

3. Сравнительная оценка эффективности применения клеточных и бесклеточных пробиотиков на основе лакто- и бифидобактерий / П.А. Красочко, Н.А. Головнева, Т.А. Зуйкевич, Ю.В. Ломако, Е.С. Журавлева // Проблемы зооинженерии та ветеринарної медицини: Збірник наукових праць Харківської державної зооветеринарної академії. - Х.: РВВ ХДЗВА., 2007. - Випуск 15 (40), ч. 2, т.2 «Ветеринары науки». Харьков, 2007. - С. 30-34.

STUDYING EFFICIENCY OF USAGE ACELLULAR PROBIOTIC "LACTIMET" ON CALVES

Krasochko P. A., Lomako Yu. V., Krasochko I. A., Zuykevich T. A.

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

Results of research of digestion tract microbiocenosis clinically health calves and calves with signs of digestion tract lesions are shown. Medical-prophylactic efficiency of usage acellular probiotic "Lactimet" on calves is presented.

УДК 619:616.98:[578.823.91+579.842.11]:615.37:636.2

ИЗУЧЕНИЕ РЕАКТОГЕННЫХ СВОЙСТВ ВАКЦИН ПРОТИВ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ И ЭШЕРИХИОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА С РАЗЛИЧНЫМИ МАСЛЯНЫМИ АДЬЮВАНТАМИ

Красочко П. А., д-р вет. наук, проф.

Ломако Ю. В., канд. вет. наук

РУП «НИИ экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского
НАН Беларуси» г. Минск, Республика Беларусь

Яромчик Я. П., асп.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной
медицины» г. Витебск, Республика Беларусь

Среди инфекционных заболеваний молодняка крупного рогатого скота, наносящих значительный экономический ущерб животноводству и имеющих широкое распространение, особое место занимают болезни, вызывающие поражение желудочно-кишечного тракта. Так, анализируя эпизоотическую ситуацию по инфекционным болезням в Республике Беларусь, установлено, что число наиболее распространенных заболеваний телят занимает колибактериоз и ротавирусная инфекция. Более того, колибактериоз крупного рогатого скота на протяжении многих лет (анализ данных ветотчетности за 1997-2007 годы) занимает первое место по количеству неблагополучных пунктов, количеству заболевших и павших животных. Ежегодно в республике выявляют от 294 до 380 неблагополучных пунктов по этому заболеванию, в которых болеет от 1260 до 2789 животных. По ротавирусной инфекции (данные ветотчетности за 2002-2007 годы) регистрируется от 24 до 38 неблагополучных пунктов с количеством от 177 до 554 заболевших животных.

Необходимо отметить, что данные заболевания зачастую протекают в ассоциации, что приводит к более тяжелому течению болезни и высокому проценту летальности. В небольшой степени их распространению и стационарности в животноводческих хозяйствах способствуют такие постоянно действующие неблагоприятные факторы как: несбалансированное кормление стельных коров, высокая концентрация поголовья на малых производственных площадях, разрыв биологической системы «мать-плод-новорожденный» и др. [3, 7, 8].

В комплексе мероприятий по профилактике и ликвидации неонатальных диарей телят важная роль отводится специфической профилактике [3, 7].

Так как вакцинация стельных коров против указанных заболеваний проводится повсеместно, высокий уровень заболеваемости телят свидетельствует о необходимос-

ти разработки новых, высокоэффективных ассоциированных средств специфической профилактики ротавирусной инфекции и эшерихиоза крупного рогатого скота.

Вакцинируя животных, следует стремиться получить максимальный иммунный ответ при минимальном проявлении побочных реакций. Эффективность вакцин тесно связана с подбором адъюванта, обладающего максимальным сорбционным действием и иммуностимулирующим эффектом. В качестве адъювантов чаще всего применяются гидроокись алюминия и алюмокалиевые квасцы.

В последнее время убедительно доказана наиболее высокая противозооотическая эффективность при применении эмульсин-вакцин [1, 2, 4, 5, 6].

Адъюванты в виде водно-масляных эмульсий действуют путем формирования подвижного (переносного) депо антигенов, которые являются «мишенью» для клеток иммунной системы. Депо осуществляет медленное выделение антигенов в организме вакцинированных животных и, таким образом, улучшает представление антигена иммунной системе, обеспечивая значительное увеличение иммунного ответа и эффективность применяемых вакцин. Немаловажным является более пролонгированный иммунный ответ организма на введение вакцин с масляными адъювантами, по сравнению с сорбционными. Так, более продолжительное выделение антигена позволяет уменьшить его дозу при вакцинации, а также поддерживает иммунную систему организма в постоянном напряжении, тем самым, провоцируя выработку специфических антител на высоком уровне, что позволяет создавать длительный и стойкий иммунный ответ организма на введение эмульсин-вакцин.

Однако в связи с рядом физических свойств, таких как высокая вязкость, температура застывания, а также высокая реактогенность на месте введения биопрепарата, масляные адъюванты не всегда отвечают требованиям в условиях практики. Масла должны иметь нейтральное значение pH, низкую вязкость и невысокую температуру застывания, высокую термическую и химическую стабильность, хорошую совместимость между собой, оптимальную оптическую плотность и показатель преломления. Дозы масла, введенные в организм животным в составе эмульсионной вакцины, должны быть слабо или умеренно реактогенными, не обладать пирогенными, аллергенными и канцерогенными свойствами.

Безвредность эмульсионных вакцин во многом зависит от реактогенности масляного адъюванта, состоящих из масляной основы и эмульгатора. Эмульгаторы — поверхностно-активные вещества, что предопределяет их активность, как в объеме эмульсии, так и на границе раздела фаз эмульгатора - дисперсионная среда [1].

В ветеринарной практике предложено множество различных масляных адъювантов отечественного и зарубежного производства. В последние годы значительное внимание уделяется таким масляным адъювантам как эмульсиген (США) и Montanide — адъюванты («Сеппик», Франция). Данные масла представляют собой устойчивые минеральные водно-масляные эмульсии типа Вода/Масло, в данном случае антиген находится в дисперсной (прерывной фазе), а не в дисперсионной среде (непрерывной фазе). Они не содержат компонентов животного происхождения, постоянный размер частиц не превышает более 1 микрона.

Диспергированные капельки масла, размером до микрона, обеспечивают максимальную устойчивость эмульсий с минимальным раздражением и реактивностью тканей в месте введения вакцин, что позволяет устранить или снизить нежелательные побочные эффекты, связанные с водно-масляными адъювантами и в то же время вызывать быстрый и сильный иммунный ответ, связанный с адъювантами, основанными на масле.

Материалы и методы. Эмульсиген — водно-масляная эмульсия молочно-белого цвета, однородной консистенции, не содержащая компонентов животного происхождения, предназначенная для смешивания непосредственно с вакцинными антигенами без какой-либо дальнейшей обработки. Легко смешивается с антигенами на основе воды. Его можно использовать отдельно или в комбинации с гидроокисью алюминия и другими адъювантами или иммуностимуляторами.

Липидный компонент эмульсигена — минеральное масло. Другие ингредиенты, включая эмульгирующие вещества — качества NF, Appex 2, отвечают требованиям Фармакопеи Соединенных Штатов (USP), NF, были одобрены USDA для использования при производстве ветеринарных вакцин.

Montanide ISA 70 VG является адъювантом на основе минерального масла, представляет собой бесцветную эмульсию однородной консистенции, не содержит компонентов животного происхождения. В состав входит минеральное масло и эмульгаторы, основанные на манните и очищенной олеиновой кислоте растительного происхождения.

Комитетом по Ветеринарным Медицинским Препаратам (CVMP) MONTANIDE™ адъюванты приняты как безопасные для использования в иммунологических препаратах, включенные в Приложение второе Европейского Совета по Регулированию 2377/90/ЕС.

Целью наших исследований явилось изучение влияния экспериментальных образцов вакцины с масляными адъювантами на клиническое состояние животных.

Реактогенность опытных образцов вакцины против ротавирусной инфекции и эшерихиоза крупного рогатого скота, приготовленных на основе адъювантов — эмульсиген и Montanide ISA 70 VG определяли на крупном рогатом скоте. Работа проводилась в условиях ЗАО «Липовцы» Витебского района.

Экспериментальные образцы вакцины конструировали по нижеприведенным методикам, животным опытные серии биопрепаратов вводили двукратно, внутримышечно в область крупа, в дозах и соотношениях, согласно приведенной схеме и результатов опыта в таблицах (табл. 1, 2, 3). Интервал между инъекциями — 21 день.

Для проведения опыта было сформировано 10 групп животных по 5 голов в каждой, всего в опыте взято 50 голов стельных коров сухостойного периода, живой массой 400–450 кг, в возрасте от 3-х до 6-ти лет. Из них в качестве контроля были взяты пять стельных коров, в том же животноводческом помещении и производственной группе, где были размещены и коровы опытных групп. Животным группы контроля вводили по 5,0 мл изотонического раствора натрия хлорида, также внутримышечно, в область крупа.

На месте инъекции предварительно выстригали шерсть и обрабатывали ватой, смоченной спиртом-ректификатом. Наблюдение вели в течение 45 дней после первичной инъекции опытной серии биопрепаратов. Ежедневно, 2 раза в сутки, утром и вечером, в течение 10 дней после первичной и вторичной иммунизации, измеряли температуру тела, обращали внимание на общие клинические показатели, уровень поедаемости кормов, активность животных. Место инъекции ежедневно обследовали методом пальпации. О реактогенности вакцин судили по наличию местной реакции и по изменению общего состояния организма животных.

Для накопления ротавируса использована культура клеток СПЭВ. Титр ротавируса составил $7,0 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{мл}}$

Адгезивные штаммы эшерихий K99 и K88 культивировали в матрасных колбах на агаровой питательной среде.

При приготовлении опытной вакцины с ротавирусом и корпускулярными клетками *E. coli* с адгезивными антигенами K88 и K99 использовали их 10 млрд. бактериальную взвесь.

Для конструирования экспериментальных образцов вакцины с фимбриальными антигенами *E. coli* K99 и K88, использовали гидроксилламин-фосфатный буфер (ГЛФ буфер), концентрацию бактериальных клеток доводили до 40–50 млрд. микробных тел в 1 мл и выдерживали в течение 24 часов, затем прогревали при температуре 60–65 °С в течение 20 минут, охлаждали до 4 °С и центрифугировали при 10 тыс. об/мин в течение 20 мин. Надосадок сливали в стерильную тару и использовали в качестве фимбриальных адгезинов.

Для приготовления опытных образцов биопрепарата с фимбриальными антигенами *E. coli* K99 и K88, использовали фосфатно-мочевинный буфер (ФМ буфер), доводили концентрацию клеток до 40 млрд. микробных тел в 1 мл, затем прогревали при температуре 65 °С в течение 20 минут и центрифугировали при 15 тыс. об/мин в течение 20 минут. Надосадок использовали как источник фимбриальных антигенов.

Для инактивации полученных бактериальных антигенов использовали 0,1 %, а для инактивации ротавируса 0,2 % раствор теотропина. При введении антигенных компонентов в масляные адъюванты эмульсиген (в соотношении 90:10) и Montanide ISA 70 VG (в соотношении 50:50) температура перемешивания составляла 25–30 °С, с частотой 2000 об/мин в течение 20 минут. Перед перемешиванием нагревали водную и масляную части до температуры 30 °С.

Всего было сконструировано 5 экспериментальных образцов вакцины в различном соотношении антигенных частей и разными масляными адъювантами. Из них — опытный образец вакцины на основе ротавируса и корпускулярных клеток *E. coli* с адгезивными антигенами K99 и K88. Два образца биопрепарата на основе ротавируса и адгезинов *E. coli* K99, K88, полученных с использованием ГЛФ буфера и два образца вакцины на основе ротавируса и адгезинов *E. coli* K99, K88, полученных с использованием ФМ буфера.

Опытные образцы были сконструированы в одинаковых условиях, с одинаковым промежутком времени получения антигенных монокомпонентов и изготовления экспериментальной серии.

Полноту инактивации биопрепаратов, стерильность, безвредность, реактогенность, иммуногенность и стабильность эмульсий определяли по общепринятым методикам.

Результаты работы. На первые сутки после первичной вакцинации у некоторых коров во всех опытных группах температура тела повысилась до 39,8–40,4 °С. На следующий день температура тела снизилась до нормы и оставалась в ее пределах на протяжении всего опыта. Животные охотно принимали корм и воду, активно пользовались моционом. При обследовании местной реакции методом пальпации у некоторых животных обнаружены горячие болезненные припухлости твердой консистенции, диаметром 2,5 – 3 см. Воспалительные очаги на месте инъекции после первичной и повторной вакцинации оставались на протяжении всего опыта. Путем анализа по инвентарным номерам были установлены группы реагирующих животных.

Результаты обследования местной клинической реакции у коров, которым вводили экспериментальные образцы вакцины на основе ротавируса и корпускулярных клеток *E. coli* с адгезивными антигенами K99 и K88 представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Реактогенность корпускулярной вакцины с масляными адъювантами

Антиген	Адъювант	Кол-во животных в группе	Доза вакцины	Реакция на месте введения	
				Кол-во реагирующих животных	Процент
Ротавирус+ <i>E. coli</i> (K88+K99) 2:1:1	ISA-70	5	3,0	1	20
Ротавирус+ <i>E. coli</i> (K88+K99) 2:1:1	ISA -70	5	5,0	3	60
Ротавирус+ <i>E. coli</i> (K88+K99) 2:1:1	Эмульсиген	5	5,0	1	20

Результаты обследования местной клинической реакции у коров, которым вводили опытные образцы вакцины на основе ротавируса и фимбриальных антигенов *E. coli* K99 и K88, полученных с использованием фосфатно-мочевинного буфера представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Реактогенность вакцины на основе фимбриальных адгезинов E. coli K99 и K88 с масляными адьювантами (ФМ буфер)

Антиген	Адьювант	Кол-во животных в группе	Доза вакцины	Реакция на месте введения	
				Кол-во реагирующих животных	Процент
PВ+адгезины (K88+K99) 1:1:1	ISA -70	5	3,0	3	60
PВ+адгезины (K88+K99) 2:1:1	ISA -70	5	5,0	3	60
PВ+адгезины (K88+K99) 2:1:1	Эмульсиген	5	5,0	-	0

Результаты обследования местной реакции у животных, которым вводили опытные вакцины на основе ротавируса и фимбриальных адгезинов E.coli K99 и K88, полученных с использованием гидраксиламин-фосфатного буфера представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Реактогенность вакцины на основе фимбриальных адгезинов с масляными адьювантами (ГЛФ буфер)

Антиген	Адьювант	Кол-во животных в группе	Доза вакцины	Реакция на месте введения	
				Кол-во реагирующих животных	Процент
PВ+адгезины (K88+K99) 1:1:1	ISA -70	5	3,0	3	60
PВ+адгезины (K88+K99) 2:1:1	ISA -70	5	5,0	3	60
PВ+адгезины (K88+K99) 2:1:1	Эмульсиген	5	5,0	-	0

По результатам полученных данных экспериментальные образцы вакцины с масляным адьювантом на основе эмульгатора ISA-70 VG, при соотношении с антигенным компонентом опытных образцов вакцины 1:1 и внутримышечном введении в дозе 5,0 мл, обладали достаточной реактогенностью для крупного рогатого скота. Практически во всех опытных группах количество реагирующих животных составило 60 %. При уменьшении дозы до 3,0 мл данный показатель уменьшился до 20 %.

Опытные образцы вакцины с масляным адьювантом на основе эмульгатора эмульсиген, при соотношении с антигенным компонентом опытных образцов вакцины 1:9, являются умеренно реактогенными для животных при дозе 5 мл. При введении опытной корпускулярной вакцины с данным адьювантом приведенные клинические показатели реактогенности составили 20 %, в остальных группах процент количества реагирующих коров от общего числа животных в группе был равен нулю.

Необходимо отметить, что при пункции и пальпации в области обнаруженных воспалительных очагов воспалительный экссудат отсутствовал на протяжении всего опыта.

Выводы и перспективы дальнейших исследований. Исходя из полученных данных, можно заключить, что опытные образцы вакцины с масляным адьювантом на

основе эмульгатора ISA-70 VG в дозе 5 мл являются достаточно реактогенным для крупного рогатого скота. При уменьшении дозы до 3 мл клинические показатели реактогенности уменьшаются с 60 до 20 %, что предопределяет дозу введения при выборе данного масляного адьюванта.

Учитывая, что при введении опытных образцов вакцины с масляным адьювантом на основе эмульгатора эмульсиген дозе 5 мл практически не было обнаружено клинических изменений, можно утверждать, что они являются умеренно реактогенными для животных и рекомендуются для иммунизации в этой дозе введения биопрепаратов.

Список литературы

1. Апатенко, В. М. Реактогенность масляных адьювантов в составе противопастереллезной вакцины / В. М. Апатенко, А. Н. Сосницкий, В. П. Заболотная // 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. — Витебск, 2004. — Т. 40, Ч.1. — С. 168-169.
2. Барашков, А. Н. Совершенствование средств активной специфической профилактики пастереллеза у крупного рогатого скота / А. Н. Барашков, Ю. В. Ханецкий, А. А. Каменский // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»: Сборник научных трудов по материалам международной научно-практической конференции «Проблемы инфекционных болезней животных на современном этапе и пути их решения», г. Витебск, 1-2 ноября 2007. — Витебск, 2007. — Т. 43, Ч.2. — С. 13-15.
3. Гуненков, В. В. Профилактика вирусных гастроэнтеритов телят / В. В. Гуненков, А. Е. Зеленев, Н. Л. Соколова // Ветеринария. — 2002. — №12 — С. 21-25.
4. Жих, Г. И. Сравнительная оценка эффективности вакцин против рота- и коронавирусной инфекций новорожденных телят с разными адьювантами / Г. И. Жих, Л. В. Белянко // Материалы международной научно-практической конференции «Ветеринарные и зооинженерные проблемы животноводства», г. Витебск, 28-29 ноября 1996 г. — С. 103.
5. Красочко, П. А. Изучение иммунного ответа у животных после введения инактивированных вирусов инфекционного ринотрахеита, диареи, рота- и коронавирусной инфекций крупного рогатого скота с различными адьювантами / П. А. Красочко, С. В. Бойчук. — Минск: Ветеринарная патология; — 2005. — №2. — С. 54-55.
6. Показатели клеточного и гуморального иммунитета у кроликов при введении антигена кишечной палочки К-88, включенного в липосомы / П. И. Уласович [и др.] — Актуальные проблемы патологии сельскохозяйственных животных. Материалы международной научно-практической конференции 5-6 октября 2000 / Научный редактор Н. Н. Андросик. — Минск: Хата, 2000 — С. 340-342.
7. Специфическая профилактика вирусно-бактериальных пневмоэнтеритов молодняка крупного рогатого скота / П.А. Красочко [и др.] // Ветеринарная наука — производству. Научные труды РНИУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского Национальной академии наук Беларуси» Т.38 по материалам международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины в условиях современного животноводства», посвященной 75-летию Института экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского НАН Беларуси и 100-летию со дня рождения академика Р. С. Чеботарева. — Минск. — 2005. — С.302-305.
8. Detection of the main enteropathogens in diarrhoeic cases in calves. / Ruiz-Santa-Quiteria-JA; Garcia-A; Orden-JA; Cid-D; de-la-Fuente-R; de-la-Fuente-R // Medicina-Veterinaria.- 2000, 17: 6, 38 ref. P. 155-162.

STUDYING OF REACTOGENIC PROPERTIES OF THE VACCINE AGAINST ROTAVIRUS INFECTION AND ESCHERICHIOSIS OF CATTLE WITH THE DIFFERENT OIL ADJUVANTS

Krasochko P. A., Lomako Yu. V.,

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

Yaromchik Ya. P.

SO «Vitebsk State Academy of the Veterinary Medicine» Vitebsk, Belarus

The characteristic is presented and results of comparative research of different oil adjuvantes – emulsigen and montanid (ISA-70) are shown on clinical condition of animals after immunization against rotavirus infection and escherichiosis of cattle. Five cc dose of vaccine with ISA-70 adjuvant had high reactogenicity, but usage of emulsigen in the same dosage did not cause any reaction at the place of injection.

УДК 619: 636.2 – 591.3 – 52/19.414

ПРОБЛЕМИ У ВИЗНАЧЕННІ КРИТЕРІЇВ МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНОГО СТАНУ ОРГАНІВ ГЕМОІМУНОПОЕЗУ У НОВОНАРОДЖЕНИХ ССАВЦІВ

Криштофорова Б. В., д-р вет. наук, проф.

Лемещенко В. В., д-р вет. наук

Південний філіал «Кримський агротехнологічний університет»
Національного аграрного університету, Сімферополь

Для рішення проблеми підвищення життєздатності тварин і людей, особливо у новонароджений період постнатального онтогенезу, в умовах сучасної екології, необхідно з'ясувати морфофункціональні особливості органів гемоімунопоезу, що забезпечують природний захист їх організму. В науковій літературі, здебільшого в лабораторних тварин і людей [4, 6, 14]. Доведені механізми взаємодії антитіл з антигенами ендо- і екзогенного походження [5, 10]. Відповідно до результатів проведених досліджень розроблена класифікація утворів гемоімунопоезу. Наразі існує розподіл органів гемоімунопоезу в ссавців на дві групи: центральні (первинні) і периферичні (вторинні). До центральних органів імунної системи автори відносять червоний кістковий мозок і тимус, а також клоакальну сумку у птахів. В центральних органах гемоімунопоезу відбувається, головним чином, утворення і розвиток Т- і В-лімфоцитів, які мігрують у периферичні лімфоїдні органи, кров і лімфу. В периферичних лімфоїдних органах лімфоцити диференціюються, набуваючи здатність розпізнавати „своє” і „чуже”, а також за наявності плазматичних клітин виробляються антитіла проти певних антигенів. Така класифікація органів гемоімунопоезу існує й нині, незважаючи на досить вагомі нові відомості щодо їх морфофункціонального стану.

Проте у маторнатних видів тварин дослідження на тканинному і органному рівнях органів гемоімунопоезу, які забезпечують ендекологію організму, дають підставу для визначення іншої їх ієрархії в кооперації захисту організму [3, 8, 16].

Проведені дослідження органів гемоімунопоезу у телят і поросят новонародженого періоду свідчать, що за умовою утворення клітин їх можна поділити на дві групи. До першої групи належать органи універсального гемоімунопоезу, для яких притаманне утворення всіх клітин, що потрапляють у кров і лімфу, та лімфоїдні утвори, які стратегічно розташовані по всьому організму. Функцію універсального гемоімунопоезу виконують кісткові органи, які проходять шлях енхондрального остеогенезу. У плодів у хрящових закладках утворюється грубоволокниста кісткова тканина, що сприяє формуванню червоного кісткового мозку. До другої групи відносяться