

УДК 619:616.98:579.842.14:615.371

Локтева О.Н., врач ветеринарной медицины\*\*

Синица Н.В., кандидат ветеринарных наук, доцент\*\*\*

Ломако Ю.В., кандидат ветеринарных наук\*

Гусев А.А., доктор ветеринарных наук, профессор\*

\* РУП «Институт экспериментальной ветеринарии имени С.Н. Вышелесского», г. Минск

\*\* Барановичская межрайонная ветеринарная лаборатория, г. Барановичи

\*\*\* УО «Витебская государственная ордена «Знак Почета» академия ветеринарной медицины», г. Витебск

## ИЗГОТОВЛЕНИЕ И ЭФФЕКТИВНОСТЬ БИВАЛЕНТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ САЛЬМОНЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

*Предложена технология изготовления вакцины против сальмонеллеза крупного рогатого скота на основе двух серовариантов (Sal. dublin и Sal. enteritidis), предусматривающая предварительную экстракцию поверхностных антигенов сальмонелл с последующей инактивацией их токсинов. Это позволяет повысить ее иммуногенность и сократить сроки приготовления*

*A new technology for producing vaccines against bovine salmonellosis has been developed. This comprises two serovariants (Sal. dublin и Sal. enteritidis) and is based on extraction of the surface antigens with ensuing inactivation of the toxins. This technology allows to increase the immunogenicity and reduce the labor time for their production*

### ВВЕДЕНИЕ

Сальмонеллез крупного рогатого скота является одной из актуальных проблем животноводства. По данным Всемирной организации здравоохранения, Международного эпизоотического бюро, а также Продовольственной и сельскохозяйственной организации ООН (ФАО), сальмонеллезы человека и животных широко распространены на всех континентах мира и наносят большой экономический ущерб. Эта болезнь считается характерной инфекцией при условии антисанитарии: повышенная влажность, сквозняки, скученность поголовья в животноводческих помещениях. Такие факторы являются благоприятными не только для накопления возбудителя в объектах внешней среды, но и отрицательно влияют на резистентность организма. {3}.

Применение противосальмонеллезных вакцин позволяет снизить потери, причиняемые этой болезнью. Однако технология их изготовления пока малопроизводительна, недостаточно эффективна и нуждается в совершенствовании. В частности, в вакцинах, применяемых против сальмонеллеза крупного рогатого скота в хозяйствах Республики Беларусь, содержится два сероварианта возбудителя (Sal.dublin и Sal. typhimurium).

Результаты наших исследований свидетельствуют, что в Республике Беларусь наиболее часто сальмонеллез у крупного рогатого скота вызывается Sal. dublin (48,2 %), Sal. enteritidis (25,0 %), Sal. typhimurium (9,5 %), Sal. london (3,2%) Sal. londau (2,0%), Sal. humber (2,6%), Sal. paratyphi (3,2%) и другими серовариантами сальмонелл - (6,3 %) (1, 2).

Следовательно, анализ полученных нами данных показывает, что этиологическая структура сальмонеллеза в республике постоянно меняется. Если в 1995-1999 годы Sal. typhimurium составляла 30-36% от всех выделяемых серовариантов сальмонелл, то в 2000-2006 годы этот процент снизился до 18-21%, в 2007 -2008 годах – до 8,0 - 9,5%. Вместе с тем, с каждым годом количество случаев выделения сероварианта

*Sal. enteritidis* резко увеличивается. Если в 1995- 1999 годы отмечались единичные случаи, то к 2006 году он составил уже 23,5%, в 2007-2008 г.г. -25,0% от других серовариантов.

Целью нашей работы было конструирование концентрированных инактивированных вакцин против сальмонеллеза крупного рогатого скота из серовариантов *Sal. dublin* и *Sal. enteritidis* и изучение их иммунологической активности в лабораторных и производственных условиях.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Изготовление опытно-промышленных образцов вакцины против сальмонеллеза крупного рогатого скота производили на УП «Витебская биофабрика». С этой целью использовали сероварианты *Sal. dublin* и *Sal. enteritidis*.

Для получения посевного материала первой генерации бульон Хоттингера разливали в стеклянные флаконы емкостью 100-200 см<sup>3</sup> до 50 % их объема, укупоривали ватно-марлевыми пробками и стерилизовали при температуре 116-118° С в течение 45 минут.

Каждую монокультуру сальмонелл в объеме 0,5 см<sup>3</sup> засеивали в отдельные флаконы с питательной средой и культивировали при температуре 37± 0,5°С в течение 10-12 часов. Полученные культуры проверяли на чистоту путем микроскопии мазков, окрашиваемых по Граму, и антигенную структуру -путем постановки РА с монорецепторными сальмонеллезными сыворотками.

Посевной материал второй генерации получали в стеклянных бутылках емкостью 10-16 дм<sup>3</sup>, содержащих 5-6 дм<sup>3</sup> бульона Хоттингера. Монокультуры второй генерации засеивали из флаконов в количестве 20-25 см<sup>3</sup> и культивировали в течение 10-15 часов при температуре 37-38 °С.

Выращенные монокультуры второй генерации и проверенные на чистоту засеивали в отдельные стерильные ферментеры (объем питательной среды 7 литров) и культивировали при 37-38 °С в течение 10-15 часов. В процессе культивирования сальмонелл осуществляли постоянное перемешивание, дробную подачу стерильного раствора глюкозы и поддерживали рН в пределах 7,0-7,6, которую определяли методом испытания: ОПП «Определение рН рабочего раствора с помощью ионметра ЭВ-74». После культивирования определяли концентрацию микробных клеток с помощью фотоксиометра и стандарта мутности Тарасевича.

Для изготовления опытно-промышленных образцов вакцины исходные культуры *Sal. dublin* и *Sal. enteritidis* разводили физиологическим раствором до концентрации 4 млрд. м.к./см<sup>3</sup> и делили на 3 части. Концентрацию микробных клеток в вакцине определяли по формуле:

$$V_4 = K * V/4$$

где: К- концентрация культуры рН;

V- количество культуры в дм<sup>3</sup>.

К баксуспензиям первых двух частей добавляли формалин до конечной концентрации 0,3-0,4 %. Инактивацию проводили в течение 15-18 суток при температуре 37-42°С. (10 суток первичные посевы, в течение 8 суток – вторичные). Супернатант антигенов, консервированный формалином, инактивировали в течение 20 суток. Полноту инактивации супернатанта определяли путем высева полученных вакцин в объеме 0,2 см<sup>3</sup> в пробирки с МПБ, МПА и МППБ. Первичные посевы выдерживали в течение 10 суток при температуре =37,5±0,5° С, вторичные посевы - в течение 8 суток.

К третьей части монокультур добавляли солянокислый гидроксилламин в конечной концентрации 1:3000 и выдерживали 24 часа при температуре 37-38°С. Затем к баксуспензиям добавляли 0,5 % формалина и активировали в течение 24 часов при 37-

38 °С. После окончания процесса инактивации брали пробы для проверки на чистоту роста путем микроскопии мазков, окрашенных по Граму, посева на 3 флакона с МПБ и МПА, а также в 3 пробирки с МПБ, МПА, средой Китта-Тороцци и Сабуро.

Чистые инактивированные монокультуры сальмонелл *Sal. dublin* и *Sal. enteritidis* с концентрацией 4 млрд. м.к./см<sup>3</sup> смешивали в соотношении 1:1 и делили на 3 части. К смеси первого образца добавляли 0,1 % алюмокалиевых квасцов в виде 10 % раствора, а в два других образца – минеральное масло с эмульгатором Маркол-52.

Изготовленные в условиях опытно-промышленного производства образцы вакцины исследовали на стерильность, безвредность и иммуногенность. Уровень pH вакцины определяли электропотенциометрическим методом в объединенной пробе из трех флаконов препарата.

Стерильность полученных образцов вакцины проводили в соответствии с ГОСТ-28085 «Препараты биологические. Методы бактериального контроля стерильности». Для этого из каждого приготовленного образца вакцины высевали по 1-2 см<sup>3</sup> во флаконы с МПБ и МПА, а также по 0,2-0,3 см<sup>3</sup> в пробирки с МПБ, МППБ, МППА, среду Китта-Тороцци и Сабуро. Посевы инкубировали при температуре 37±1 °С, а на среде Сабуро при температуре 22±2 °С. Через 3-е суток делали пересев во флаконы с МПБ и МППБ и выдерживали первичные посевы в термостате в течение 10, а вторичные – 7 суток.

Безвредность опытных образцов вакцины определяли на белых мышах. Для этого использовали объединенные пробы каждого образца вакцины, которую вводили 5 мышам массой 16-18 г внутривентриально в дозе 0,3 см<sup>3</sup> и 5 кроликам массой 1,5-2,0 кг в дозе 5,0 см<sup>3</sup> внутримышечно. За животными вели наблюдение в течение 10 суток. Вакцину признавали безвредной в случае, если мыши и кролики оставались здоровыми на протяжении срока наблюдения (10 дней).

Иммуногенность приготовленной опытной вакцины против сальмонеллеза телят изучали на 80 белых мышах массой 16-18 г, которые разделили на 4 группы по 20 мышей в каждой. Мышей первой опытной группы иммунизировали концентрированной инактивированной формолвакциной против сальмонеллеза крупного рогатого скота, а второй группы – концентрированной инактивированной эмульсинвакциной против сальмонеллеза крупного рогатого скота; третьим образцом вакцины, с добавлением солянокислого гидроксиламина, которые вводили подкожно в дозе по 0,3 см<sup>3</sup>. Мыши контрольной группы вакцинации не подвергались, но им вводился стерильный фосфатно-солевой буфер в равном объеме. Через 12 дней после иммунизации белых мышей опытных и контрольной групп разделили на 2 подгруппы. Одну из них заразили 2 LD<sub>50</sub> патогенными *Sal. dublin*, а вторую – 2 LD<sub>50</sub> *Sal. enteritidis*. Наблюдение за их клиническим состоянием вели в течение 10 дней, регистрируя количество павших мышей в каждой подгруппе.

Иммуногенность вакцин также проверяли на 70 морских свинках массой 350-400 г, которых разделили на 4 группы по 20 животных в каждой и 10 – в контрольной. Морских свинок первой группы иммунизировали инактивированной концентрированной первым образцом вакцины, а второй группы – второй и третьей – третьим образцом. Свинки контрольной группы не вакцинировались. Свинкам опытных групп вводили внутримышечно биопрепараты в дозе 0,5 см<sup>3</sup>. Через 16 суток морских свинок опытных и контрольной групп разделили на 2 подгруппы. Одну из них заразили 2 LD<sub>50</sub> *Sal. dublin*, а вторую – 2 LD<sub>50</sub> *Sal. enteritidis*. Наблюдение за животными вели в течение 10 дней.

Испытание профилактической эффективности изготовленных 3-х образцов вакцины проводили в УКСП «Совхоз Доброволец» Кличевского района Могилевской области. В опыт было взято 40 сухостойных коров за 2 месяца до отела, которых разде-

лили на 4 группы по 10 голов в каждой.

Стельные (за 2 месяца до отела) коровы первой опытной группы иммунизировались инактивированной концентрированной формолквасцовой вакциной против сальмонеллеза телят. Животным второй группы вводили концентрированную инактивированную формалином эмульсинвакцину, а коров третьей группы вакцинировали концентрированной эмульсинвакциной с предварительной экстракцией поверхностных антигенов солянокислым гидроксиламином. Четвертая группа служила контролем с введением им стерильного физраствора.

Испытуемые образцы вакцины вводили внутримышечно дважды с интервалом 12 дней в дозе 3 см<sup>3</sup> на каждую инъекцию. До вакцинации и на 2-й, 14-й, 21-й, 28-й, 35-й и 42-й дни после иммунизации отбирали пробы крови, в которой определяли СОЭ, количество гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов, содержание общего белка и его фракций, фагоцитарную активность нейтрофилов и интенсивность фагоцитоза. В качестве тест-микроба использовали кишечную палочку, а для количественной характеристики фагоцитоза применяли показатели активности и интенсивности.

Для выявления Т-лимфоцитов использовали метод спонтанного розеткообразования с бараньими эритроцитами, а для определения В-лимфоцитов – феномен образования розеток с эритроцитами барана, нагруженными комплектом. Сыворотку крови исследовали в РА с сальмонеллезным антигеном.

### РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

При определении стерильности 3 опытных промышленных образцов вакцины против сальмонеллеза телят было установлено, что в посевах из вакцины на МПБ, МПА, среду Китта-Тароци и агар Сабуро рост сальмонелл и другой посторонней микрофлоры в течение 10 дней отсутствовал. Это свидетельствует о том, что используемые инактиванты обеспечивали полную гибель сальмонелл.

Результаты опыта по изучению безвредности вакцин против сальмонеллеза телят показали, что они являются безвредным препаратом, так как в течение 10 суток все белые мыши и кролики остались живыми и клинически здоровыми, а на месте введения вакцины реакция организма отсутствовала.

При определении иммуногенной активности 3-х образцов вакцины против сальмонеллеза телят было установлено, что в контрольной группе через 2-5 дней отмечалась гибель всех белых мышей, инфицированных как серовариантом *Sal. dublin*, так и *Sal. enteritidis*.

Среди мышей, иммунизированных инактивированной концентрированной фармолвакциной, зараженных *Sal. dublin* выжило 15 (75 %) из 20 голов, а инфицированных *Sal. enteritidis* – 16 (80%) мышей. После заражения животных второй группы, иммунизированных инактивированной концентрированной эмульсинвакциной, где в качестве адьюванта использовали минеральное масло с эмульгатором Маркол-52, осталось в живых белых мышей, зараженных *Sal. dublin* 17 (85 %) голов, а инфицированных *Sal. enteritidis* также – 17 (85%).

Из числа белых мышей 3 группы, иммунизированных инактивированной концентрированной эмульсинвакциной и, где в качестве адьюванта использовали минеральное масло с эмульгатором Маркол-52 и добавлением в нее солянокислого гидроксиламина, инфицированных *Sal. dublin* осталось в живых 18 (90 %) голов, а инфицированных *Sal. enteritidis* – также 18 (90 %) мышей.

При определении иммуногенной активности 3-х образцов вакцины против сальмонеллеза телят на морских свинках было установлено, что в контрольной группе через 2-5 дней отмечалась гибель всех свинок (100%), инфицированных как серовариантом *Sal. dublin*, так и *Sal. enteritidis*.

Среди морских свинок, иммунизированных инактивированной концентрированной формолвакциной, зараженных *Sal. dublin*, осталось в живых 8 (80 %) голов, а инфицированных *Sal. enteritidis* – 7 (70 %).

После заражения подопытных животных второй группы, иммунизированных инактивированной концентрированной эмульсинвакциной, осталось в живых морских свинок, зараженных *Sal. dublin* 8 (80 %), а инфицированных *Sal. enteritidis* – 9 (90 %).

Из числа морских свинок 3-й группы, иммунизированных инактивированной концентрированной эмульсинвакциной, полученной с использованием солянокислого гидроксиламина, инфицированных *Sal. dublin* осталось в живых 9 (90 %) голов, и инфицированных *Sal. enteritidis* – также 9 (90 %).

Таким образом, приготовленные нами опытно-промышленные образцы вакцины против сальмонеллеза телят оказались стерильными, безвредными и активными препаратами, причём иммуногенность третьего образца вакцины оказалась более выраженной.

При испытании профилактической эффективности опытно-промышленных образцов вакцины против сальмонеллеза предусматривались две цели. Во-первых, необходимо было сравнить пролонгирующее действие адьюванта гель гидроокиси алюминия и минерального масла Маркол-52. Во-вторых, определить влияние предварительной экстракции поверхностных антигенов сальмонелл солянокислым гидроксиламином на иммуногенность вакцины.

Результаты опыта подтвердили данные лабораторных исследований, что приготовленные образцы вакцины являются безвредными и не реактогенными препаратами, так как на месте их введения мы не отмечали реакции организма, а в течение 10 дней после вакцинации коров их температура тела была в пределах физиологической нормы.

При определении гематологических показателей, которые представлены в таблице 1, установлено, что иммунизация сухостойных коров оказывает стимулирующее влияние на гемопоз. Так, до вакцинации количество гемоглобина у коров всех опытных и контрольной групп было примерно одинаковым и составляло 100,2-109,3 г/л. Начиная с 7-го дня после повторной иммунизации его количество начало возрастать до 21-го дня после введения вакцины. Однако, достоверное увеличение количества гемоглобина выявлено у коров второй и третьей групп. Начиная с 28-го дня, его содержание несколько снижалось, но было более высоким у коров опытных групп.

Количество эритроцитов в крови опытных коров также имело тенденцию к росту. Но это увеличение было более выражено у коров третьей группы. Если количество эритроцитов у животных всех подопытных групп в начале опыта было почти одинаковым ( $6,4 \pm 0,25$  –  $6,8 \pm 0,37$ ), то к 28-му дню их содержание у коров третьей группы возросло до  $10,0 \pm 0,35$  млн./мкл, что на 21,8 % выше, чем у коров контрольной группы.

Иммунизация коров опытно-промышленными образцами вакцины оказывала положительное влияние на лимфопоз, с увеличением числа лейкоцитов. Уже на 7-й день после вакцинации их количество у коров второй группы возросло до  $10,1 \pm 0,54$ , а у животных третьей группы – до  $11,1 \pm 0,41$  тыс./мкл.

При определении скорости оседания эритроцитов мы не выявляли существенных изменений во всех опытных группах. В первой группе коров увеличение СОЭ наблюдалось до 14 дня после введения вакцины (с  $1,12 \pm 0,10$  до  $1,89 \pm 0,15$ ). Во второй - достоверное увеличение СОЭ наблюдалось до 21 дня после введения вакцины (с  $1,10 \pm 0,11$  до  $1,3 \pm 0,13$ ), а затем постепенно начало снижаться и к 42 дню составило  $0,96 \pm 0,07$ . В третьей и четвертой опытных группах коров существенных изменений СОЭ не наблюдалось.

Обмен веществ, структура и функция каждой клетки в решающей степени оп-

ределяется белками. При исследовании общего белка сыворотки крови выявили его достоверный рост у коров всех подопытных групп. Максимальное же увеличение установлено на 21-й день после вакцинации и составило в первой группе коров  $92,8 \pm 1,93$ , второй –  $92,3 \pm 2,51$  и в третьей –  $93,5 \pm 1,85$  г/л.

При определении белковых фракций сыворотки крови мы наблюдали выраженную тенденцию к их росту во всех опытных группах, хотя динамика изменений в зависимости от фракции была разной. Так, если процентное содержание альбуминов к 7-му дню возросло только в сыворотке крови коров 3 группы ( $60,4 \pm 1,25$ ), то к 14-му дню их содержание достоверно увеличилось у коров 2 и 3 групп, а к 21-му дню и у животных 1-й группы. Выявленная тенденция роста альбуминов наблюдалась до 35-го дня исследований, за исключением животных 1-й группы.

При исследовании глобулиновых фракций установили, что в первые 14 дней после повторной вакцинации содержание  $\alpha$ -глобулинов достоверно возросло у коров первой и третьей опытных групп и составило соответственно  $24,0 \pm 1,65$ ,  $21,5 \pm 1,31$  и  $20,8 \pm 1,29$  %. Начиная с 28-дня, количество их снизилось и достоверных изменений по сравнению с контролем не вызывало, за исключением животных 3-ей группы, у которых содержание  $\alpha$ -глобулинов была достоверно выше, чем у животных контрольной группы.

Содержание  $\beta$ -глобулинов было достоверно выше только на 14-й день исследования у коров 1 и 2-ой групп, но начиная с 21-го дня их количество было более высоким у животных 3-й группы.

Содержание  $\gamma$ -глобулинов начало возрастать у коров 3 группы с 14-го дня после повторной вакцинации и их количество колебалось в пределах  $64,5 \pm 1,71$  –  $70,2 \pm 1,34$  %. У животных 2 группы достоверное увеличение этой фракции установлено только на 21 и 28 дни исследования.

При определении фагоцитарной активности нейтрофилов мы выявляли достоверное увеличение лишь у коров 2 и 3-ей групп. Аналогичная закономерность наблюдалась в интенсивности фагоцитоза с той лишь разницей, что у животных 1-й группы на 21 день после повторной вакцинации фагоцитарный индекс был достоверно выше, чем в контрольной группе животных.

При определении среднего титра антител в сыворотке крови коров до вакцинации он был незначительный и колебался соответственно к сероварианту *Sal. dublin* и *Sal. enteritidis* в пределах  $3,86 \pm 0,65$  –  $4,06 \pm 0,69 \log_2$  (таблица 4). После иммунизации он начал возрастать и на 14-й день исследования у коров 1 группы составил к антигену сероварианту *Sal. dublin*  $7,85 \pm 0,23$ , 2 группы –  $9,73 \pm 0,28 \log_2$  и 3 группы  $10,12 \pm 0,13 \log_2$ . К сероварианту *Sal. enteritidis* эти показатели составили соответственно  $8,23 \pm 0,21$ ,  $9,94 \pm 0,18$  и  $9,96 \pm 0,19 \log_2$ . Выявленная тенденция к росту титра антител в сыворотке крови наблюдалась до 35-го дня исследований. Их уровень к *Sal. dublin* у коров 1 группы составил  $10,65 \pm 0,16 \log_2$ , 2 группы –  $10,86 \pm 0,17 \log_2$  и 3 группы  $11,12 \pm 0,21 \log_2$ . Антитела к сероварианту *Sal. enteritidis* выявлены в титре  $10,86 \pm 0,17 \log_2$ ,  $10,86 \pm 0,17 \log_2$  и  $11,16 \pm 0,26 \log_2$  соответственно.

При определении титра антител в сыворотке молозива коров мы установили, что после 1-го удоя его содержание колебалось в пределах  $11,46 \pm 0,27$  –  $12,05 \pm 0,15 \log_2$  к обоим серовариантам. А после второго удоя, проведенного в первый день после отела, уровень содержания был  $11,25 \pm 0,29$  –  $11,83 \pm 0,28 \log_2$ . Затем их уровень постепенно снижался и на 6-ой день был равен к *Sal. dublin*  $5,03 \pm 0,21$  в молозиве коров 1-й группы,  $5,48 \pm 0,30$  – 2-й группы и  $5,53 \pm 0,30$  у животных 3-й группы. К сероварианту *Sal. enteritidis* он составил соответственно  $3,91 \pm 0,78$ ,  $3,13 \pm 0,99$  и  $4,08 \pm 0,83$ .

Таблица 1 - Гематологические показатели сухостойных коров, иммунизированных против сальмонеллеза

Показатели	№ группы	До вакцинации	После второй вакцинации, дни					
			7-й	14-й	21-й	28-й	35-й	42-й
Гемоглобин, г/л	1	109,3±4,40	119,9±4,03	132,6±5,29	138,0±6,03	139,1±5,85*	126,9±5,02	109,7±3,59
	2	102,3±4,36	121,8±3,99*	138,3±5,27*	147,6±3,58**	144,8±2,24	133,3±2,33	120,9±3,93**
	3	107,3±4,95	125,1±2,44**	146,8±3,63***	150,9±1,85***	148,6±1,36	136,0±1,21	121,2±1,72***
	4	103,1±3,65	110,0±3,65	135,0±3,39	134,8±2,47	127,7±3,41	118,0±3,41	105,7±2,59
Эритроциты, млн/мкл	1	6,4±0,25	7,37±0,24	7,96±0,26	7,82±0,24	7,99±0,20	7,8±0,24	8,21±0,24
	2	6,8±0,20	7,3±0,27	7,9±0,30	8,6±0,22	9,0±0,21	8,9±0,26	9,2±0,26***
	3	6,7±0,26	7,6±0,19	8,2±0,20**	8,5±0,21**	10,0±0,35***	9,5±0,36***	10,1±0,37***
	4	6,5±0,37	7,0±0,20	7,4±0,17	7,6±0,18	7,5±0,19	7,7±0,16	7,9±0,14
Лейкоциты, тыс/мкл	1	7,8±0,25	9,6±0,59	9,6±0,52	10,0±0,60	10,3±0,52**	10,0±0,54	9,32±0,47
	2	7,4±0,45	10,1±0,54***	10,3±0,51*	10,8±0,51**	11,1±0,46**	11,3±0,47***	10,4±0,47***
	3	7,9±0,27	11,1±0,41***	11,5±0,45***	11,7±0,38***	8,7±0,17	8,8±0,17	8,3±0,19
	4	7,6±0,33	8,1±0,28	8,8±0,22	9,1±0,22	8,4±0,19	8,0±0,22	8,4±0,21
СОЭ, мм/г	1	1,12±0,10	1,19±0,14***	1,89±0,15	1,09±0,12	1,14±0,13	1,08±0,11	1,0±0,07
	2	1,10±0,11	1,16±0,14**	1,2±0,15	1,3±0,13	1,2±0,14	1,1±0,10	0,96±0,07
	3	0,96±0,10	1,04±0,11	1,0±0,11	1,0±0,09	1,1±0,10	1,0±0,08	1,0±0,08
	4	1,06±0,10	1,1±0,10	1,2±0,11	1,0±0,09	1,0±0,08	1,1±0,10	1,1±0,08

Примечание:

- \* -  $p \leq 0,05$
- \*\* -  $p \leq 0,01$
- \*\*\* -  $p \leq 0,001$

Таблица 2 - Показатели общего белка и его фракций в сыворотке крови сухостойных коров,

Показатели	№ группы	До вакцинации	Дни после второй вакцинации						
			7-й	14-й	21-й	28-й	35-й	42-й	
Общий белок, г/л	1	77,2±1,14	88,4±1,98	90,5±1,90	92,8±1,93***	90,0±2,31*	84,3±2,53*	80,9±1,01***	
	2	75,9±1,72	89,1±2,63	94,0±2,12***	92,3±2,51***	91,8±2,49**	88,5±2,29**	78,2±2,12**	
	3	77,8±3,50	93,9±3,09	96,9±2,68**	93,5±1,85***	95,2±1,65***	92,9±1,87***	86,3±2,89***	
	4	75,1±2,26	88,8±1,38	87,7±1,43	84,0±1,18	82,1±0,95	77,3±2,19	73,0±1,32	
Альбумины, %	1	45,3±1,81	52,2±1,33	56,1±1,20	62,3±2,16***	62,9±2,11	60,5±2,10	58,6±1,39	
	2	44,3±1,75	56,0±1,42	59,7±1,32*	64,5±1,47***	66,9±1,43**	64,0±1,77***	61,7±1,97	
	3	44,8±2,00	60,4±1,25**	67,6±0,91***	71,5±1,31***	74,0±1,10***	72,6±1,10***	64,6±1,68**	
	4	44,6±2,00	54,7±1,35	54,0±1,42	51,4±1,23	60,1±1,34	55,5±1,48	55,7±1,73	
Глобулины, %	α	1	15,6±1,26	19,2±0,95	24,0±1,65*	22,1±1,54*	18,4±1,33	14,4±0,79	12,7±0,81
		2	15,3±1,30	19,9±0,94	21,5±1,31	20,5±1,42	20,4±1,54	16,1±1,30	13,9±0,86
		3	13,7±0,97	18,3±1,43**	20,8±1,29*	23,0±1,15**	22,0±1,24***	18,8±1,04	15,7±0,81
		4	14,9±1,20	15,2±0,82	18,5±0,68	18,1±0,58	17,5±0,61	16,1±1,15	16,9±1,19
	β	1	12,6±0,84	15,2±0,90	18,1±1,39**	17,2±1,08*	14,9±0,82	13,9±0,79	11,7±0,49
		2	11,7±0,65	15,9±1,05	16,8±1,09*	16,9±1,28	17,3±1,46	18,9±1,54***	17,4±1,46***
		3	12,0±0,62	17,7±1,27	21,4±1,13	21,8±1,09**	20,1±0,80***	22,2±1,00***	19,5±1,03***
		4	12,8±0,88	14,5±1,02**	16,8±1,04	16,3±1,01	15,2±0,96	12,5±0,5	14,1±0,69
	γ	1	38,8±2,75	48,4±2,98	54,2±3,26	57,7±2,57	59,6±2,17	56,0±1,38	54,3±1,34
		2	38,2±2,79	51,7±3,11**	57,6±2,17	63,6±1,28***	63,6±1,42**	59,7±1,83	51,7±1,86
		3	40,4±3,31	49,7±3,14	64,5±1,71***	70,2±1,34***	62,8±1,23***	62,0±1,02**	61,6±1,73
		4	40,3±2,62	45,4±2,02	52,2±1,68	52,6±1,30	54,3±1,50	55,9±1,32	50,3±1,63***

Примечание: \* -  $p \leq 0,05$     \*\* -  $p \leq 0,01$     \*\*\* -  $p \leq 0,001$



Таблица 3 - Фагоцитарная активность нейтрофилов в крови сухостойных коров, иммунизированных против сальмонеллеза

Показатели	№ группы	До вакцинации	Дни после второй вакцинации					
			7-й	14-й	21-й	28-й	35-й	42-й
Фагоцитарная активность	1	Принимали за 100 %	100,2±1,94	107,2±3,0	119,4±3,54	109,5±3,21	106,7±2,26	98,7±1,76
	2		101,7±4,69*	115,0±4,40**	130,5±4,12*	124,0±3,96**	110,8±3,20	102,9±3,43
	3		105,0±3,31***	119,6±2,56***	135,5±2,35***	126,6±3,23***	113,6±3,65	105,1±3,01*
	4		10,1±1,47	101,6±1,47	115,5±1,52	109,9±1,71	109,7±1,40	98,2±1,56
Интенсивность фагоцитоза	1	Принимали за 100 %	117,7±3,15***	128,9±1,88**	136,0±2,64*	133,0±2,73	121,0±2,22	110,6±3,49
	2		112,6±2,87**	125,9±2,55	134,1±1,56*	129,8±2,07	125,4±1,73***	116,0±3,35
	3		120,7±3,92***	137,1±3,50***	145,1±2,76***	146,2±2,69***	130,7±2,62***	122,5±3,01***
	4		100,9±2,08	119,8±2,09	128,4±1,66	128,8±0,91	116,3±1,01	108,7±1,10*

Примечание:

\* -  $p \leq 0,05$

\*\* -  $p \leq 0,01$

\*\*\* -  $p \leq 0,001$

Таблица 4 - Титры антител в сыворотке крови сухостойных коров ( $\log_2$ ) к сальмонеллам

Группы животных	Перед вакцинацией	Дни после второй вакцинации					
		7-й	14-й	21-й	28-й	35-й	42-й
к S dublin							
1 группа	4,06±0,69	6,73±0,30	7,85±0,23	9,71±0,24	10,49±0,19	10,65±0,16	9,93±0,18
2 группа	4,06±0,69	6,9±0,21	9,73±0,28	10,57±0,18	10,86±0,17	10,86±0,17	10,12±0,13
3 группа	4,06±0,69	7,04±0,22	10,12±0,13	10,86±0,17	10,99±0,19	11,12±0,21	10,57±0,18
контрольная	4,06±0,69	4,53±0,52	4,43±0,50	4,33±0,49	4,49±0,49	4,33±0,49	3,96±0,67
к S. enteritidis							
1 группа	3,96±0,67	6,72±0,22	8,23±0,21	9,71±0,24	10,49±0,19	10,86±0,17	10,20±0,13
2 группа	3,86±0,65	6,63±0,29	9,94±0,18	10,49±0,19	10,90±0,23	10,86±0,17	10,20±0,13
3 группа	3,96±0,67	6,63±0,29	9,96±0,19	10,81±0,26	11,03±0,25	11,16±0,26	10,46±0,20
контрольная	3,86±0,65	4,53±0,52	4,70±0,67	3,96±0,67	4,43±0,50	4,33±0,49	4,33±0,49

Примечание:  $P \leq 0,01$

Таблица 5. Титр антител к *S. dublin* и *S. enteritidis* в сыворотке молозива коров, иммунизированных против сальмонеллеза,  $\log_2$

№ группы	Титры антител в молозиве коров								
	первый удой	второй удой	на 2 день	на 3 день	на 4 день	на 5 день	на 6 день	на 7 день	на 8 день
<b>Титры антител к <i>S. enteritidis</i></b>									
1	11,46±0,27	11,46±0,27	10,15±0,20	9,36±0,21	6,55±0,32	5,03±0,21	3,91±0,78	3,13±0,99	2,35±1,05
2	11,68±0,21	11,68±0,21	10,51±0,33	9,35±0,35	7,06±0,23	5,20±0,22	3,13±0,99	3,13±0,99	3,13±0,99
3	11,83±0,28	11,83±0,28	10,66±0,28	9,51±0,29	7,76±0,25	5,70±0,36	4,08±0,83	3,13±0,99	3,13±0,99
4	5,03±0,21	4,86±0,16	4,70±0,15	3,13±0,99	3,91±0,78	3,13±0,99	3,91±0,78	2,35±1,05	2,35±1,05
<b>Титр антител к <i>S. dublin</i></b>									
1	11,46±0,27	11,25±0,29	10,15±0,20	9,03±0,21	7,06±0,23	6,03±0,33	5,03±0,21	3,13±0,99	3,13±0,99
2	11,83±0,28	11,25±0,29	10,30±0,18	9,20±0,40	7,08±0,35	6,03±0,21	5,48±0,30	4,25±0,87	3,91±0,78
3	12,05±0,15	11,68±0,21	10,45±0,15	9,53±0,16	7,91±0,30	6,71±0,27	5,53±0,30	4,58±0,96	3,30±1,05
4	4,08±0,83	4,86±0,16	3,91±0,78	3,13±0,99	3,13±0,99	3,13±0,99	3,13±0,99	2,35±1,05	1,56±0,99

Примечание:  $p \leq 0,05$

Таким образом, результаты серологических исследований показывают, что наиболее иммуногенным оказался третий вариант вакцины с солянокислым гидроксиламином. Средний титр антител в сыворотке крови по этой группе за молозивный период к сероварианту *Sal. dublin* достигал до значения  $11,12 \pm 0,21 \log_2$  и к сероварианту *Sal. enteritidis* – до значения  $11,16 \pm 0,26 \log_2$ .

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Сальмонеллез относится к инфекциям с глобальным распространением. Ущерб, наносимый этой болезнью заключается не только в падеже животных, но и в том, что переболевшие животные на протяжении длительного времени являются носителями возбудителя и становятся постоянным источником контаминации окружающей среды. Продукты животного происхождения, полученные от животных-носителей, являются источником инфекции (токсикоинфекции) у людей. Поэтому проблема снижения заболеваемости животных должна решаться на основе проведения широких ветеринарно-санитарных мероприятий, где ведущее место занимает специфическая вакцинопрофилактика.

Применяемые вакцины против сальмонеллеза крупного рогатого скота содержат два серотипа (*Sal. dublin* и *Sal. typhimurium*). Их разработчики не учитывали тот факт, что *Sal. enteritidis* выделяется несколько чаще, чем *Sal. typhimurium*. Более того, технология их изготовления малопроизводительна, недостаточно эффективна и нуждается в совершенствовании.

Исходя из этого, конструирование вакцины против сальмонеллеза телят мы проводим с использованием серовариантов *Sal. dublin* и *Sal. enteritidis*. При этом учитывали литературные данные, что в патогенезе сальмонеллеза ведущую роль играют не только энтеротоксины, но и адгезины, способствующие прикреплению возбудителя к поверхности эпителиальных клеток кишечника. В связи с этим, мы решили использовать щадящий метод инактивации сальмонелл солянокислым гидроксиламином, который не только разрушает генетический аппарат микробной клетки, но и способствует экстракции ее поверхностных антигенов [4,5,6].

Кроме того, при конструировании вакцины против сальмонеллеза мы исходили из того, что повышение иммуногенности инактивированных вакцин осуществляется не только селекцией иммуногенного штамма, но и добавлением к антигену адьювантов, которые стимулируют иммунную систему у прививаемых животных. При сравнении эффективности применения в качестве адьюванта гели гидроксида алюминия и минерального масла с эмульгатором Маркол 52 установлено, что оба они усиливают иммунный ответ к сальмонеллезному антигену, однако более выраженную стимуляцию иммунной системы наблюдали при применении минерального масляного адьюванта.

Предварительная экстракция поверхностных антигенов с последующей инактивацией сальмонелл солянокислым гидроксиламином в течение 24 часов позволяет, во-первых, сократить технологический цикл приготовления вакцины, а во-вторых, повышает ее иммуногенные свойства. Средний титр антител в крови против сальмонелл у коров, привитых данным образцом вакцины, составил к сероварианту *Sal. dublin*  $10,10 \pm 0,13 \log_2$ , к сероварианту *Sal. enteritidis* –  $10,0 \pm 0,12 \log_2$ . У коров вакцинированных эмульгированной вакциной титр антител, соответственно составил  $9,84 \pm 0,26 \log_2$  и  $9,83 \pm 0,26 \log_2$ , у коров вакцинированных фармолвакциной соответственно  $9,21 \pm 0,40$  и  $9,36 \pm 0,35 \log_2$ .

Титр антител в молозиве отелившихся коров 3-й опытной группы, вакцинированных инактивированной концентрированной эмульгированной вакциной с соляно-

кислым гидроксиламином, составил: к сероварианту *Sal. dublin* от  $12,05 \pm 0,15$  в первый удой и  $3,30 \pm 1,05 \log_2$  на 8-й день (молозивный период) и сероварианту *Sal. enteritidis*  $11,83 \pm 0,28$  в первый удой и  $3,13 \pm 0,99 \log_2$  на 8-й день (молозивный период).

У коров 2-й группы вакцинированных эмульгированной вакциной титр антигенов, соответственно составил:  $11,83 \pm 0,28$  -  $3,91 \pm 0,78$  и  $11,68 \pm 0,21$  и  $3,13 \pm 0,99 \log_2$ .

У коров 1-й группы вакцинированных фармолвакциной титр антигенов, соответственно составил:  $11,46 \pm 0,27$  -  $3,13 \pm 0,78$  и  $11,46 \pm 0,27$  и  $2,35 \pm 1,05 \log_2$ .

У коров контрольной опытной группы также обнаружены антитела в низких титрах, как к сероварианту *Sal. enteritidis*, так и к *Sal. dublin* от  $1,56 \pm 0,99$  до  $5,03 \pm 0,21$ . Эти антитела обнаруживаются в связи с циркуляцией эпизоотических штаммов сальмонелл.

## ВЫВОДЫ

1. Приготовленные образцы бивалентной вакцины из серовариантов *Sal. dublin* и *Sal. enteritidis* обладают высокими иммуногенными свойствами, способны защитить животных от сальмонеллеза, однако, наиболее иммуногенной активностью обладает инактивированная концентрированная эмульсинвакцина с солянокислым гидроксиламином.

Титр антигенов в сыворотке крови коров, вакцинированных инактивированной концентрированной эмульсинвакциной с солянокислым гидроксиламином, составляет: к сероварианту *Sal. dublin*  $7,04 \pm 0,22$  -  $11,12 \pm 0,21 \log_2$  и к сероварианту *Sal. enteritidis*  $6,63 \pm 0,29$  -  $11,16 \pm 0,26 \log_2$ .

Титр антигенов в молозиве отелившихся коров, вакцинированных инактивированной концентрированной эмульсинвакциной с солянокислым гидроксиламином, составляет: к сероварианту *Sal. dublin* от  $12,05 \pm 0,15$  в первый удой и  $3,30 \pm 1,05 \log_2$  на 8-й день (молозивный период) и сероварианту *Sal. enteritidis*  $11,83 \pm 0,28$  в первый удой и  $3,13 \pm 0,99 \log_2$  на 8-й день (молозивный период).

2. Гель гидроокиси алюминия и минеральное масло Маркол 52 оказывают иммуностимулирующее влияние на иммунную систему, однако, более выраженным влиянием обладает масляный адьювант Маркол 52 с солянокислым гидроксиламином.

3. Предварительная экстракция поверхностных антигенов сальмонелл солянокислым гидроксиламином с последующей инактивацией их токсинов в течение 24 часов сокращает технологический процесс приготовления вакцины в 5 раз и значительно повышает ее иммуногенность по сравнению с инактивированной фармолвакциной против сальмонеллеза крупного рогатого скота.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андросик, Н.Н. Основные свойства сальмонелл, выделенных от телят и результаты отбора штаммов для производства инактивированной вакцины против сальмонеллеза / Н.Н. Андросик, О.Н. Локтева // Эпизоотология Иммунология Фармакология Санитария. - 2008. - № 1. - С. 18-20.
2. Белова, С.А. Изучение антигенных комплексов шигелл Флекснера и Зоне, изолированных из микробных клеток с помощью солянокислого гидроксиламина. // Вакцины для профилактики и лечения кишечных бактериальных инфекций. - М. МНИИВС. - 1976. - С. 143-147.

3. Бутуева, Н.Б. Изготовление и производственное испытание опытной серии вакцины против сальмонеллеза телят / Н.Б. Бутуева, и др. // Научные основы промышленного производства ветеринарных биологических препаратов: тезисы докладов V Всероссийской конф. 14-15 мая 1996 г., Щелково. – 1996. – С. 108-109.
4. Зеленко, Е.Н. Испытание экспериментальной эмульсинвакцины инактивированной против сальмонеллеза телят./ Е.Н. Зеленко // Зооантропонозные болезни, методы профилактики и борьбы: матер. межд. науч.-практ. конф., Гродно, 23-24 октября 1997/ Бел.НИЭВ; под. ред. Н.А. Ковалева (и др.)- Минск, 1997- С. 107-108.
5. Пустовар, А.Я. Некоторые ветеринарные и медицинские аспекты проблемы сальмонеллез / А.Я. Пустовар, Э.И. Федоров, И.А. Гриаснео // Общая эпизоотология: иммунологические, экологические и методологические проблемы. 20-22 сентября 1995 г., Харьков: типография № 16 Харьковский зооветеринарный институт, 1995 – С. 76-79.
6. Расчинкина, А.С. Действие гидроксилamina и его аналогов О-  
метилгидроксилamina и N-метилгидроксилamina на бактерии *E. coli* / А.С. Расчинкина // Автореф... дисс... канд. биол. наук, Минск: БГУ, - 1971. – 21 с.