

На 21-й день после вакцинации иммуноморфологические реакции в селезенке утят 1-ой группы характеризовались достоверным увеличением на 29% числа плазмочитов ( $P < 0,05$ ) по сравнению с интактной птицей.

При этом существенных различий в морфологическом составе иммунокомпетентных клеток во 2-ой и 3-й группах в эти сроки исследований не выявлено.

Заключение. Парентеральная иммунизация утят против вирусного гепатита жидкой вирус-вакциной из шт. "КМИЭВ-16" (БелНИИЭВ) совместно с иммуностимулятором натрия тиосульфатом (7%-ный раствор) обеспечивает, по сравнению с применением одной вакцины, более интенсивное развитие плазмочитарной реакции в селезенке и цекальных миндалинах, что свидетельствует о формировании более напряженного иммунитета против данной болезни.

УДК 619:579.843.95:579.842.14:615.371

### **ИНАКТИВАЦИЯ ПАСТЕРЕЛЛ И САЛЬМОНЕЛЛ ДИМЕРОМ ЭТИЛЕНИМИНА**

ПРУНТОВА О.В., РУСАЛЕЕВ В.С., ГНЕВАШЕВ В.М., КОЛОТИЛОВА Т.Г., ПОТЕХИН А.В.

Всероссийский НИИ защиты животных, г. Владимир

Инактивация является важным этапом в производстве убитых вакцин. Известный способ инактивации пастерелл и сальмонелл с помощью формальдегида имеет ряд недостатков: длительный режим инактивации, повреждающее действие инактиванта на антигенные структуры клеток микроорганизмов. Использование в качестве инактиванта димера этиленимина (ДЭИ) позволяет сократить срок инактивации и сохранить антигенные структуры бактерий (Bauer K. et al., 1974).

Целью нашей работы было определение констант скорости инактивации пастерелл и сальмонелл димером этиленимина, изыскание оптимальной схемы и методики инактивации пастерелл и сальмонелл и оценка иммуногенной активности инактивированных антигенов.

#### **Материалы и методы.**

Для получения инактивированных антигенов использовали суспензии пастерелл и сальмонелл (*Pasteurella multocida* (серотип В), штамм №656, *Pasteurella multocida* (серотип А) штамм №115, *Pasteurella multocida* (серотип D) штамм №9, *S. choleraesuis* штамм №370, *S. typhimurium* штамм №371, *S. dublin* штамм №373, полученные из ВГНКИ) с концентрацией  $2-4 \times 10^{10}$  КОЕ/см<sup>3</sup>, выращенных в аппаратах АК-210.

Инактивацию осуществляли при температуре 37°C, в режиме постоянного перемешивания (30-40 об/мин) и рН 7.4-7.6.

Концентрацию микробных клеток определяли при помощи стандарта мутности ГИСК им. Тарасевича и методом титрования на чашках Петри с мясо-пептонным агаром (МПА), результаты которого выражали в КОЕ/см<sup>3</sup>.

Иммуногенную активность инактивированных антигенов с неполным адьювантом Фрейнда (фирма Sigma) оценивали по величине иммунизирующей 50% дозы (ИмД<sub>50</sub>) на белых мышах массой 18-20 г (для пастереллезных антигенов) и морских свинок (для сальмонеллезных антигенов) массой 350-400г. Мышей иммунизировали подкожно, а морских свинок - внутримышечно.

#### Результаты и обсуждение.

Для инактивации пастерелл использовали ДЭИ с конечной концентрацией 1% по активному веществу, а для сальмонелл - с конечной концентрацией 3% по активному веществу. Эти концентрации были подобраны по результатам предварительных опытов. Эффективность инактивации определяли через каждый час путем титрования отбираемых проб на чашках Петри с МПА.

На основании полученных данных были построены графики зависимости логарифма числа выживших клеток (P) от времени воздействия инактиванта. Константу скорости инактивации (k) определяли по формуле экспоненты:

$$\lg P = \lg P_0 \cdot e^{-kt}, \quad (1)$$

где P - количество выживших микроорганизмов после воздействия испытываемой концентрации инактиванта (КОЕ/см<sup>3</sup>);

P<sub>0</sub> - количество микроорганизмов до инактивации (КОЕ/см<sup>3</sup>);

e - основание натуральных логарифмов;

k - константа скорости инактивации;

t - время инактивации (час).

Откуда:

$$k = 2.3/t \times \lg(P_0/P), \quad (2)$$

Константы скорости инактивации (k) использованных в работе штаммов бактерий представлены в таблице.

#### Константы скорости инактивации димером этиленмина различных штаммов пастерелл и сальмонелл

№	Штаммы бактерий	Константа скорости инактивации
1	<i>P. multocida</i> шт. №115 (серовар А)	-6.37 ч <sup>-1</sup>
2	<i>P. multocida</i> шт. №656 (серовар В)	-6.35 ч <sup>-1</sup>
3	<i>P. multocida</i> шт. №9 (серовар Д)	-6.42 ч <sup>-1</sup>
4	<i>S. choleraesuis</i> шт. №370	-6.29 ч <sup>-1</sup>
5	<i>S. dublin</i> шт. №373	-3.63 ч <sup>-1</sup>
6	<i>S. typhimurium</i> шт. №371	-2.84 ч <sup>-1</sup>

ИмД<sub>50</sub> испытываемых пастереллезных антигенов по серотипам А, В и Д составила 55 млн м.к. для каждого.

ИмД<sub>50</sub> для морских свинок иммунизированных сальмонеллезными антигенами составила: для *S. choleraesuis* штамм №370 - 42 млн м.к., *S. dublin* штамм №373 - 59 млн м.к. и *S. typhimurium* штамм №371 - 38 млн м.к.

Представленные результаты свидетельствуют о том, что бактерии трех штаммов *Pasteurella multocida* инактивируются ДЭИ с одинаковой скоростью, в то время как из трех штаммов сальмонелл *S. typhimurium* штамм №371 более устойчив к воздействию ДЭИ, чем *S. choleraesuis* и *S. dublin*. После инактивации ДЭИ как пастереллезные, так и сальмонеллезные антигены сохраняют иммуногенные свойства.

УДК 619:579.842.14:615.371

## ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ ПАСТЕРЕЛЛЕЗНЫХ АНТИГЕНОВ В ИФА

ПРУНТОВА О.В., РУСАЛКЕЕВ В.С., ГНЕВАШЕВ В.М., КОЛОТИЛОВА Т.Г., ПОТЕХИН А.В., ШАДРОВА Н.Б.

Всероссийский НИИ защиты животных, г. Владимир

В последние годы наряду с широко используемым инактивантом формалином при изготовлении инактивированных противобактериальных вакцин применяют димер этилен имина (ДЭИ) (Bahnmann H. G., 1990).

Целью данной работы была оценка активности пастереллезных (капсульных и соматических) антигенов, а также цельных клеток пастерелл, инактивированных димером этиленимина и формалином в иммуноферментном анализе (ИФА).

Материалы и методы. В работе использовали бактерии *Pasteurella multocida* штамм №115 (серотип А), полученный из ВГНКИ. Для выращивания бактерий использовали мясо-пептонный бульон (МПБ) и мясо-пептонный агар с добавлением 3-5% цельной крови барана (кровяной агар). Для получения антигенов использовали бактериальную суспензию с концентрацией 24 млрд м.к.

Капсульный, соматический антигены *P. multocida* и гипериммунные сыворотки к ним получали по традиционным методикам (Carter G.R., 1970; Iordache A., Ungureanu C., 1980)

Антигенную активность определяли в непрямом твердофазном варианте иммуноферментного анализа (ИФА) со специфическими компонентами, полученными во ВНИИЗЖ. В качестве детекторных антител были использованы антивидовые иммуноферментные конъюгаты, выпускаемые в НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи.

Учет результатов проводили инструментально при длине волны 492 нм.

Результаты исследований и обсуждение. Полистироловые 96-луночные планшеты (фирма NUNC) для ИФА сенсibilизировали препаратами капсульного (КАГ), соматического (ОАГ) антигенов *P. multocida* штамм №115, а также суспензией бактериальных клеток инактивированных 0.5% и 1% ДЭИ, 1% формалина и нативной культурой *P. multocida*. Бактериальные суспензии использовали в концентрации 2.4 млрд м.к./см<sup>3</sup>. В результате проведенной работы было установлено (Таблица), что самая высокая активность капсульного антигена *P. multocida* штамм №115 в ИФА