

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ЗАВИСИМОСТИ МЕЖДУ ЗАЩИТНЫМИ
СВОЙСТВАМИ И ВЕЛИЧИНОЙ ТИТРА АНТИТЕЛ
ПРИ ИММУНИЗАЦИИ МЫШЕЙ РАЗЛИЧНЫМИ ФРАКЦИЯМИ
АНТИГЕНА *BORDETELLA BRONCHISEPTICA***

А.Ю. Финогенов, Е.Г. Финогенова, М.М. Мистейко

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

(Поступила в редакцию 28.06.2013 г.)

Аннотация. В статье приведено сравнение результатов опыта по определению защитного действия различных фракций антигена *Bordetella bronchiseptica* и величины титра антител у мышей после иммунизации данным антигеном. Определено, что наличие у мышей защитных титров антител не менее чем 1:16 обеспечивает защиту мыши от заражения этим антигеном.

Summary. The article compares the results of the experiment to determine the protective effect of different fractions of *Bordetella bronchiseptica* antigen and antibody titer values in mice following immunization with this antigen. It was determined that the presence of the mouse protective antibodies galleries least 1:16 protects mice from infection with this antigen.

Введение. Использование вакцинных препаратов давно стало основой специфической профилактики большинства инфекционных заболеваний, в том числе и бордетеллиоза свиней. Бордетеллиоз (инфекционный атрофический ринит) свиней относится к довольно «молодым» заболеваниям. Впервые болезнь описана в 1829 г. Франком в Германии. Болезнь причиняет значительный ущерб свиноводству. Летальность колеблется в пределах 7-10%, но главный ущерб состоит в снижении привесов больных поросят на 30-40%, перерасходе кормов на их дорастивание, недополучение товарной свинины [5].

Бордетеллиоз в настоящее время зарегистрирован во многих странах мира. Среди них такие страны как ФРГ, Англия, Польша, Франция, Россия, Украина и др. [7].

Поскольку данное заболевание является довольно молодым, то и разработкой методов специфической профилактики этого заболевания занялись сравнительно недавно.

К настоящему моменту во многих странах мира продолжают поиски новых средств специфической профилактики бордетеллезной инфекции [8, 9].

В Республики Беларусь также ведется работа по разработки эффективных средств специфической профилактики бордетеллиоза свиней и отработки мер борьбы с этим заболеванием [3, 4, 6].

При разработке вакцинного препарата необходима отработка методов контроля иммуногенности вакцины. Ранее наиболее распространенным методом оценки иммуногенности вакцинных препаратов являлось прямое заражение лабораторных животных (чаще мышей) предварительно иммунизированных испытуемой вакциной. Данный метод имеет ряд отрицательных моментов, а именно: длительность и трудоемкость опыта и низкая степень корреляции результатов при повторях. При этом методе на процент гибели животных влияют многие факторы: применяемая среда и условия культивирования, время инкубации и др. Поэтому в последнее время все чаще в качестве метода контроля иммуногенности вакцины стали использовать определение титра антител к антигенам, входящим в состав вакцины после иммунизации животных. Данный метод более простой и быстрый в применении и дает более стабильные результаты. Однако при определении величины титра антител у иммунизированных животных более правильным является первоначальное определение степени корреляции величины титра антител и защиты животного при прямом заражении применительно к данному антигену.

Цель работы – определение величины титра антител к антигену *Bordetella bronchiseptica*, которое обеспечивает защиту животного при прямом заражении этим антигеном. Кроме того, в данном опыте были проведены исследования не только цельноклеточного антигена, но и его отдельных фракций с разной молекулярной массой.

Материал и методика исследований. В работе был использован штамм *Bordetella bronchiseptica* КМИЭВ–В120, выделенный из легочной ткани поросенка, больного пневмонией и депонированный в коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского». Данный штамм культивировали на агаре Хоттингера при 37⁰С в течение суток. Смыв штамма с агара осуществляли забуференным физиологическим раствором (рН 7,2-7,4) с содержанием 0,5% раствора формалина.

Отмывку смыва от остатков питательной среды проводили центрифугированием при 6000 оборотов в минуту 30 минут. Полученный осадок бактериальных клеток разводили в забуференном физиологическом растворе (рН 7,2-7,4) с содержанием 0,5% раствора формалина, который вносили до первоначального объема. Инактивацию отмытого антигена проводили 0,5% раствором формалина при температуре 37⁰С на протяжении 72 часов. Контроль полноты инактивации осуществля-

ли путем посева антигена на МПА, МПБ, агар Сабуро и среду Кита-Тароцци. При отсутствии роста инактивацию считали полной.

Ультразвуковое разрушение клеток для получения фракций антигена проводили при частоте 1-1,3 мГц. Для этого очищенный от питательной среды смыв антигена вносили в свинцовый стакан и подключали ультразвук. Двукратно повторяли следующий цикл: четыре раза проводили ультразвук по 10 минут и 5 минут перерыв.

Контроль полноты разрушения клеток проводили путем микроскопии мазка. При необходимости проводили повторный курс ультразвука. Ультразвуковое разрушение клеток прекращали, если в поле зрения микроскопа находилось более 90% разрушенных клеток.

Для осаждения разрушенных клеточных оболочек полученный дезинтегрat центрифугировали при 2500 об/мин 15 минут. В полученном надосадке измеряли концентрацию общего белка биуретовым методом на автоматическом биохимическом анализаторе Автолайзер.

Разделение фракций антигена проводили с использованием центрифужных фильтров для концентрации и разделения биологических растворов «Amicon Ultra» производства фирмы Millipore следующих размеров: 3 кДа, 10 кДа, 30 кДа, 50 кДа, 100 кДа. Для проведения фракционирования полученный клеточный дезинтегрat вносили в фильтр размером 100 кДа и проводили центрифугирование при 3000 об/мин 20 минут. После окончания центрифугирования объем антигена, который остался над фильтром переносили в стакан с подписью более 100 кДа и откладывали для дальнейших опытов, а тот объем, который профильтровался в центрифужный стакан, переносили в емкость с подписью менее 100 кДа и подвергали дальнейшему фильтрованию. Так проводили последовательное отделение фракций до последнего фильтра.

После последовательного отделения всех фракций был измерен полученный объем каждой фракции и определено содержание белка. Определение общего белка проводили на биохимическом анализаторе согласно инструкции к набору.

После получения различных фракций антигена был проведен опыт по определению защитных свойств как цельноклеточного антигена, так и отдельных его фракций.

Для проведения опыта было сформировано 6 групп мышей по 12 голов в каждой группе (5 групп опытных и 1 контрольная). Мышам первой опытной группы вводили цельноклеточный антиген, второй группы – фракцию антигена более 100 кДа, третьей – фракцию 50-100 кДа, четвертой группы фракцию 30-50 кДа, пятой группы – фракцию 10-30 кДа. Мыши 6 группы служили контролем. Антиген и его фрак-

ции всем мышам вводили внутримышечно в объеме 0,3 мл. Перед введением мышам полученные фракции антигена смешивали с адьювантом – гель гидроокиси алюминия. После проведения иммунизации мышей выдерживали 21 день для выработки у них иммунного ответа. В этот период за мышами вели ежедневное наблюдение.

Через 21 день после введения антигена от 6 мышей из каждой группы отбирали кровь для определения величины титра антител к *Bordetella bronchiseptica*. Титр антител у мышей определяли в реакции агглютинации.

Оставшимся 6 мышам из каждой группы вводили суточную культуру *Bordetella bronchiseptica* в концентрации 2 ЛД₅₀. Величину ЛД₅₀ определяли в отдельном опыте по общепринятой методике. Расчет ЛД₅₀ проводили методом Кербера в модификации Ашмарина [1,2] по формуле: $ЛД_{50} = -lgD_n - d(\sum l_i - 0,5)$, где D_n - доза, дающая максимальный эффект; l_i - отношение числа животных, погибших при заражении данной дозой, к общему числу зараженных этой дозой; i - номер дозы (минимальную дозу принимают за первую); d - логарифм кратности разведения.

Суточную культуру вводили внутрибрюшинно в дозе 0,4 мл. После заражения за мышами вели наблюдение на протяжении 10 суток. Учитывали гибель мышей в каждой из групп. По итогам опыта определяли процент выживших мышей в каждой из групп, по которому судили о протективных свойствах каждой фракции антигена *Bordetella bronchiseptica*.

После проведения опыта сравнивали величину титра антител у иммунизированных мышей и процент выживших животных после иммунизации каждой фракцией антигена.

Результаты исследований и их обсуждение. После проведения фракционирования антигена *Bordetella bronchiseptica* было получено 4 фракции антигена с различной молекулярной массой (таблица 1).

Таблица 1 – Объем и содержание общего белка в разных фракциях *Bordetella bronchiseptica*.

Название фракции	Объем, мл	Содержание общего белка, г/л
Фракция более 100 кДа	10	5,35
Фракция 50-100 кДа	7	5,38
Фракция 30-50 кДа	5	0,8
Фракция 10-30 кДа	3	1,07

Последние 2 фракции с использованием центрифужного фильтра на 3 кДа не получились в виду того, что после отделения фракции на фильтре 10 кДа не отделилась фракция менее 10 кДа.

При определении величины титра антител у иммунизированных мышей были получены результаты, представленные в таблице 2.

Таблица 2 – Результаты опыта по определению титра антител

№ мыши	Опытные группы					Контрольная 6
	1	2	3	4	5	
	Фракция антигена, кДа					
	Цельно-клеточный	Более 100	50-100	30-50	10-30	
Титр антител						
1	1:64	1:32	1:32	0	0	0
2	1:64	1:32	1:8	0	0	0
3	1:64	1:32	1:16	0	0	0
4	1:64	1:32	1:32	0	0	0
5	1:64	1:32	1:8	0	0	0
6	1:128	1:64	1:16	0	0	0
среднее	1:74,7	1:37,3	1:18,6	0	0	0
+/-	10,67	5,3	4,4	0	0	0

Как видно из приведенной таблицы, наиболее высокий титр антител получен в 1 группе мышей, которым вводился цельноклеточный антиген и составил $1:74,7 \pm 10,67$. Также высокий титр антител был получен во второй группе мышей, которым вводилась фракция антигена более 100 кДа, и составил $1:37,3 \pm 5,3$, что в 2 раза ниже, чем в первой группе, но данный титр антител также является защитным. В 3 группе мышей, которым вводилась фракция антигена 50-100 кДа, титр антител был еще ниже и составил $1:18,6 \pm 4,4$, что в 2 раза ниже, чем во 2 группе. В данной группе у 4 животных из 6 также отмечен защитный титр антител. В 4 и 5 опытной и 6 контрольной группах в сыворотке крови антител к *Bordetella bronchiseptica* не обнаружено. Это говорит о том, что фракции антигена 30-50 кДа и 10-30 кДа являются неиммуногенными.

Результаты опыта по определению протективных свойств различных фракций *Bordetella bronchiseptica* представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Результаты опыта по определению протективных свойств различных фракций штамма *Bordetella bronchiseptica*

№ группы	Фракция	Количество животных	Пало, гол	Выжило, гол
1	Цельноклеточный	6	0	6
2	более 100 кДа	6	0	6
3	50-100 кДа	6	0	6
4	30-50 кДа	6	6	0
5	10-30 кДа	6	6	0
6	контроль	6	6	0

Как видно из приведенной таблицы, в первых трех опытных группах мышей, которых иммунизировали цельноклеточным антигеном и фракциями более 100 кДа и 50-100 кДа, все животные остались живы, т.е. цельноклеточный антиген и данные фракции антигена обладают дос-

таточными протективными свойствами. В группах мышей, которых иммунизировали фракциями 30-50 кДа и 10-30 кДа, наблюдалась гибель всех мышей, т.е. данные фракции не обладают защитным действием. В контрольной группе также наблюдалась гибель всех мышей.

Таким образом, анализируя данные по величине титра антител и количеству выживших мышей хорошо заметна корреляция. Так, в первых 3 группах мышей, которых иммунизировали цельноклеточным антигеном и фракциями антигена более 100 кДа и 50-100 кДа, у мышей отмечался титр антител в пределах от 1:8 до 1:128. Также в этих группах после заражения культурой *Bordetella bronchiseptica* все мыши были живы. В 4 и 5 опытных группах антител к *Bordetella bronchiseptica* обнаружено не было и в этих же группах отмечена гибель всех мышей при введении им культуры *Bordetella bronchiseptica*. Это говорит о том, что наличие титра антител к антигену *Bordetella bronchiseptica* свидетельствует о защите животного от этого заболевания.

Заключение. Результаты опыта по сравнению величины титра антител после иммунизации мышей различными фракциями антигена *Bordetella bronchiseptica* и проценту выживших иммунизированных мышей после заражения их культурой *Bordetella bronchiseptica* свидетельствуют о том, что наличие в организме мышей антител к *Bordetella bronchiseptica* в титре от 1:8 обеспечивает наличие стойкого иммунитета при инфицировании их данной культурой. Поэтому определение титра антител является вполне информативным методом при оценке иммуногенных свойств вакцины против бордетеллеоза свиней. В конструировании вакцин против бордетеллеоза свиней помимо цельноклеточного антигена *Bordetella bronchiseptica* оправданным является применение его фракций величиной более 100 кДа и 50-100 кДа, которые обеспечивают формирование напряженного иммунитета. Применение в составе вакцин отдельных фракций антигена будет способствовать снижению реактогенности вакцины и уменьшению антигенной нагрузки на организм свиней.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ашмарин, И.П., Воробьев, А.А. Вычисление LD50 при малом числе подопытных животных // Журнал микробиологии. - 1959. - № 2. - С. 102-108;
2. Ашмарин, И.П., Воробьев, А.А. Статистические методы в микробиологических исследованиях. - М.: Медгиз, 1962. - 125 с.
3. Бабина, М. П. Методические рекомендации по ветеринарно-санитарной экспертизе продуктов убоя свиней при бордетеллезной инфекции/М. П. Бабина, А. А. Вербицкий, С. С. Стомма ; рец. В. В. Максимович, В. С. Прудников. - 2008
4. Иммунологическая эффективность экспериментального образца вакцины против бордетеллезной инфекции свиней. / Андросик Н.Н., Толяронок Г.Е., Андросик Л.Д., Вербицкий А.А. / Проблемы патологии, санитарии и бесплодия в животноводстве: Материалы междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения академиков ака-

демии наук Беларуси Х.С. Горегляда и М.К. Юсковца, г. Минск, 10-11 декабря 1998 г. - Мн., 1998. - С. 79-80.

5. Инфекционные болезни животных / Б. Ф. Бессарабов, А. А. Вашу-И74 тин, Е. С. Воронин и др.; Под ред. А. А. Сидорчука. — М.: Колос, 2007. — 671 с.

6. Методические рекомендации по диагностике и мерам борьбы с бордетеллезом свиней/А. А. Вербицкий [и др.]; рец. В. В. Максимович, И. Н. Громов. - 2008

7. Ятусевич, А.И., Андросик, Н.Н. Малоизученные инфекционные и инвазионные болезни домашних животных. - Мн.: Ураджай, 2001. - 231 с.

8. Dugal, F., Girard, C., Jacoues, M. Adherence of Bordetella bronchiseptica 276 to uorcine trachea maintained in organ culture. // Applied and Environmental Microbiology. - 1990. - Vol. 56. - №6. - P. 1523-1529.

9. Kielstein, P., Schimmel, D., Desens, H. Zur Wirksamkeit und Einsatzkonzeption der Impfstoffe EP-Vac Bordetella und EP-Vac Pasteurella "Dessau". // Mh. Veter.-Med. - 1987. - Vol. 42. - №5. - P. 212-215.

УДК 636.2083:611.786

ВЛИЯНИЕ ДВИГАТЕЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ НА КАЧЕСТВО КОПЫТЦЕВОГО РОГА У КОРОВ

Е.В. Ховайло, А.Л. Лях, В.А. Ховайло

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

(Поступила в редакцию 30.06.2013 г.)

Аннотация. *Изучено гистологическое строение копытцевого рога и его биохимический состав у коров с язвой Рустергольца и пододерматитом при разных системах содержания. Выявлены закономерности содержания микроэлементов в копытцевом роге. Подтверждено положительное влияние двигательной активности коров на биохимический состав и морфологию копытцевого рога.*

Summary. *The histological structure and biochemical composition of the hoof horn of cows with Rusterholts ulcers and pododermatitis was studied in different housing systems. The regularities of the trace element content in the hoof horn were revealed. It has been stated that physical activity confirmed the effect on the biochemical composition and morphology of hoof horn.*

Введение. В связи с интенсификацией животноводства в Республике Беларусь отмечается тенденция к росту числа заболеваний копытец у крупного рогатого скота [3, 4]. Ортопедические болезни у коров наносят значительный экономический ущерб хозяйствам за счет снижения продуктивности (установлено, что при первых признаках деформации копытец от каждой дойной коровы не получают 4% молока), выбраковки большого количества больных животных, причем чаще высокопродуктивных. Заболеваемость копытец у коров в отдель-