная часть их способна вызывать инфекционную патологию у животных и человека.

К факторам вирулентности эшерихий относят эндотоксины, экзотоксины (энтеротоксины), полисахаридные K-антигены, адгезивные K-антигены, гемолизины, колицины.

Эндотоксины представляют собой соматический антиген, который является составным компонентом клеточной стенки. Этот антиген термостабилен, его относят к энтеротропным ядам. Биологическая активность эндотоксина не связана с определенным сероваром эшерихий, так как эндотоксин обнаружен у большинства грамотрицательных бактерий и эта активность не носит специфического характера. Он может вызвать энтеротоксимию, эндотоксический шок, аллергические реакции, аборт. Соматический антиген клетки обладает высокой антигенной и иммуногенной специфичностью.

Эшерихии продуцируют экзотоксины, которые непосредственно влияют на энтероциты тонкой кишки макроорганизма и являются основным токсигенным фактором в развитии колидиареи. Различают экзотоксин двух типов – термолabile (ТЛ) и термостабильный (ТС).

Полисахаридные K-антигены повышают устойчивость бактерий к фагоцитозу и бактериофаги. Известно, что капсульные штаммы более вирулентны, чем бескапсульные.

Белковые адгезивные K-антигены представляют собой нитевидные образования – фимбрии (пили, ворсинки), основная функция которых сводится к прикреплению (адгезии) к энтероцитам кишечника макроорганизма. К адгезивным антигенам относят: K 88, K 99, 987P, F 41, F 210, F31A, At 20, Att 25, CFA I, CFA II и др. Наиболее изучены первые четыре антигена, которые являются одним из ведущих факторов вирулентности у эшерихий.

К факторам вирулентности бактерий относят также гемолизины, которые способны вызвать лизис эритроцитов крови животных и человека.

Некоторые разновидности *E. coli* продуцируют антибиотические вещества белковой природы – колицины. Эшерихии, способные продуцировать колицины называют колициногенными. Колицины могут подавлять рост и развитие филогенетически родственных бактерий. Колициногенность – один из факторов вирулентности эшерихий.

Приведенные выше краткие сведения свидетельствуют о довольно большом наборе факторов вирулентности эшерихий – возбудителей эшерихиоза животных и человека.

Из материала литературы известно, что факторы вирулентности в разной степени обладают антигенными свойствами и иммуногенной активностью (О.А. Тугаринов, 1998).

Поэтому мы задались целью определить иммуногенность таких факторов вирулентности как эндотоксины, экзотоксины и адгезивные антигены.

**Материалы и методы исследований.** Для определения значения эндотоксинов в иммуногенности эшерихий мы в лабораторных условиях из производственного штамма 041 приготовили инактивированную вакцину. Этот штамм не имеет капсульных и адгезивных антигенов, но обладает высокой вирулентностью за счет эндотоксина.

Для приготовления вакцины бактерии выращивали в течении 20 часов в чашках Петри на МПА, смывали бульоном Хоттингера, доводили концентрацию до 10 млрд. микробных клеток в 1 см<sup>3</sup>, инактивировали 0,3%-ным раствором формалина в течение 10 суток при температуре 37°C.

Иммуногенность вакцины определяли на белых мышах массой 18-20 г. Мышей в подопытных группах иммунизировали подкожно и через 20 дней после этого заражали штаммами эшерихий: 078, 0101, 0149, 041, в качестве контроля использовали интактных животных.

Штаммы, применяемые для заражения характеризовались следующими свойствами. Бактерии *E. coli* 078 были токсигенными, имели капсульный антиген, синтезировали экзотоксин и гемолизин, обладали высокой вирулентностью для белых мышей. Микробы *E. coli* 0101 имели адгезивный антиген, обладали гемолитическими свойствами продуцировали экзотоксин, но были слабо вирулентными для мышек. Штамм *E. coli* 0149 характеризовался практически теми же свойствами, что и *E. coli* 0101, но степень вирулентности для мышей была более высокой. Бактерии *E. coli* 041 не имели антигенного родства с упомянутыми штаммами.

**Результаты исследований исследований.** Методика постановки опыта и его результаты представлены в таблице 1.

Таблица 1 - Иммуногенность для белых мышей вакцины из штамма эшерихий 041

Группа мышей	Количество мышей на дозу	Доза вакцины (млн.м.к.)	Штамм для заражения (млн.м.к.)	Результат		ИД <sub>50</sub> (млн.м.к.)
				выжило	пало	
1	5	500	041	3	2	150
	5	100		2	3	
	5	20		1	4	
	5	4		0	5	
	5	0,8		0	5	
	5	контроль		0	5	

Продолжение таблицы 1

2	5	500	078 125	2	3	420
	5	100		1	4	
	5	20		0	5	
	5	4		0	5	
	5	0,8		0	5	
	5	контроль		0	5	
3	5	500	0101 900	1	4	600
	5	100		0	5	
	5	20		0	5	
	5	4		0	5	
	5	0,8		0	5	
	5	контроль		0	5	
4	5	500	0149 125	0	5	650
	5	100		0	5	
	5	20		0	5	
	5	4		0	5	
	5	0,8		0	5	
	5	контроль		0	5	

Результаты опыта позволяют утверждать, что вакцина защищает от гибели 50% мышей только против гомологичного штамма *E.coli* 041, а по отношению к другим штаммам бактерий, обладающим более многочисленными факторами патогенности, но не имеющими O-антигена, защита мышей отсутствует.

Для выяснения роли адгезивных антигенов в иммуногенности эшерихий нами был взят в опыте производственный штамм *E.coli* 0149:K91:K88. Этот штамм культивировали при комнатной температуре и в термостате при 37°C. Культуры, выращиваемые при комнатной температуре не синтезировали антиген K88, а выращиваемые в термостате отличались высоким содержанием этого антигена. Из культур, выращенных при комнатной температуре и в термостате, были приготовлены формолвакцины, иммуногенную активность которых мы изучали в остром опыте на белых мышах. Каждой вакциной иммунизировали подкожно мышек массой 18-20 г в дозах: 0,4 - 0,2 - 0,1 - 0,05 см<sup>3</sup>, используя на дозу 20 особей. Спустя 20 дней после инъекции вакцин, мышей заражали исходным штаммом, содержащим антиген K88 в дозе 3 ЛД<sub>50</sub>. Одновременно с иммунизированными заражали 20 интактных мышек, которые служили контролем. В результате опыта было установлено, что иммунизирующая 50%-ная доза вакцины, изготовленной из культуры, содержащей адгезивный антиген составила для мышей 0,320 млрд. микробных клеток или 0,081 см<sup>3</sup> вакцины, а 50%-ная доза вакцины без адгезивного штамма - 0,506 млрд. микробных клеток или 0,126 см<sup>3</sup> препарата. Следовательно, вакцина, приготовленная из бактерий с адгезивным антигеном обладает более высокой иммуногенной активностью по сравнению с вакцинной, приготовленной из эшерихий без адгезивного антигена.

С целью выявления зависимости иммуногенной активности штаммов эшерихий от продукции ими экзотоксинов нами были приготовлены две вакцины. Одна содержала токсин, обработанный формалином - анаэзотоксин, а другая - не содержала его, так как для ее приготовления использовали автоклавированную культуру отмытую физраствором. Для приготовления обеих вакцин использовали производственный штамм за № 320.

Иммуногенность препаратов определяли для белых мышек, которым вводили вакцины подкожно в дозах: 0,5 - 0,1 - 0,02 - 0,04 см<sup>3</sup> используя пять мышек на дозу. Спустя 20 суток производили заражение вакцинированных и не вакцинированных мышек (контроль).

Результат изучения активности этих вакцин отражает таблица 2.

Таблица 2 - Иммуная активность вакцин для белых мышей в зависимости от содержания экзотоксинов.

Группа мышей	Количество мышей на дозу	Доза вакцины (см <sup>3</sup> )	Штамм для заражения (млн.м.к.)	Результат		ИД <sub>50</sub> (см <sup>3</sup> )
				выжило	пало	
Штамм № 320 с экзотоксином	5	0,5	№320 125	4	1	0,031
	5	0,1		3	2	
	5	0,02		3	2	
	5	0,04		1	4	
Штамм № 320 без экзотоксином	5	0,5	№320 125	3	2	0,116
	5	0,1		2	3	
	5	0,02		1	4	
	5	0,04		0	5	
контроль	10	-	№320 125	-	10	-

Из таблицы видно, что для ИД<sub>50</sub> для белых мышей вакцины с экзотоксином составила 0,031 см<sup>3</sup>, а без экзотоксина - 0,116 см<sup>3</sup>, т.е. более иммуногенной оказалась вакцина, содержащая анаэзотоксин.

**Заключение.** Проведенная опытная работа позволяет сделать выводом том, что иммуногенность эшерихий находится в прямой зависимости от факторов вирулентности (эндотоксинов, адгезивных антигенов, экзотоксинов) которыми они обладают.

Поэтому при конструировании вакцин для специфической профилактики эшерихиоза необходимо изолировать и отбирать энтеропатогенные эшерихии не только с учетом широты их распространенности, но и с последующим выявлением факторов вирулентности выделенных штаммов бактерий и определением влияния этих факторов на иммуногенность разрабатываемых препаратов в состав которых предполагается ввести определенные сероварианты микроорганизмов.

**Литература.** 1. Бессарабов, Б.Ф., Вашутин, А.А., Воронин, Е.С. и др. *Инфекционные болезни животных. Москва «Колос» - 2007.-671с.* 2. Тугаринов, О.А. *Средства и методы специфической профилактики, лечения и диагностики эшерихиоза животных. Автореферат диссерт., на соиск. уч. ст. доктора ветер. наук. Москва, 1999.-64с.*

Статья поступила 15.09.2010г.

УДК 619:615.373

## СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СПОСОБА ПОЛУЧЕНИЯ СЫВОРОТКИ ПРОТИВ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА ЖИВОТНЫХ

**Медведев А.П., Даровских С.В., Даровских И.А.**

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»  
г.Витебск, Республика Беларусь.

*В статье представлены результаты опытной работы по совершенствованию способа получения сыворотки против сальмонеллеза животных.*

*The article contains the research on developing the salmonella immune serum manufacturing.*

**Введение.** Сальмонеллез – полиэтиологическая инфекционная болезнь животных и человека, вызываемая разнообразными серовариантами бактерий рода *Salmonella*, семейства *Enterobacteriaceae* с фекально-оральным механизмом передачи, характеризующаяся разнообразными клиническими проявлениями от бессимптомного носительства до тяжелых септических форм.

Первый представитель рода *Salmonella* был выделен в 1885 году американскими ветеринарами Сальмоном и Смитом.

В настоящее время известно более 2500 сероваров сальмонелл и Международный сальмонеллезный центр регистрирует ежегодно по 10-20 новых сероваров.

Специфическую активную профилактику сальмонеллеза проводят живыми и инактивированными вакцинами. Однако во многих случаях вакцинация оказывается неэффективной и практикующим специалистам приходится прибегать к применению сыворотки и других лечебных средств.

Впервые активную сыворотку против сальмонеллеза получили в 1892 году Е. Roux и А. Yersen.

В 1931 году С.К. Беззубец получил сыворотку против сальмонеллеза телят. Сыворотку против сальмонеллеза овец предложил В.С. Казарян (1935).

Значительный вклад в дело получения гипериммунной сыворотки для профилактики сальмонеллеза поросят и лечения больных внесли С.Т. Щенников (1929), А.Г. Богдановский, Г.Ф. Панкратов, Н.В. Прокопович (1935), Х.С. Горегляд (1935), И.И. Иванов (1955), А.Г. Малявин (1955).

А.Г. Малявин разработал способ получения от волов поливалентной антитоксической сыворотки против сальмонеллеза телят, поросят, ягнят, овец и птиц. Им же, было налажено производство сыворотки на нескольких биофабриках бывшего СССР.

Для гипериммунизации волов ученый предложил использовать антиген с концентрацией 3 млрд. микробных тел в 1 см<sup>3</sup> и готовить его из 16-24 штаммов сальмонелл. Гипериммунизация волов по предложенной схеме включала 19 инъекций антигена с интервалом 4-5 суток и длилась более трех месяцев, что усложняло производство сыворотки и было связано со значительными затратами материальных средств и труда. Поэтому мы провели опытную работу по совершенствованию схемы гипериммунизации волов, предложенной А.Г. Малявиным.

**Материалы и методы исследований.** Эксперименты начали с изучения агглютинирующей и превентивной активности сыворотки крови волов в процессе гипериммунизации их сальмонеллезным антигеном.

В опыте было задействовано 20 волов массой 380-400 кг, которых иммунизировали по схеме, предложенной А.Г. Малявиным. Титр агглютининов в сыворотке крови волов определили путем постановки реакции агглютинации (РА) после 5,7,10,12,15 и 18-ой инъекций антигена. РА ставили классическим пробирочным методом. Исследуемые сыворотки разводили физраствором 1:25, 1:50, 1:100 и т.д. до 1:12800. К каждому разведению сыворотки, взятой в объеме 1 см<sup>3</sup>, добавляли по 2 капли стандартного антигена (концентрация 10 млрд. м.т./ см<sup>3</sup>), смешивали и помещали пробирки в термостат на 16-18 часов. Учет реакции проводили визуально, оценивая образовавшийся агглютинат в крестах.

Превентивную активность сыворотки определяли на морских свинках и голубях. Лабораторным животным сыворотку вводили в дозах: 0,1; 0,02; 0,004; 0,0008 и 0,00016 см<sup>3</sup> – морским свинкам подкожно, голубям – внутримышечно.

На каждую дозу использовали пять животных. Наблюдение за животными вели в течение 10 суток, учитывая павших и выживших. Расчет ИД<sub>50</sub> сыворотки проводили по методу Кербера в модификации Ашмарина.

**Результаты исследований.** Было установлено, что агглютинирующая активность сыворотки крови подопытных волов нарастает до 10-й инъекции антигена. Последующие инъекции антигена в дозах от 250 до 400 см<sup>3</sup> не вели к подъему агглютинирующей активности сыворотки крови волов. Было доказано, что накопление агглютининов для одноименной стадии гипериммунизации в отношении всех четырех типов сальмонелл (*S.*