

ким содержанием некоторых аминокислот в жидких питательных средах (аланина, глутаминовой кислоты, серина и др.), которые оказывают ингибирующее действие на формирование полноценной антигенной структуры эшерихий при их росте.

Таким образом, из 36 изолятов энтеропатогенных эшерихий выявлено наличие адгезивного антигена K88 у 8 штаммов, а K99 - у 4-х.

Оптимальными питательными средами для накопления адгезивного антигена K88 и термолабильного токсина являются бульон Хоттингера и МПБ.

Среды Мунделя и Финкельштейна являются малопродуктивными для накопления адгезивного антигена K88 и термолабильного энтеротоксина и непригодными для накопления адгезивного антигена K99.

Литература.1. Зароза В.Г. Энтеротоксигенные инвазивные кишечные палочки, их характеристика и претификация.- Достижения с.-х.науки и практики, 1984, 1,с. 17-28. 2. Тугаринов О.А., Светоч Э.А., Попов Е.И. Разработ-ка методических подходов к изготовлению диагностических агглютинирующих эшерихиозных K88 и K99 сывороток. - Материалы Всесоюзной конференции. - Львов, 1988, с.370-371.

УДК 619:615.371:619.98:579.842.14 С

ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У ВОЛОВ ПРИ ГИПЕРИММУНИЗАЦИИ ИХ САЛЬМОНЕЛЛЁЗНЫМ АНТИГЕНОМ

Медведев А.П., Даровских С.В., Корочкин Р.Б.

УО «Витебская ордена «Знак Почёта» государственная академия ветеринарной медицины», Республика Беларусь

Иммунологические показатели у волов при гипериммунизации их сальмонеллёзным антигеном свидетельствуют о нарастании иммунного ответа организма до десятой – двенадцатой инъекции антигена. Последующие инъекции удлиняют срок гипериммунизации, ведут к неоправданым затратам материальных средств и труда.

Immunobiological properties in oxen immunized with Salmonella antigens indicate an increased immunity response in the animals up to the 10 – 12 th injection. The following injections prolong the immunizations period leading to unreasonable material and labor waste.

Введение. Сальмонеллезы – это группа бактериальных болезней, преимущественно молодняка с/х, домашних и промысловых животных, характеризующиеся при остром течении лихорадкой, явлениями септицемии, токсикоза и поражением кишечника, а при хроническом – воспалением легких, артритами. У взрослых животных проявляется абортми, а у людей – в виде пищевых токсикоинфекций.

Согласно определителю бактерий Берджи (1997) все серовары Salmonella (включая arizonae) относятся к двум видам: Sal.bongori и Sal.choleraesuis, Sal.bongori содержит менее 10 очень редких сероваров. Все остальные 25000 сероваров выделены внутри вида Sal.choleraesuis, который по фенотипическим и генотипическим критериям разделен на 6 подвигов: arizonae, choleraesuis, diarizonae, houtenae, indica, salamae. Все серовары внутри подвида choleraesuis имеют названия, тогда как в других подвидах серовары (за исключением некоторых видов salamae и houtenae) не имеют названий.

Для пассивной специфической профилактики сальмонеллеза и лечения больных животных применяют сыворотку против сальмонеллеза телят, поросят, ягнят, овец и птиц, которую получают путём гипериммунизации волов сальмонеллёзным антигеном.

Известно, что вирусные и микробные антигены вызывают сложную иммунобиологическую перестройку организма животного. Реакцию организма на антигены можно определить с помощью многочисленных тестов, в том числе по изменению белкового состава сыворотки крови, определению агглютинирующей и превентивной активности сыворотки, динамике Т- и В-лимфоцитов в крови животных.

В литературных источниках имеются данные о динамике белковых фракций сыворотки крови животных, вакцинированных против сальмонеллеза [1, 3, 5, 6]. Однако сообщений относительно соотношения белков в сыворотке крови волов в процессе их гипериммунизации поливалентным сальмонеллёзным антигеном мы не обнаружили.

Не меньший практический интерес представляют данные о динамике Т- и В-лимфоцитов в крови волов в процессе гипериммунизации их инактивированным формолантигеном.

Поэтому, целью данной работы явилось изучение динамики белковых фракций, Т- и В-лимфоцитов, агглютинирующей и превентивной активности в сыворотке крови волов в процессе гипериммунизации их сальмонеллёзным антигеном.

Материалы и методы. Для гипериммунизации волов антиген готовили из четырёх штаммов сальмонелл: Sal. choleraesuis, Sal. dublin, Sal. typhimurium и Sal. abortusovis. Прежде, чем использовать штаммы для приготовления антигена, их высевали в мясоептонный бульон, на мясоептонный агар, изучали характер роста сальмонелл на этих средах, чистоту культур, тинкториально-морфологические свойства, антигенную структуру бактерий, используя при этом общепринятые в бактериологической практике методы исследования.

Культуру каждого серотипа сальмонелл выращивали в отдельном реакторе в течение 10-14 часов при 37-38⁰С, рН 7,4-7,8 с соблюдением условий аэрации и непрерывного перемешивания питательной среды, Концентрацию микробных тел, рН и чистоту культуры определяли через каждые два часа культивирования.

При повышении pH добавляли стерильный 40% раствор глюкозы (0,1- 0,2% содержания в среде). Выращенные культуры после определения чистоты, pH и концентрации бакмассы, разбавляли физиологическим раствором до концентрации 3 млрд.м.т./см³ смешивали в равных соотношениях, добавляли формалин до 0,2% концентрации и выдерживали 16-20 суток при 37-38 °С. В процессе инактивации культуру дважды перемешивали – в первые и последующие сутки.

С целью проверки чистоты антигена микроскопировали мазки, стерильности – высевали на МПА, МПБ, МППБ под вазелиновым маслом, среду Сабуро. Стерильный антиген контролировали на безвредность. Для этого 10 белым мышам массой 16-18 г вводили внутрибрюшинно по 0,5 см³ антигена и наблюдали за ними. Антиген считали безвредным, если в течение 10 суток мыши оставались клинически здоровыми.

Валов гипериммунизировали в соответствии с действующей инструкцией по изготовлению и контролю антитоксической поливалентной сыворотки против сальмонеллёза телят, поросят, ягнят, овец и птиц [4]. До инъекции антигена и после 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 и 16 инъекций у волов брали кровь из яремной вены. Содержание белковых фракций в сыворотке крови определяли методом электрофореза на бумаге [2].

Для определения Т- и В-лимфоцитов использовали реакцию розеткообразования, а также проводили их морфологическую дифференциацию.

Гипериммунизацию волов подразделяют на два периода: период, в течение которого более двух месяцев вводят антиген без кровопусканий, и период эксплуатации, когда у волов два раза в месяц берут кровь и после каждого очередного крововзятия дважды вводят антиген. В связи с этим исследовали динамику белковых фракций крови волов в оба периода.

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 1см³. Использовали также для постановки РА антигены биофабричного производства. Антиген и сыворотку смешивали по 0,5 см³. Пробирки встряхивали до получения гомогенной взвеси, выдерживали 12-16 часов в термостате при температуре 37-38°Си 2-3 часа при комнатной температуре.

Реакцию оценивали в плюсах по степени просветления жидкости и выраженности агглютината. Титр агглютинатов в сыворотке крови волов определяли в трёх повторениях после 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16-ой инъекции антигена волам.

Превентивную активность сыворотки определяли в отношении *Sal. choleraesuis* на голубях, *Sal. dublin*, *Sal. typhimurium* и *Sal. abortusovis* - на белых мышах массой 18-20 г. Сыворотку голубям вводили внутримышечно в дозах 0,5; 0,1; 0,025; 0,004 и 0,0008 см³, используя на дозу не менее пяти особей. Белым мышам сыворотку вводили подкожно в дозах: 0,5; 0,1; 0,025; 0,004; 0,008 и 0,00016см³, используя на дозу 5-10 мышек. Заражение мышей проводили внутрибрюшинно, голубей – внутримышечно, через 2-3 часа после введения сыворотки 3-5 ЛД₅₀ сальмонелл определённого серотипа. Контролем служили животные не получавшие сыворотку, которых заражали одновременно с пассивно иммунизированными.

Учёт результатов испытания активности сыворотки проводили в течение семи дней после гибели контрольных животных. Допускали выживание в контроле не более одного-двух животных.

Величину 50%-ной иммунизирующей дозы сыворотки для лабораторных животных рассчитывали по методу Кербера и Ашмарина.

Результаты исследования. Среднеарифметические данные по белковому составу сыворотки крови приведены в таблицах 1 и 2. Динамика белков в крови волов в процессе их гипериммунизации сальмонеллёзным антигеном (табл. 1), свидетельствует о том, что после очередных инъекций антигена количество альбуминов в сыворотке крови волов снижается, а содержание гамма-глобулинов значительно повышается. Нарастание последних и снижение альбуминов наблюдали до двенадцатой инъекции антигена. Повышение содержания глобулинов обусловлено интенсификацией протеиновых клеток иммунной системы животного под влиянием антигена.

Таблица 1 - Динамика белков в крови волов в процессе их гипериммунизации сальмонеллёзным антигеном

Белковые фракции	до инъекции антигена	Их соотношение					
		после введения					
		5-го	7-го	10-го	12-го	16-го	18-го
Альбумин	38,2±2,6	27,0±0,9	23,0±2,0	19,0±1,7	18,0±1,0	18,01±1,8	18,6±1,4
α-глобулин	5,7±0,9	8,2±0,7	10,2±2,4	8,7±1,5	9,0±1,3	8,6±0,9	9,1±1,2
β-глобулин	26,7±2,4	30,2±1,4	29,6±1,2	30,9±1,0	29,1±1,8	30,6±2,4	30,3±1,7
γ-глобулин	29,2±2,2	34,6±1,4	37,0±5,1	41,4±2,2	43,8±2,8	42,7±2,9	42,0±3,1

Содержание фракций белка в крови волов в период эксплуатации не изменялось (табл. 2).

Таблица 2 – Содержание фракций белка в крови волов в период эксплуатации (%)

Белковые фракции	Взятие крови								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Альбумин	26,1±1,7	21,4±2,3	25,2±2,3	26,0±2,3	28,6±1,4	26,6±1,4	21,0±1,4	26,1±1,8	29,0±1,4
α-глобулин	5,6±0,4	7,8±0,9	7,2±0,7	9,3±2,6	7,4±0,9	7,1±0,5	7,4±0,9	8,2±0,8	10,7±0,7
β-глобулин	25,2±1,4	23,4±0,9	20,2±1,2	20,1±1,5	20,2±1,2	21,8±1,5	23,0±1,5	23,5±1,3	23,3±1,5
γ-глобулин	42,9±2,0	47,2±3,2	47,2±2,3	28,6±2,4	42,6±1,0	44,4±2,2	46,8±2,1	42,0±2,2	36,9±2,0

Результаты исследований агглютинирующей активности сыворотки крови волов в процессе гипериммунизации представлены в таблице 3, а превентивной в таблице 4.

Таблица 3 – Агглютинирующая активность сыворотки крови волов в процессе гипериммунизации

№№ инъекций	Дни инъекций	Доза антигена (см ³)	Титр агглютининов в ПА к сальмонеллам			
			Sal. choleraesuis	Sal. dublin	Sal. typhimurium	Sal. abortusovis
2	4-й	17	133±42	133±42	136±42	153±41
4	14-й	35	266±34	233±84	330±84	333±84
6	22-й	50	533±84	466±183	600±168	533±84
8	31-й	70	1066±336	856±330	933±336	933±330
10	40-й	85	933±504	866±338	1066±336	1323±336
12	50-й	120	1066±336	1066±334	1066±326	1066±332
14	60-й	200	1066±330	995±224	1066±320	998±330
16	70-й	350	991±332	1020±236	998±321	1012±336

Как свидетельствуют даны таблицы, агглютинирующая активность сыворотки подопытных волов нарастает до двенадцатой инъекции. Последующие инъекции антигена не ведут к существенному подъему агглютинирующей активности сыворотки крови волов.

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

Данные таблицы показывают, что активность сыворотки в отношении всех сероваров сальмонелл после равного числа инъекций существенно не различаются. Так, после двух инъекций антигена ИД₅₀ сыворотки крови волов составила в отношении Sal. choleraesuis - 0,181±0,01 см³, Sal. dublin - 0,162±0,01 см³, Sal. typhimurium - 0,162±0,02 см³, Sal. abortusovis - 0,169±0,02 см³.

При оценке достоверности этих величин уровень значимости P>0,05, следовательно совместное введение различных по антигенной структуре сальмонелл в организме животных вызывает равную по степени интенсивности реакцию на каждый серовар.

Превентивная активность сыворотки крови волов для голубей и белых мышей нарастает по мере по мере увеличения количества инъекций и дозы антигена. Например, после 2-й инъекции ИД₅₀ для мышей в отношении Sal. dublin составила 0,162±0,01 см³, после 4-ой - 0,164±0,02 см³, 6-ой - 0,017±0,01 см³, 8-ой - 0,008±0,02 см³, 10-ой - 0,006±0,01 см³, 12-ой - 0,006±0,01 см³, 14-ой - 0,007±0,02 см³, 16-ой - 0,008±0,02 см³, т.е. нарастание уровня превентивной активности наблюдается до десятой инъекции антигена.

Такая же закономерность установлена в отношении Sal. choleraesuis, Sal. typhimurium, Sal. abortusovis. Опытные данные позволяют заключить, что следующие за десятой инъекции антигена не ведут к повышению активности сыворотки крови волов и неоправданно удлиняют срок гипериммунизации.

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-лимфоцитов в крови волов после каждой инъекции антигена. 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. Кроме этого, использовали метод спонтанного розеткообразования с эритроцитами барана.

Таблица 4 - Превентивная активность сыворотки крови волов для лабораторных животных

№№ инъекций	Доза антигена (см ³)	ИД ₅₀ (см ³) сыворотки для:			
		Голубей	белых мышей		
			Sal. choleraesuis	Sal. dublin	Sal. typhimurium
2	17	0,181±0,01	0,162±0,01	0,162±0,02	0,169±0,02
4	35	0,162±0,02	0,164±0,02	0,167±0,001	0,171±0,01
6	50	0,042±0,01	0,017±0,01	0,021±0,02	0,017±0,02
8	70	0,027±0,03	0,008±0,02	0,008±0,01	0,009±0,01
10	85	0,006±0,1	0,006±0,01	0,006±0,01	0,007±0,02
12	120	0,007±0,01	0,006±0,01	0,007±0,02	0,007±0,01
14	200	0,008±0,02	0,007±0,02	0,007±0,01	0,008±0,02
16	350	0,007±0,02	0,008±0,02	0,008±0,01	0,008±0,01

Количество Т-лимфоцитов в крови волов в процессе гипериммунизации колебалось в пределах 47,1±3,2 – 50±2,1 %, а В-лимфоцитов постепенно нарастало до двенадцатой инъекции антигена. Так, после первой инъекции в крови волов было 18,2±2,1 % В-лимфоцитов, четвертой – 25,8±3,1 %, восьмой - 28,2±1,4 %, двенадцатой 30,1±2,1 %.

В период эксплуатации Т-лимфоцитов оставалось 48,1±1,2 – 49,2±2,1 %, а В-лимфоцитов – 25,5±2,1 – 29,4±2,3 %.

Содержание Т- и В-лимфоцитов в крови волов в процессе гипериммунизации их сальмонеллёзным антигеном отражают данные таблицы 5.

Таблица 5 – Содержание Т- и В-лимфоцитов в крови волов в процессе гипериммунизации

Инъекции	Доза антигена (см ³)	Дни инъекций	Т-клетки, %	В-клетки, %
До инъекции антигена			34	19
1	8	1	39	21
2	17	4	40	21
3	25	9	38	25
4	35	14	34	26
5	40	18	31	30
6	50	22	29	31
7	60	25	36	32
8	70	31	35	34
9	75	31	35	34
10	85	40	41	36
11	95	45	38	29
12	120	50	37	27
13	200	55	36	28
14	350	60	37	29
15	400	65	38	27
16	-	70	36	27

Материал таблицы 5 позволяет отметить, что строгой закономерности нарастания Т-клеток в крови гипериммунизированных волов в процессе введения антигена не наблюдается. Однако, можно видеть, что количество Т-клеток после первых двух и десятой инъекций значительно увеличивается. Содержание В-клеток постепенно нарастает от инъекции к инъекции антигена и достигает максимальной величины после десятой инъекции.

Выводы. Многократная гипериммунизация волов сальмонеллёзным антигеном приводит к значительному изменению состава сыворотки крови этих животных. При этом количество альбуминов снижается, а содержание гамма-глобулинов резко возрастает после каждой из двенадцати инъекций антигенов и почти не изменяется в дальнейшем.

Динамика Т-лимфоцитов в крови волов-продуцентов значительно не изменяется, количество же В-лимфоцитов постепенно увеличивается после первого, четвёртого восьмого и двенадцатого введения антигена и составляет соответственно 18,2±1,4, 25,8±3,1, 28,8±1,4 и 30,1±2,1 %.

В период интенсивной эксплуатации животных (взятие крови в больших количествах) изменение содержания Т- и В-лимфоцитов было незначительным.

В крови гипериммунизированных волов наибольшее количество Т-лимфоцитов регистрируется после второй и десятой инъекции антигена, а количество В-лимфоцитов закономерно нарастает по мере увеличения дозы антигена и достигает максимального значения после десятикратного введения его.

Агглютинирующая активность сыворотки крови волов в процессе гипериммунизации нарастает после двенадцатой, а превентивная – после десятой инъекции антигена.

Литература: 1. Ахмедов, А.М. Исследование белков сыворотки крови овец и ягнят в динамике паратифозного процесса / А.М. Ахмедов, П.Б.Бабаев // Труды Узбек. НИИ ветеринарии, 1964, Т.16. – С. 19-24. 2. Бабич, М.А. Физико-химические методы контроля ингредиентов, питательных сред и биопрепаратов / М.А. Бабич // Москва, 1970. – 201 с. 3. Бондаренко, В.З. Морфологические и биохимические показатели крови и лимфы крупного рогатого скота в процессе иммуногенеза / В.З. Бондаренко // Бюл. ВИ-ЭВ, 1971, Т. 2. – С. 67-72. 4. Инструкция по изготовлению и контролю поливалентной антитоксической сыворотки против паратифа телят, поросят, ягнят, овец и птицы. 5. Конев, И.М. Белковые фракции сыворотки крови у поросят после вакцинации против паратифа / И.М. Конев // Ветеринария, 1965, №4. – С. 21-23. 6. 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 // Учен. Зап. Азерб. с.-х. института, 1973/74, Т. 1. – С.119-123.

УДК 619:616.98:578.822.2:636.4

ФОРМИРОВАНИЕ СПЕЦИФИЧЕСКОГО ИММУНИТЕТА У СВИНЕЙ РАЗНЫХ ПОЛОВОЗРАСТНЫХ ГРУПП ПРИВИТЫХ БИВАЛЕНТНОЙ ЭМУЛЬСИОННОЙ ВАКЦИНОЙ ПРОТИВ ПАРВОВИРУСНОЙ БОЛЕЗНИ СВИНЕЙ И РЕПРОДУКТИВНО РЕСПИРАТОРНОГО СИНДРОМА СВИНЕЙ

Поляков О.Н., Иванова Т.П., Храмцова Н.В., Купреева Н.В., Козун М.

УО «Витебская Ордена «Знак Почёта» государственная академия ветеринарной медицины», Республика Беларусь

Научная работа посвящена исследованию специфического иммунитета против парвовирусной инфекции свиней при вакцинации эмульсионной бивалентной инактивированной вакциной против пар-