

# КОНСТРУИРОВАНИЕ АНТИГЕНА ДЛЯ ГИПЕРИММУНИЗАЦИИ ПРОДУЦЕНТОВ ПОЛИВАЛЕНТНОЙ СЫВОРОТКИ ПРОТИВ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА И ПАСТЕРЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

*Медведев А.П., Кошнерова Л.А.*

*УО "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины",*

*г. Витебск, Республика Беларусь*

Нами выращены культуры *S. dublin* 373, *S. typhimurium* 371, *P. multocida* 798, 5264, которые по биологическим свойствам соответствовали паспортным данным. Из этих культур был получен инактивированный антиген, пригодный для гипериммунизации волов – продуцентов сыворотки против сальмонеллеза и пастереллеза крупного рогатого скота.

История гипериммунизации поливалентными ассоциированными препаратами начинается с работ французских исследователей Widal и Sicart, которые в 1897 году впервые установили возможность одновременной вакцинации людей смесью вакцин против брюшного тифа и холеры. Затем A.Castelani (1902) сообщает об успешном применении ассоциированной вакцины против брюшного тифа, сальмонеллеза и дизентерии.

T.Kabeshima (1914) в опытах на морских свинках доказал, что иммунитет против брюшного тифа и сальмонеллеза А и В формируется в одинаковой степени как при отдельной, так и при ассоциированной вакцинации.

Практическое значение вакцинация поливалентными препаратами приобретает с 20-х годов XX века, когда Ramon и Zoeller определили значимость ассоциированной вакцинации против тифозно-паратифозных инфекций и столбняка.

В настоящее время для активной иммунопрофилактики инфекционных болезней животных предложены и внедрены в практику многочисленные ассоциированные вакцины из бактериальных и вирусных антигенов.

Для серопрофилактики и серотерапии предложены поливалентные гипериммунные сыворотки против анаэробной дизентерии ягнят и инфекционной энтеротоксемии овец, сальмонеллеза и колибактериоза сельскохозяйственных животных, сальмонеллеза, колибактериоза и пастереллеза телят и др.

В отношении учения об ассоциированных вакцинах отмечены некоторые принципы подбора составных компонентов таких препаратов, хотя и нет достаточно полного объяснения положительных результатов иммунизации, наблюдаемых иногда конкурентных, а также синергентных взаимоотношений между антигенами.

При разработке поливалентных гипериммунных сывороток необходимо учитывать определенные принципы конструирования антигенов, предназначенных для гипериммунизации животных – продуцентов этих препаратов. По нашему мнению, при составлении ассоциированного антигена исследователи должны руководствоваться следующими принципами.

Ассоциированный антиген должен состоять из набора моноантигенов, диктуемых практической необходимостью, и в меру уровня теоретических знаний быть обоснованным. Ассоциация антигенов должна быть сбалансирована таким образом, чтобы не было взаимоугнетающего влияния на выработку иммуноглобулинов, а, напротив, поливалентная сыворотка, полученная от продуцентов, гипериммунизированных ассоциированным антигеном, превосходила бы по активности сыворотки, полученные от продуцентов, иммунизированных моноантигенами.

Для конструирования ассоциированного антигена могут быть использованы моновакцины, отвечающие по качеству требованиям нормативно-технической документации на эти вакцины. Форма ассоциированного антигена, предназначенного для иммунизации продуцентов сывороток, должна быть жидкой и обеспечивать максимальный иммунный ответ при самом приемлемом способе введения в организм продуцента.

При конструировании ассоциированного антигена, прежде чем задействовать препарат для гипериммунизации продуцентов поливалентной сыворотки, необходимо знать уровень иммуногенной активности поливалентного антигена для лабораторных животных в целом и компонентов, входящих в его состав. При этом важное значение имеет выбор экспериментального лабораторного животного и иммунологических тестов, позволяющих объективно оценивать иммуногенность ассоциированного антигена.

Схема гипериммунизации волов – продуцентов поливалентной сыворотки должна разрабатываться с учетом максимальной выработки антител организмом животного ко всем компонентам поливалентного антигена. При составлении ассоциированного антигена необходимо учитывать его целевое назначение, физико-химические и биологические особенности отдельных моноантигенов.

Окончательную оценку эффективности ассоциированного антигена можно дать только при изучении иммунного ответа на его введение в организм продуцентов поливалентной сыворотки.

Учитывая отмеченные выше принципы конструирования ассоциированных антигенов, мы составили поливалентный антиген из инaktivированных культур сальмонелл и пастерелл для гипериммуниза-

ции волов – продуцентов сыворотки против сальмонеллеза и пастереллеза крупного рогатого скота. Получение такой сыворотки предопределено эпизоотической ситуацией, сложившейся в животноводстве Республики Беларусь, т.е. по широте распространения и частоте регистрации случаев сальмонеллез занимает второе место после эшерихиоза (колибактериоза), а пастереллез – третье. К тому же необходимо отметить, что сальмонеллез и пастереллез во многих случаях протекают одновременно в виде смешанной инфекции.

Для получения культур сальмонелл использовали производственные штаммы *S. dublin* 373, *S. typhimurium* 371, а пастерелл – *P. multocida* за №№ 798, 5264. В качестве питательной среды для выращивания производственных штаммов бактерий применяли бульон Хоттингера со значением pH 7,2–7,6 и содержанием аминного азота 280–300 мг%. Культивирование сальмонелл и пастерелл проводили во флаконах с бульоном при постоянном перемешивании с помощью шуттель-аппаратов. Бактерии выращивали в условиях термостата при температуре 37 °С. Культуру сальмонелл культивировали в течение 20 часов, пастерелл – 48 часов. В процессе роста контролировали pH растущей культуры и концентрацию микробной массы с помощью стандарта мутности ГИСК им. Тарасевича. Выращенные культуры проверяли на чистоту путем микроскопии препаратов-мазков, окрашенных по Граму. Определяли концентрацию микробных клеток, культуральные и биохимические свойства, видовую принадлежность, используя при этом общепринятые в микробиологической практике методы.

Выращенные сальмонеллы представляли собой неподвижные, грамтрицательные палочки без спор и капсул. В поле зрения микроскопа располагались одиночно, парно. При росте в мясопептонном бульоне бактерии вызывали его равномерное помутнение с образованием легко разбивающегося осадка. На мясопептонном агаре бактерии формировали круглые, с ровными краями, выпуклые колонии с блестящей поверхностью серо-белого цвета, размером от 2 до 3 мм в диаметре. На висмут-сульфитном агаре колонии были такого же размера, но черного цвета с металлическим оттенком. На средах Эндо и Плоскирева сальмонеллы формировали бесцветные колонии с ровными краями. При посеве на среды Гисса с углеводами было установлено, что сальмонеллы ферментировали с образованием кислоты и газа глюкозу, маннит, дульцит и не изменяли лактозу, сахарозу, раффинозу. Бактерии не свертывали молоко, не редуцировали метиленовую синьку в молоке, не образовывали индол.

Пастереллы при микроскопии препаратов-мазков из выращенных культур представляли собой неподвижные, грамтрицательные, очень мелкие овоидные палочки. В МПБ через двое суток культивирования вызывали легкое помутнение среды с образованием незначительного слизистого осадка, который при встряхивании пробирки поднимался в виде характерной "косички". На МПА пастереллы росли в виде мелких росинчатых голубовато-прозрачных колоний с гладкой

поверхностью и ровными краями и ферментировали с образованием кислоты глюкозу, сахарозу, маннит, сорбит, не расщепляли лактозу и дульцит, не разжижали желатину, не вызывали гемолиза на кровяном агаре, образовывали индол, давали положительную пробу на каталазу.

Нам удалось с помощью шуттель-аппаратов вырастить культуры сальмонелл с концентрацией 4 млрд. микробных тел в 1 см<sup>3</sup> среды, а пастерелл – 2 млрд/см<sup>3</sup>. Выращенные культуры сальмонелл и пастерелл подвергали инаktivации. Для инаktivации допускали формалин с содержанием не ниже 36% формальдегида. К культурам сальмонелл добавляли 0,3% формальдегида, а к культурам пастерелл – 0,1 % вещества. Инаktivацию культур сальмонелл проводили в течение 20 суток, а культур пастерелл – 7 суток. В процессе инаktivации культуры перемешивали 2–4 раза в сутки в течение не менее 5 минут.

Полноту инаktivации бактерий определяли путем посева культур на питательные среды (МПА, МПБ, МППБ под вазелиновым маслом) и выдерживанием их в термостате при 37–38 °С в течение двух суток с последующим пересевом во флаконы с МПБ и МППБ под вазелиновым маслом. Результаты первичных посевов и пересевов учитывали соответственно через 10 и 8 суток. При отсутствии видимого роста микроорганизмов культуры считали полностью инаktivированными. Полноту инаktivации токсинов проверяли на 5 белых мышах массой 18–20 г путем внутрибрюшинного введения 0,3 см<sup>3</sup> инаktivированной культуры. Токсины считали полностью инаktivированными при выживании всех мышек в течение 3 суток наблюдения.

Затем для изучения ассоциированного антигена инаktivированные культуры сальмонелл и пастерелл смешивали в соотношении 1:1, 1:2, 1:3 соответственно. К составленному в данных соотношениях антигену добавили хлористый кальций в виде 10%-го раствора, простерилизованного в течение 1 часа при 118–120 °С из расчета 10 см<sup>3</sup> раствора на 1 литр антигена. После этого антиген, приготовленный в разных соотношениях культур сальмонелл и пастерелл, проверяли на иммуногенную активность для белых мышей и голубей. Белые мыши были взяты в опыт как высокочувствительные животные к сальмонеллам, а голуби – к пастереллам. Белым мышам массой 18–20 г антиген вводили подкожно дважды в дозах 0,2 см<sup>3</sup> и 0,3 см<sup>3</sup> с интервалом в 7–10 дней. Голубям антиген вводили с тем же интервалом, внутримышечно, также дважды, в дозах 1 см<sup>3</sup> и 3 см<sup>3</sup>.

На каждый штамм сальмонелл, входящий в состав антигена, брали в опыт не менее 10 мышек, а на каждый штамм пастерелл – не менее 10 голубей. Иммунизированных мышек и голубей спустя 18–20 дней после повторного введения антигена заражали патогенными культурами *S. dublin*, *S. thyphimurium* и *P. multocida* в дозе 2–3 ЛД<sub>50</sub>. Одновременно с иммунизированными заражали такое же количество интактных лабораторных животных, которые служили в качестве контрольных.

Антиген считали иммуногенным при выживании не менее 8 иммунизированных мышек и 8 голубей при гибели 8–10 контрольных животных.

В результате опытов установлено следующее. В отношении *S. dublin* штамм 373 из 10 иммунизированных выжили 8 мышей при гибели всех контрольных животных, а в отношении *S. thyphimurium* штамм 371 остались живыми и здоровыми 9 мышек из 10 особей, получивших антиген, при гибели 9 интактных мышек.

В отношении *P. multocida* штамм 798 из 10 иммунизированных голубей выжили 9 голубей при гибели 10 контрольных, а в отношении *P. multocida* штамм 5264 не погибли 8 голубей из 10 иммунизированных и пали 9 контрольных.

Представленные результаты получены относительно поливалентного антигена, состоящего из одной части сальмонеллезного и двух частей пастереллезного компонентов. Данные испытания на активность антигена из культур сальмонелл и пастерелл, составленного в соотношении 1:1 и 1:3, мы не проводим в связи с получением менее удовлетворительных результатов.

Проведенная опытная работа позволяет заключить, что нами сконструирован поливалентный антиген, пригодный для получения от волов-продуцентов гипериммунной сыворотки против сальмонеллеза и пастереллеза.

#### SUMMARY

**We have grown cultures *S. dublin* 373, *S. thyphimurium* 371, *P. multocida* 798, 5264, which by biological property corresponding to facts of passport. From these cultures was received inactivated polyvalent antigen, suitable for hyperimmunization of ox-producers of serum from salmonellosis and pasterellosis of cattle.**