

Список літератури

1. Berndt, A. Gamma/delta T-cell response of chickens after oral administration of attenuated and non-attenuated *Salmonella typhimurium* strains / A. Berndt, U. Methner // Vet. Immunol. Immunopathol. — 2001. — Vol. 78. — P. 143-161.
2. Lillehoj, H. S. Postnatal development of T-lymphocyte subpopulations in the intestinal intraepithelium and lamina propria in chickens / H. S. Lillehoj, K. S. Chung // Vet. Immunol. Immunopathol. — 1992. — Vol. 31. — P. 347-360.
3. Карселадзе, А. И. Иммуногистохимическое исследование специфического антигена в раке предстательной железы / А. И. Карселадзе, И. Э. Рытин, И. Э. Будунова // Архив патологии. — 2004. — Т. 66, № 2. — С. 3-7.
4. Шутченко, П., Красніков, Г. Імуногістохімічне вивчення клітинного імунітету при сальмонельозі курчат // Ветеринарна медицина України. — 2006. — №7. — С. 26-27.

APPLICATION OF IMMUNOHISTOCHEMICAL METHODS AT STUDYING OF IMMUNOSUPPRESSIVE PROPERTIES OF VACCINES AGAINST SALMONELLOSIS

Krasnikov G., Shutchenko P.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine",
Kharkiv

New data on hen immunity organ state after vaccination against salmonellosis was received using improved modern immunohistochemical methods. It was determines the dynamics of immunity cluster changes at chickens after vaccination against salmonellosis. The received data testified to necessity of definition of dynamics action and immunosuppressive activity of modern biological preparations using contemporary immunohistochemical methods.

УДК 619:616.98:578-07-084-093.2

ИЗУЧЕНИЕ АНТИГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ИНАКТИВИРОВАННЫХ И НЕИНАКТИВИРОВАННЫХ ШТАММОВ ВИРУСА ДИАРЕИ, КЛЕБСИЕЛЛ, РОТАВИРУСОВ И ПРОТЕЯ ПРИ КОНСТРУИРОВАНИИ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ

Красочко П. А., д-р вет. наук, проф.,
Ломако Ю. В., канд. вет. наук,
Карпович В. К., врач вет. медицины
Борисовец Д. С., асп.

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского»,
г. Минск, Республика Беларусь

Одним из слагаемых успешного развития животноводства является эффективная борьба с инфекционными заболеваниями, значение которых не уменьшается, а ощутимые экономические убытки обязывают обратить на них пристальное внимание и постоянно совершенствовать диагностику, лечение и профилактику [1]. Вместе с тем, следует отметить, что значительный экономический ущерб наносят заболевания желудочно-кишечного тракта, распространенные среди телят. Ряд проведенных в республике и за рубежом исследований показал, что по своему происхождению и клинико-морфологическому проявлению желудочно-кишечные заболевания весьма разнообразны [2].

Массовые диареи новорождённых телят представляют собой группу заболеваний, этиологически связанных с вирусами, микробами, простейшими и грибами, вирулентность которых повышается на фоне различных неблагоприятных условий содержания и кормления.

Длительная персистенция возбудителя, высокая концентрация чувствительных

животных, возможность перекрестного заражения в ассоциации с другими факторами, которые снижают резистентность организма, обуславливают постоянную потенциальную угрозу возникновения вспышек заболевания.

Возбудители инфекционных болезней попадают в желудочно-кишечный тракт, как правило, в первые минуты постнатальной жизни новорождённых телят. Телёнок рождается слабо защищённым и, попадая в новую среду, насыщенную различными возбудителями болезней, легко инфицируется [4].

Особую роль в патологии пищеварительной системы играют вирус диареи, рота-вирус, клебсиелла и протей, которые способны вызывать болезнь самостоятельно, а также в виде ассоциаций. Болезнь характеризуется профузным поносом, приводящим к обезвоживанию организма и развитию депрессии. Летальность при неосложнённой ротавирусной инфекции может составлять до 15 %, вирусной диареи – до 5 % и более. При осложнении бактериальной микрофлорой летальность увеличивается в несколько раз, достигая 75 %.

Специфическая профилактика острых инфекционных гастроэнтеритов актуальна и на современном этапе, несмотря на предлагаемое множество моно- и ассоциированных, живых и инаktivированных вакцин как вирусных, так и вирусно-бактериальных. Высокий уровень заболеваемости, отход телят и выделяемость возбудителей из патологического материала павших телят свидетельствуют о их недостаточной эффективности. Следовательно, проблема специфической профилактики острых заболеваний желудочно-кишечного тракта требует глубокого изучения и изыскания новых более эффективных ассоциированных вакцин, способных защитить молодняк от основных известных возбудителей [3]. В этом плане предпочтение необходимо отдавать инаktivированным вакцинам, вследствие того, что штаммы, входящие в состав живых вирусно-бактериальных вакцин, могут приобретать патогенные свойства и приводить к заболеванию иммунизированных животных.

Одним из важнейших этапов при изготовлении подобного рода препаратов является инаktivация возбудителя, которая предусматривает подбор наиболее оптимального средства инаktivации. Причем данное вещество не должно обладать такими отрицательными свойствами, как повышенная токсичность, реактогенность и иммунодепрессия. Кроме того, некоторые авторы считают, что иммуногенность антигенов в составе многокомпонентных вакцин намного ниже, по сравнению с монокомпонентными (Gale, 1973) [1]. Поэтому на данном этапе конструирования вакцины важное значение приобретает изучение титров противовирусных и антибактериальных антител, вырабатываемых при введении инаktivированных и не инаktivированных штаммов вирусов и бактерий лабораторным животным.

Целью нашего исследования явилось изучение антигенной активности инаktivированных и не инаktivированных штаммов вируса диареи, клебсиелл, ротавирусов и протей для конструирования инаktivированной вакцины.

Подбор штаммов вируса диареи, ротавируса, клебсиелл и протей проводили путем выделения возбудителей из биологического материала от телят, а также сравнения с референтными штаммами бактерий и вирусов.

Из головного мозга и паренхиматозных органов павших телят нами было изолировано 5 культур протеев и 3 штамма клебсиелл.

По культурально-морфологическим, биохимическим и биологическим свойствам микроорганизмы отнесены к роду *Proteus*, идентифицированы как *Proteus mirabilis* и роду *Klebsiella*, идентифицированы как *Klebsiella pneumoniae*.

При изучении биологических свойств микроорганизмы *Proteus mirabilis* являются Gr⁺, полиморфными, мелкими, нитевидными палочками, отличающимися очень активной подвижностью; размеры клеток составляют 0,3–3 мкм, спор и капсул не образовывали; растут на среде Эндо, Плоскирева, Левина, на агаровой среде наблюдается “ползучий” рост (роящиеся H-формы), а на жидких питательных средах образует поверхностную пленку в виде вуалеобразного налёта с придонным

ростом и очень неприятным запахом. Выделенный нами штамм *Proteus mirabilis* не ферментирует лактозу, арабинозу, дульцит, не обладает декарбоксилазой лизина и дегидролазой аргинина, декарбоксилирует орнитин, образует сероводород, гидролизует мочевины, не утилизирует малонат, растет на агаре Симмонса (утилизирует цитраты), не сбраживает мальтозу и амигдалин, не образует индол.

Выделенные штаммы *Klebsiella pneumoniae* ферментируют глюкозу, лактозу, сахарозу, манит, не сбраживают мальтозу, растут на агаре Симмонса, не образуют сероводород, гидролизуют мочевины, не дезаминируют фенилаланин, не разжижают желатин, растут на среде Эндо в виде колоний иногда с металлическим блеском; все культуры оказались патогенными для белых мышей.

Вирус диареи и ротавирус выделяли от больных телят с клинически выраженными признаками гастроэнтеритов. Выделение вируса диареи осуществлялось на культуре клеток МДБК, а ротавируса - на СПЭВ (по В. Н. Сюрину, 1986). Идентификацию выделенных штаммов проводили в реакции нейтрализации с моноспецифическими сыворотками.

Вирус диареи при культивировании на культуре клеток МДБК вызывает ЦПД через 24-48 часа после инокуляции и характеризуется в начальной стадии появлением мелкозернистой инфильтрации, а затем отторгается от стекла, оставляя только сеть зернистого материала. Титр вируса - до $8,2 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{мл}}$.

ЦПД ротавируса проявляется не ранее, чем через 24 часа.

Ротавирус при культивировании на культуре клеток МДБК вызывает ЦПД через 24 часа после инокуляции и характеризуется округлением клеток, зернистостью и лизис. Титр вируса - $7,0 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{мл}}$.

Для накопления штаммов вирусов при проверке антигенной активности использованы культуры клеток МДБК и СПЭВ. Вирус диареи культивировали на культуре клеток МДБК, а ротавирус - на СПЭВ. После культивирования ВД титр вируса был $8,2 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{мл}}$, ротавируса - $7,0 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{мл}}$.

Штаммы клебсиелл и протеев культивировали 24 часа на агаровой питательной среде, смывали стерильным 0,85 %-м раствором натрия хлорида и доводили концентрацию бактерий до 5 млрд. микробных клеток в 1 мл. Инактивация проводилась формалином до конечной концентрации 0,4 %.

Для изучения антигенной активности штаммов - компонентов вирусно-бактериальной вакцины исследования проводились на лабораторных животных - белых мышах. Лабораторным животным взвесь каждого из штаммов клебсиелл и протеев вводили подкожно двукратно с интервалом 10-14 дней в дозах: для мышей - 0,2 мл 5 млрд. взвеси, вирус диареи и ротавирус - в дозе 0,5 мл. На каждый штамм использовали по 5 белых мышей, всего исследовали 3 штамма клебсиелл и 5 штаммов протеев, по 2 изолята вируса диареи и ротавируса, выделенных от павших телят в хозяйствах Республики Беларусь.

Через 21 день после второго введения вирусов и бактерий животных тотально обескровливали, получали сыворотку и определяли уровень противовирусных антител в РНГА, а антибактериальных - в РА на полистироловых планшетах.

При отработке методов инактивации штаммов бактерий и вирусов - компонентов инактивированная ассоциированная вакцина против вирусной диареи, ротавирусной инфекции, клебсиелллёза и протейной инфекции телят были использованы ряд инактивантов - теотропин, гидраксиламин, димер этилендиамин. Для инактивации вирусов использованы различные концентрации теотропина (от 0,1 до 0,5 %), димер этилендиамина в 0,01, 0,02 и 0,03 %-ной концентрациях, формалин - от 0,05 до 0,5 %. Различные разведения инактивантов добавляли в заранее оттитрованную вирусосодержащую жидкость; контакт вирусов с инактивантами проводился в течение, 24, 48, 72, 96 и 120 часов, после чего была проверена полнота инактивации вирусов на культуре клеток.

Для определения инактивирующих свойств солянокислого гидроксиламина, формалина и теотропина для бактерий были использованы эпизоотические штам-

мы клебсиелл и протей. Инактивацию проводили с 24-часовыми бульонными культурами бактерий с концентрацией микробной взвеси $6,5 - 7,5 \times 10^8$ м. к. в 1 мл. Гидроксиламин добавляли в культуру в концентрациях от 0,1 до 0,5 %, формалин - от 0,05 до 0,5 %, теотропин - от 0,1 до 0,5 %. Инактивацию проводили при температуре 37°C в течение 72 часов. Выживаемость бактерий определяли сразу после титрации препарата и через 24, 48, 72 часа путем отбора проб и контрольных высевов на МПБ.

О степени инаktivации вируса диареи и ротавируса судили по отсутствию ЦПД вируса в культурах клеток при проведении 2-3-х последовательных пассажей, а клебсиелл и протей путем посева на МПА и МПБ.

Для изучения антигенной активности штаммов - компонентов вирусно-бактериальной вакцины исследования проводились на лабораторных животных - белых мышах. Было сформировано 17 групп белых мышей по 4-5 голов в группе. Лабораторным животным взвес каждого из штаммов клебсиелл и протеев вводили подкожно двукратно с интервалом 10-14 дней в дозах: для мышей - 0,2 мл 5 млрд. взвеси, вирус диареи и ротавирус - в дозе 0,5 мл.

Через 21 день после второго введения вирусов и бактерий животных totally обескровливали, получали сыворотку и определяли уровень противовирусных антител в РНГА, а антибактериальных - в РА на полистироловых планшетах.

Результаты исследований. В таблице представлены результаты изучения титров противовирусных и антибактериальных антител у мышей при изучении антигенной активности инаktivированных и не инаktivированных штаммов вирусов и бактерий.

Таблица. Результаты исследований по изучению антигенной активности инаktivированных и не инаktivированных штаммов вирусов и бактерий

№ п/п	Группы животных	Наименование вирусного антигена	Инактивант	Титр антител
1	Опытная группа № 1	Клебсиелла (инаktivированная)	Формалин	1:64
2	Опытная группа № 2		Теотропин	1:128
3	Опытная группа № 3		Гидроксиламин	1:128
4	Опытная группа № 4	Клебсиелла (живая)	-	1:64
5	Опытная группа № 5	Протей (инаktivированный)	Формалин	1:128
6	Опытная группа № 6		Теотропин	1:256
7	Опытная группа № 7		Гидроксиламин	1:256
8	Опытная группа № 8	Протей (живой)	-	1:128
9	Опытная группа № 9	Вирус диареи (инаktivированный)	Формалин	1:8
10	Опытная группа № 10		Теотропин	1:16
11	Опытная группа № 11		Димер этиленамин	1:16
12	Опытная группа № 12	Вирус диареи (живой)	-	1:8
13	Опытная группа № 13	Ротавирус (инаktivированный)	Формалин	1:8
14	Опытная группа № 14		Теотропин	1:16
15	Опытная группа № 15		Димер этиленамин	1:16
16	Опытная группа № 16	Ротавирус (живой)	-	1:8
17	Контрольная группа (плацебо)	-	-	0

В результате постановки РНГА титр антител к не инактивированному вирусу диареи был 1:8, инактивированному формалином - 1:8, теотропином - 1:16, димером этиленамина - 1:16; титр антител к не инактивированному ротавирусу был 1:8, инактивированному формалином - 1:8, теотропином - 1:16, димером этиленамина - 1:16; титр антител в РА к не инактивированному штамму клебсиелл был 1:64, инактивированному формалином - 1:64, теотропином - 1:128, гидроксиламином - 1:128; титр антител в РА к не инактивированному штамму протей был 1:128, инактивированному формалином - 1:128, теотропином - 1:256, гидроксиламином - 1:256.

Таким образом, наиболее оптимальным средством инактивации вирусов является теотропин и димер этиленамина, гидроксилламин и теотропин для бактерий, что позволяют после введения животным получить достаточно высокий титр противовирусных и антибактериальных антител - титр противовирусных антител достигает 1:16, антибактериальных - 1:128-1:256.

Список литературы

1. Апатенко, В. М. Смешанные инфекции сельскохозяйственных животных / В.М. Апатенко. - 2-е изд. - Киев: Урожай, 1990. - 176 с.
2. Лукин, О. А. Эпизоотическая ситуация по протейной инфекции в Республике Беларусь / О.А. Лукин [и др.] - Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»: Сборник научных трудов по материалам международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины и зоотехнии», посвященной 80-летию основания учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»г. Витебск, 4-5 ноября 2004 года. - Витебск, 2004. - Т. 40. Ч.1. - С. 167-169.
3. Машеро, В. А. Иммунологическая оценка применения инактивированной вакцины для специфической профилактики вирусных энтеритов новорожденных телят // В. А. Машеро [и др.] // Ученые записки Витебской ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины, Том 41, Вып. 1. - Витебск: Витебск Энерго, 2005. - С. 26-30.
4. Мищенко, В. А. Иммунобиологические свойства вакцины против ротавирусной инфекции крупного рогатого скота / В. А. Мищенко, Т. Б. Никешина // Ветеринарная медицина: науч. тр. / Українська академія аграрних наук; под ред. Б. Т. Стегній. - Харків, 2002. - С. 152-154.

STUDYING OF ANTIGENIC ACTIVITY OF INACTIVATED AND NONINACTIVATED STRAINS OF A DIARRHEA VIRUS, ROTAVIRUS, KLEBSIELLA AND PROTEUS FOR DESIGNING OF INACTIVATED VACCINE

Krasochko P. A., Lomako Y. V., Karpovich V. K., Borisovets D. S.

RUE «S. N. Vysheslenskij Institute of Experimental Veterinary Medicine», Minsk, Belarus

In the article the results of studying of antigenic activity of inactivated and noninactivated strains of a diarrhea virus, rotavirus, klebsiella and proteus, allocated of a biological material from calfs are presented. It is established, that the optimal means for inactivation of viruses are teothropin and dimer ethylenimine, and for bacteria are gidroxilamin and teothropin, that allow to receive high antiviral and antibacterial antibody titer after introduction to an animal.