Литература. *1. Солонеко А.А., Гласкович А.А., Апешкевич В.Н., Тимофеев Ф.Е., Федосова Н.Х. Практикум по общей микробиологии – Минск, «Ураджай».- 2000- 280с. 2. Сидорчук А.А., Воронин Е.С., Глушаков А.А. Общая эпизоотология. – М., «Колосс». – 2005.-176с. 3. Вербицкий А.А., Медведев А.П. Питательные среды и культивирование микроорганизмов.- Витебск, ВГАВМ.- 2008.-238с.*

УДК 619:616.98:579.842.14:615.37:636.2

ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У ВОЛОВ ПРИ ГИПЕРИММУНИЗАЦИИ ИХ СКОНСТРУИРОВАННЫМ САЛЬМОНЕЛЛЁЗНЫМ АНТИГЕНОМ

Медведев А.П., Даровских С.В.
УО «Витебская государственная ордена «Знак Почета» академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь

Иммунологические показатели у волов при гипериммунизации их сальмонеллёзным полиантигеном по экспериментальной схеме свидетельствуют о нарастании иммунного ответа организма до пятой инъекции антигена. Последующие инъекции удлиняют срок гипериммунизации, ведут к неоправданным затратам материальных средств и труда.

Immunobiological properties in oxen immunized with Salmonella antigens indicate an incresead immunity response in the animals up to the 5 injection. The following injections prolong the immunizations period leading to unreasonable material and labor waste.

Введение. Сальмонеллезы – это группа бактериальных болезней, преимущественно молодняка сельскохозяйственных животных, домашних и промысловых животных, характеризующихся при остром течении лихорадкой, явлениями септицемии, токсикоза и поражением кишечника, а при хроническом -- воспалением легких, артритами. У взрослых животных проявляется абортами, а у людей – в виде пищевых токсикоинфекций [1].

Последняя классификация сальмонелл (1997) выделяет два вида: S. bongori содержит менее 10 очень редких сероваров и S. enterica, который в свою очередь содержит все остальные серовары и подразделяется на 6 подвидов. На сегодняшний день насчитывается более 2500 сероваров сальмонелл, которые разделены по антигенному родству на 67 серологических групп.

Отслеживание эпизоотической ситуации, определение этиологической структуры сальмонеллеза является необходимым условием и основанием для конструирования новых и совершенствования применяющихся специфических препаратов для лечения и профилактики болезни [3,5].

Для пассивной специфической профилактики сальмонеллёза и лечения больных животных применяют сыворотку против сальмонеллёза телят, поросят, ягнят, овец и птиц, которую получают путём гипериммунизации волов сальмонеллёзным антигеном, состоящим из следующих сероваринтов сальмонелл: S. dublin, S. choleraesuis, S. typhimurium и S. abortusovis.

Известно, что вирусные и микробные антигены вызывают сложную иммунобиологическую перестройку организма животного. Критерием эффективности гипериммунизации, наряду с высоким уровнем специфических антител, следует считать реакцию организма волов, проявляющуюся изменением относительного числа лейкоцитов, иммуноглобулинов M и G, динамики Т- и В-лимфоцитов в крови животных, определению агглютинирующей активности сыворотки [2,4].

Поэтому целью данной работы явилось изучение эффективности применения модифицированной схемы гипериммунизации волов-продуцентов сконструированным сальмонеллезным полиантигеном в сравнительном аспекте с производственной схемой гипериммунизации.

Материалы и методы. Проведенные нами исследования по изучению этиологической структуры сальмонеллеза крупного рогатого скота и свиней на территории Республики Беларусь показали, что это заболевание наиболее часто вызывается следующими сероваринтами сальмонелл: Salmonella dublin, Salmonella typhimurium, Salmonella enteritidis CB, Salmonella choleraesuis.

С учетом этого при конструировании поливалентного антигена для гипериммунизации волов-продуцентов использовали производственные штаммы сальмонелл S. typhimurium 371, S. dublin 373, S. choleraesuis 370, S. enteritidis CB. Прежде чем использовать штаммы для приготовления антигена, их высевали в мясопептонный бульон, на мясопептонный агар, изучали характер роста сальмонелл на этих средах, чистоту культур, тинкториально-морфологические свойства, антигенную структуру бактерий, используя при этом общепринятые в бактериологической практике методы исследований.

Проверенные культуры, каждую отдельно, засевали в баллоны, содержащие бульон Хоттингера, и культивировали при 37±1^{0}С в течение 10 часов. Параллельно проводили контроль чистоты роста. Затем полученные культуры сальмонелл смешивали в одной емкости в соотношении 1:1 и добавляли формалин (содержание формальдегида не менее 36,6%), выдерживали в термостате 25 суток при 37±1^{0}С с целью инактивации.

Далее провели сорбцию антигена с помощью 4%-ного раствора гидроокиси алюминия в течение 3-х суток при 20^{0}С. После отстоя готовый антиген концентрировал до 10 млрд. микробных клеток путем декантации надосадочной жидкости. Полученный антиген проверяли на стерильность путем посева на МПА, МПБ, среду Китта-Тароцци и агар Сабуро, а также измеряли pH. Для контроля безвредности антиген вводили подкожно 5 белым мышам массой 16-18 г в дозе 0,5 см^3. Проверенный сконструированный полиантиген использовали для гипериммунизации волов.

Для гипериммунизации отбирали только клинически здоровых животных, перед инъекцией антигена продуцентов выдерживали на голодной диете в течение 20 часов. За всеми животными вели ежедневное наблюдение, контролируя их состояние после каждой инъекции.

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

Для проведения опыта использовали 10 волов-продуцентов живой массой 450-500 кг. Животные были подобраны по принципу аналогов и разделены на две группы (n=5). Продуцентам первой группы вводили сконструированный поливалентный антиген по схеме, применяемой на УП «Витебская биофабрика». Второй группе волов сальмонеллезный антиген вводили по экспериментальной схеме. Схемы гипериммунизации волов-продуцентов представлены в таблице.

Таблица – Гипериммунизация волов-продуцентов сальмонеллезным полиантигеном по производственной и экспериментальной схемам

Инъекции	Количество антигена	Состав антигена	Способ введения антигена	Группы животных	
				производственная	экспериментальная
первая	5 см^3	S.typhimurium 371,	подкожный	-	-
			внутрибрюшинный	+	+
вторая	10 см^3	S. dublin 373,	подкожный	-	+
		S. choleraesuis 370,	внутрибрюшинный	+	-
третья	15 см^3	S. enteritidis СВ	подкожный	-	-
			внутрибрюшинный	+	+
четвертая	20 см^3		подкожный	-	+
			внутрибрюшинный	+	-
пятая	25 см^3		подкожный	-	-
			внутрибрюшинный	+	+

Продуцентам полиантиген вводили внутрибрюшинно поочередно с двух сторон туловища в области голодной ямки. Подкожно антиген инъецировали в области средней трети шеи, поочередно слева и права. Интервал между инъекциями составил 5 суток. Место инъекции тщательно выстригали и перед инъекцией обрабатывали 3%-м раствором фенола.

За всеми животными вели ежедневное наблюдение, контролируя их состояние после каждой инъекции. Измерение температуры тела проводили перед и после каждой инъекции антигена. Продолжительность цикла гипериммунизации составила 22 дня, а период исследования – 32 дня.

Кровь у волов брали из яремной вены с целью определения агглютинирующей активности, а также проведения гематологических и биохимических исследований. Взятие крови производили перед началом гипериммунизации, перед каждой инъекцией антигена и через 10 дней после окончания гипериммунизации.

Агглютинирующую активность сыворотки определяли в пробирочной реакции агглютинации (РА). Сыворотку разводили от 1:25, 1:50, 1:100, 1:200 и т.д. до титра. Антигеном служила взвесь живых сальмонелл с содержанием 500 млн. микробных тел в 1см^3. Антиген и сыворотку смешивали по 0,5 см^3. Пробирки встряхивали до получения гомогенной взвеси, выдерживали 12-16 часов в термостате при температуре 37-38^{0}С и 2-3 часа при комнатной температуре.

Реакцию оценивали в плюсах по степени просветления жидкости и выраженности агглютината.

Учёт результатов испытания активности сыворотки проводили в течение десяти дней. Допускали выживание в контроле не более одного животного.

Гематологические исследования с определением количества эритроцитов, лейкоцитов, содержания гемоглобина проводили с помощью гематологического анализатора MEDONIC CA 620.

Выведение лейкограммы проводили путем дифференцированного подсчета лейкоцитов, путем микроскопирования мазков крови, зафиксированных в метиловом спирте и окрашенных азур-эозином по методу Романовского-Гимза. Затем выводили лейкограмму путем подсчета 100 клеток.

Дифференциацию Т-лимфоцитов и В-лимфоцитов проводили на основании величины ядра и характера расположения его в цитоплазме.

Содержание Ig M и Ig G в сыворотке крови определяли турбодиметрическим методом.

Результаты исследования. В результате исследований установлено, что полученный поливалентный сальмонеллезный антиген стерилен, безвреден и может использоваться для гипериммунизации волов-продуцентов.

У продуцентов производственной группы, иммунизированных по производственной схеме, количество эритроцитов увеличивалось на 24,6 %, достигая максимума (7,1 $\pm$ 0,43 х 10^{12}/л) к 17-му дню исследований, достоверно не изменяясь к 32-му. Количество эритроцитов у животных экспериментальной группы на протяжении всего цикла гипериммунизации достоверно не изменялось.

Содержание гемоглобина в крови животных всех групп на протяжении всего периода исследований достоверно не изменялось.

Количество лейкоцитов у волов экспериментальной группы достоверно увеличивалось на 57,3% по сравнению с фоновым показателем, достигая максимума (12,9 $\pm$ 1,02 х 10^9/л) к 17-му дню, а затем к 32-му дню исследования их количество достоверно снижалось на 34,4%. Достоверных изменений абсолютного количества лейкоцитов у животных производственной группы не отмечено.

Большую роль в формировании иммунитета играют Т- и В- лимфоциты, они ответственны за клеточный и гуморальный иммунитет организма животных и человека. В этой связи мы определяли содержание Т- и В-

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ

лимфоцитов в крови волов после каждой инъекции антигена и через 10 дней после гипериммунизации. Т- и В-лимфоциты дифференцировали по морфологическим признакам. Зрелые Т-лимфоциты имели плотное интенсивно окрашенное ядро и едва заметную цитоплазму. В-клетки были значительно крупнее Т-лимфоцитов.

В крови животных всех групп с 17-го по 22-й день исследований мы зафиксировали достоверное увеличение относительного количества В - лимфоцитов: у волов экспериментальной группы — на 42,2%, а у волов производственной – на 32%. В последующем достоверных изменений мы не отмечали.

Относительное количество Т – лимфоцитов в крови продуцентов экспериментальной и производственной групп достоверно снижалось соответственно на 27% и 15,2% к 22-му дню исследований. В дальнейшем достоверных изменений относительного количества Т – лимфоцитов в крови животных обеих групп не обнаружено.

Относительное количество палочкоядерных нейтрофилов в крови волов экспериментальной группы, которые были гипериммунизированны по экспериментальной схеме, достоверно увеличилось на 86,7% к 17-му дню исследований, затем к 32-му дню исследования их количество достоверно снижалось на 47,4%. Достоверных изменений палочкоядерных нейтрофилов у животных производственной группы не обнаружено.

Содержание общего белка в крови продуцентов экспериментальной группы достоверно увеличилось на 25,6%, достигая максимума (83,8 ± 4,10 г/л) к 17-му дню исследований и было больше соответствующего показателя у животных производственной группы на 9,1%. Статистически достоверных изменений содержания общего белка у продуцентов производственной группы не отмечено.

Уровень альбуминов в сыворотке крови животных экспериментальной группы увеличивался на 33,8%, достигая своего максимума (44,3 ± 4,72 г/л) к 17-му дню исследований и был выше соответствующего показателя в производственной группе на 21,8%. К 32-му дню исследований содержание альбуминов в сыворотке крови у животных экспериментальной группы снижалось на 56%. Достоверных изменений данного показателя у продуцентов производственной группы не отмечено.

Уровень Ig G в сыворотке крови животных производственной и экспериментальной группы достоверно увеличивался к 17-му дню исследований на 60,3% и 77,8% соответственно, достоверно не изменяясь к 22-му дню, а затем к 32-му дню снижался на 42,7% и 45,6%.

Содержание Ig M увеличилось на 51,6% у волов экспериментальной группы, достигая своего максимума (4,7 ± 0,60 г/л) к 11-му дню исследований, в последующем снижаясь к 32-му дню исследований на 14,6%. Уровень Ig M у животных производственной группы оставался неизменным до 17-го дня исследований, затем достоверно уменьшаясь к 22-му дню на 36,4%.

Агглютинирующая активность сывороток крови продуцентов экспериментальной и производственной групп увеличивалась, начиная со 2-ой инъекции полиантигена, достигала своего максимального уровня к 4-ой инъекции и в среднем по всем сероварианта увеличивалась на 48,3%. Перед 5-ой инъекцией антигена агглютинирующая активность сывороток крови продуцентов обеих групп достоверно не изменялась. К 10-му дню после завершения гипериммунизации агглютинирующая активность сыворотки крови волов экспериментальной группы в среднем достоверно уменьшалась на 25%. Опытные данные позволяют заключить, что следующие за четвертой инъекции антигена не ведут к повышению активности сыворотки крови волов и неоправданно удлиняют срок гипериммунизации.

Практически равный титр антител в сыворотке волов к сальмонеллам всех четырёх сероваров свидетельствует об отсутствии конкуренции между агглютиногенным действием серологически различающихся сальмонелл, входящих в состав поливалентного формолантигена.

Заключение. Сконструированный поливалентный антиген для гипериммунизации волов-продуцентов содержит в своем составе 1:1 следующие сероварианты сальмонелл: S. typhimurium 371, S. dublin 373, S. choleraesuis 370 и S. enteritidis СВ. Полученный антиген стерилен, безвреден и имеет pH -7,3.

Гипериммунизация волов-продуцентов по экспериментальной схеме проявлялась увеличением количества лейкоцитов на 57,3%, палочкоядерных нейтрофилов — на 86,7%, В-лимфоцитов — на 42,2%, содержания общего белка — на 25,6%, содержания Ig G — на 77,8%, Ig M – на 51,6%. После 5-ой инъекции антигена агглютинирующая активность сыворотки крови снижается в среднем на 25%, содержание Ig G – 54,4%, Ig M – на 14,6%, что свидетельствует о нерациональности введения антигена и является основанием для прекращения цикла гипериммунизации. Иммунобиологическая реакция организма волов-продуцентов, гипериммунизированных по предложенной нами схеме, отличалась от реакции животных, иммунизированных по производственной схеме, увеличением содержания общего белка на 10,1%, содержания альбуминов – на 27,3%, содержания Ig G - на 24,8%, Ig M – на 23,7%. Агглютинирующая активность сыворотки крови в среднем по всем сероварианта выше активности сыворотки, получаемой по производственной схеме на 14%.

Литература. *1. Ахмедов, А.М. Сальмонеллезы молодняка / А.М. Ахмедов //. – Москва, Колос, 1983. - 240 с. 2. Артемов, Б.Т. Совершенствование схемы гипериммунизации животных-доноров / Б.Т. Артемов, Л.И. Ефанова // Актуальные проблемы ветеринарии. Барнаул, 1995 г. - С. 100 - 101. 3. Антонюк, В.П. О повышении качества ветеринарных биологических препа-ратов / В.П. Антонюк, А.Г. Лихачев, Ю.В. Родин // Сборник научных трудов /ВГНКИ. - Москва, 1984. - С.91-94. 4. Бондаренко, В.З. Морфологические и биохимические показатели крови и лимфы крупного рогатого скота в процессе иммуногенеза / В.З. Бондаренко // Бюл. ВИЭВ, 1971, Т. 2. – С. 67-72. 5. Мамедов, Т.А. Изменение общего белка и белковых фракций сыворотки крови овец, вакцинированных против паратифа разными методами, и ягнят, родившихся от них / Т.А. Мамедов // Учён. Зап. Азерб. с.-х. института, 1973/74, Т. 1. – С.119-123.*

РЕПОЗИТОРИЙ УО ВГАВМ