

**ГОУ ВПО «МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ПРИКЛАДНОЙ БИОТЕХНОЛОГИИ»**



**На правах рукописи**



**003451552**

**БЕЛИКОВ Дмитрий Владимирович**

**РАЗРАБОТКА ЛАБОРАТОРНОЙ МОДЕЛИ ДЛЯ ОЦЕНКИ  
АНТИГЕНОВ САЛЬМОНЕЛЛ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ  
ОРАЛЬНОЙ ИММУНИЗАЦИИ ЖИВОТНЫХ**

**16.00.03 – Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,  
микология и иммунология**

**Автореферат  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата ветеринарных наук**

**30 ОКТ 2008**

**МОСКВА 2008**

Работа выполнена в ГОУ ВПО «Московский государственный университет прикладной биотехнологии» (МГУПБ)

Научный руководитель: доктор ветеринарных наук, профессор  
Скородумов Дмитрий Иванович  
(МГУПБ)

Официальные оппоненты: доктор ветеринарных наук, профессор  
Ленченко Е.М. (МГУПБ)

кандидат ветеринарных наук, доцент  
Крупальник В.Л. (МГАВМиБ)

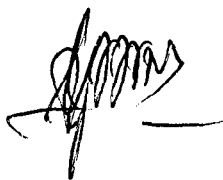
Ведущая организация: ГНУ Северо-Кавказский зональный  
научно-исследовательский  
ветеринарный институт

Защита состоится 21. 11. 2008 г. в 14<sup>00</sup> часов на заседании  
диссертационного совета Д 212.149.03 при ГОУ ВПО «Московский  
государственный университет прикладной биотехнологии» по адресу: 109316,  
Москва, ул. Талалихина, 33.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Московского  
государственного университета прикладной биотехнологии.

Автореферат разослан «8» октября 2008 г.

Ученый секретарь  
диссертационного совета,  
канд. вет. наук, проф.



Серегин И.Г.

## **1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **1.1. Актуальность темы**

Среди инфекционных болезней молодняка значительный удельный вес составляет сальмонеллез, который распространен повсеместно и представляет опасность также для здоровья людей (Шустер Б.Ю., Малахов Ю.А., 1981; Шустер Б.Ю., 1987; Гараев И.М., 1991; Максимович В.В., 1994; Бухарин О.В., 2000).

В основе борьбы с сальмонеллезом, помимо общих ветеринарно-санитарных мероприятий, лежит специфическая профилактика. Для этой цели широко применяют инаktivированные и живые вакцины (Шустер Б.Ю., 1987; Гараев И.М., 1991; Заерко В.И., 1996; Галиакберова Н.И., 2002; Романов Е.А., 2005; Ленев С.В. и соавт., 2007; Van der Walt M.L., 2001). Общеизвестно, что живые вакцины более иммуногенны, способны индуцировать гуморальный и клеточный иммунитет, но к вакцинным штаммам, предъявляются жесткие требования по показателю безвредности, а также возникают ограничения на применение химиотерапевтических и пробиотических препаратов. Достоинствами инаktivированных вакцин является их экологическая безопасность, возможность параллельного использования пробиотиков и антибиотиков. Однако при парентеральном применении инаktivированные вакцины малоэффективны как индукторы мукозального и клеточного иммунитета. Продолжаются исследования по изысканию более эффективных и безопасных живых и повышению иммуногенности инаktivированных сальмонеллезных вакцин (Ахмадеев Р.М. и др., 2003; Русалев В.С. и др., 2000).

Менее изученным остается вопрос о перспективе использования инаktivированных бактериальных вакцин для оральной иммунизации животных. Пероральная иммунизация заслуживает внимания, поскольку при таком способе введения иммуногена индуцируется мукозальный иммунитет, кроме того, введение препарата в корм или воду позволяет проводить групповую иммунизацию животных (Mutwiri G., Bowesock T., Kidane A. et al., 2002). Одной из основных проблем оральной иммунизации представляется слабая иммуногенность большинства антигенов, которые разрушаются под действием желудочного сока, ферментов, микроорганизмов. Таким образом, разработка методов эффективной доставки антигенов к специфической иммунной системе, ассоциированной с желудочно-кишечным трактом, является одним из приоритетных направлений исследований. При разработке препаратов для оральной иммунизации требуют дальнейшего изучения: использование защитных веществ; исследование методов и критериев оценки бактериальных препаратов в лабораторных условиях; определение оптимальных схем оральной иммунизации животных. Для решения перечисленных задач необходимо, в том числе, наличие адекватной лабораторной модели, поскольку естественно восприимчивые животные в экспериментальных исследованиях могут быть использованы в ограниченном количестве.

### **1.2. Цель работы**

Разработать лабораторные модели для оценки безвредности и иммуногенности препаратов, содержащих инаktivированные сальмонеллы и

предназначенных для оральной иммунизации животных; изучить влияние защитных веществ на распределение орально введенных антигенов сальмонелл в желудочно-кишечном тракте, а также формирование иммунного ответа у животных.

### **1.3. Задачи исследования**

- Изучить действие нативного желудочного сока на жизнеспособность сальмонелл и сохранение ими антигенных свойств.
- Исследовать влияние защитных веществ на сохранение сальмонеллами антигенных свойств в желудочно-кишечном тракте животных при оральной иммунизации.
- Определить влияние предшествующей оральной иммунизации животных на динамику антигенов сальмонелл в желудочно-кишечном тракте и крови животных при ревакцинации.
- Изучить динамику синтеза гуморальных и секреторных кишечных антител после оральной инокуляции мышам антигенов сальмонелл с защитными веществами и без них.
- Исследовать безвредность и антигенность экспериментального образца инактивированного антигена сальмонелл при оральном введении на поросятах.
- Разработать лабораторные модели для оценки безвредности и иммуногенности препаратов, содержащих инактивированные сальмонеллы и предназначенных для оральной иммунизации животных.

### **1.4. Научная новизна**

- Получены новые данные о влиянии защитных веществ на распределение орально введенных антигенов сальмонелл в желудочно-кишечном тракте мышей (лабораторная модель).
- Установлены особенности динамики антигенов сальмонелл в желудочно-кишечном тракте и крови лабораторных мышей при оральной ревакцинации.
- Выявлена эффективность агар-агара как вещества, обеспечивающего сохранение активности орально введенных антигенов сальмонелл в желудочно-кишечном тракте.
- Установлено влияние защитных веществ на синтез антител при оральной иммунизации мышей антигенами сальмонелл.
- В опытах оральной иммунизации беспородных белых мышей выявлена корреляция титров гуморальных антител и уровня специфической защиты животных.

### **1.5. Практическая значимость**

Полученные результаты исследований позволяют рекомендовать:

- лабораторные модели для оценки безвредности и иммуногенности препаратов из инактивированных сальмонелл и предназначенных для оральной иммунизации животных;
- агар-агар как вещество, защищающее антигены сальмонелл от действия желудочного сока и ферментов желудочно-кишечного тракта;
- методы косвенного контроля эффективности оральной иммунизации животных против сальмонеллеза инактивированными препаратами путем

выявления антигенов и антител в фекалиях и крови иммунизированных животных.

По результатам исследований разработаны методические рекомендации «Лабораторная модель для оценки препаратов, содержащих инактивированные сальмонеллы и предназначенных для оральной иммунизации животных» (рассмотрены и одобрены Ученым Советом ветеринарно-санитарного факультета Московского государственного университета прикладной биотехнологии от 20.03.2008, протокол № 42).

#### **1.6. Апробация работы**

Материалы диссертации доложены на заседаниях ученого совета ветеринарно-санитарного факультета МГУПБ (2006, 2007); на 15-м Московском ветеринарном конгрессе 23 апреля, 2007 г.; на 6-й международной научной конференции студентов и молодых ученых МГУПБ, 2007.

#### **1.7. Публикации**

По теме диссертационной работы опубликовано 5 работ, в том числе 1 в журнале, рецензируемом ВАК.

#### **1.8. Основные положения, выносимые на защиту:**

- экспериментальные данные о распределении орально введенных антигенов сальмонелл в желудочно-кишечном тракте и крови животных и влиянии на этот процесс защитных веществ (агар-агар, пектин);

- влияние предшествующей оральной иммунизации на динамику антигенов сальмонелл в желудочно-кишечном тракте и крови животных при ревакцинации;

- особенности иммунного ответа у животных, орально иммунизированных антигенами сальмонелл с защитными веществами;

- рекомендации по лабораторному контролю безвредности и иммуногенности препаратов, содержащих инактивированные сальмонеллы и предназначенных для оральной иммунизации поросят против сальмонеллеза.

#### **1.9. Объем работы**

Диссертация изложена на 154 страницах машинописного текста и включает: введение, обзор литературы, собственные исследования, обсуждение результатов, выводы, практические предложения, содержит 25 таблиц и 33 рисунка. Список литературы содержит 259 наименований, из них 174 отечественных и 85 зарубежных.

## **2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1. Материалы и методы**

Работа выполнена в период с 2004 по 2008 гг. на кафедре микробиологии и иммунологии Московского государственного университета прикладной биотехнологии, в отделе бактериальных препаратов ВНИИТИБП, лаборатории микробиологии ВНИИЭВ и в ООО «Возрождение» Ефремовского района Тульской области в соответствии с планом НИР МГУПБ (тема 7-1-06.3).

В опытах использовали около 850 беспородных мышей живой массой 12,5...12,7 г и 18...20 г (в зависимости от особенностей опыта), 15 поросят породы белая русская, живой массой 6...7,3 кг, штамм *Salmonella choleraesuis* 370.

Культурально-морфологические и тинкториальные свойства выделенных культур бактерий изучали общепринятыми в микробиологии методами. Ферментативную активность бактериальных изолятов определяли при помощи микро-тест системы для биохимической идентификации энтеробактерий (МТС-М-12Е, НПО «Питательные среды», г. Махачкала), а также полужидких сред Гисса с углеводами.

Серологическую идентификацию сальмонелл проводили в РА на стекле при помощи сывороток сальмонеллезных О-комплексных и моноресепторных О- и Н-агглютинирующих (ФГУП «Курская биофабрика – фирма «Био»).

Гидроксиламиновый антиген в лиофилизированном виде получен из отдела бактериальных препаратов ВНИИТИПБ.

Для изготовления корпускулярного антигена культуру *S. choleraesuis* штамм 370 инактивировали по методу Карпухина Г.И. и соавт. (1978). Концентрацию микробных клеток определяли при помощи стандарта «мутности» ГИСК им. Тарасевича\*.

Для изучения влияния желудочного сока на сальмонеллы использовали нативный желудочный сок лошади (ФГУП «НПО «Микроген» МЗ РФ).

В качестве защитных веществ в работе применяли пектин пищевой («Herbafood Ingredients», Германия) и агар-агар (ТОО «АМАТРИКС», ГОСТ 16280 - 88).

О-антигена в исследуемом материале определяли в РНГА, антиген в РНАт. При постановке РНГА и РНАт использовали диагностикум эритроцитарный сальмонеллезный О-антигенный жидкий группы 6, 7 (ФГУП «НПО» Микроген МЗ РФ); сыворотку диагностическую сальмонеллезную адсорбированную сухую – А, В, С, Д, Е для реакции агглютинации – ПЕТСАЛ (Санкт-Петербургский НИИ вакцин и сывороток и предприятие по производству бактериальных препаратов).

Для оценки клеточного иммунного ответа (ГЗТ) после орального введения корпускулярного антигена сальмонелл применяли тест отека лапки мышей (Толокнов А.С., Давыдов И.В., 1993). Индекс реакции вычисляли по методике Даугалиевой Э.Х. и соавт. (2003).

*Статистическая обработка результатов.* Полученный цифровой материал результатов серологических исследований подвергали логарифмированию, для чего степень разведения при кратности 1:2 переводили в числовые значения (Сайдулдин Т.С., 1992). Все остальные цифровые материалы представлены в натуральных числах.

---

\* Глубоко признательны профессору Субботину В.В. (ВНИИЭВ) и зав. отделом бактериальных препаратов Школьникову Е.Э. (ВНИИТИПБ) за предоставление гидроксиламинового антигена и штамма *S. choleraesuis* № 370.

Среднюю арифметическую (S) и стандартную ошибку (M) определяли по методикам, описанным И.П. Ашмариным и И.А. Воробьевым (1962). Достоверность разницы двух сравниваемых показателей определяли по таблице Стьюдента. Достоверной считали разницу при  $p \leq 0,01$ .

## 2.2. Результаты исследований

### 2.2.1. Влияние желудочного сока на жизнеспособность сальмонелл и агглютинабельность корпускулярного антигена сальмонелл

Результаты опытов показали, что нативный желудочный сок лошади через три часа воздействия на взвесь сальмонелл снижал количество жизнеспособных клеток с  $10^4$  до менее  $10^1$  м.к./мл.

Одновременно желудочный сок денатурировал поверхностные О-антигены сальмонелл, о чем свидетельствовало снижение агглютинабельности клеток сальмонелл в РА с гомологичной сывороткой со значения среднего титра  $10,3 \log_2$  (контроль) через 3 ч контакта с желудочным соком до  $6 \log_2$ , через 6 ч – до  $5,7 \log_2$ , через 21 ч – до  $4 \log_2$ .

### 2.2.2. Распределение орально введенных О-антигенов сальмонелл в желудочно-кишечном тракте и влияние на этот процесс защитных веществ и иммунного статуса животных

Цель опыта – проследить динамику распределения орально введенных антигенов сальмонелл в желудочно-кишечном тракте мышей в зависимости от типа антигена, присутствия защитных веществ и иммунного статуса животных.

Изучали корпускулярный гретый и химический гидроксиламиновый антигены *S. choleraesuis* штамм 370 без защитных веществ, с 1 % пектина и 1 % агар-агара.

В опыте использовали белых мышей массой 18...20 г, которых распределили в 8 групп: животным групп № 1, 2, 3 ввели орально  $15 \cdot 10^9$  м.к. грегото корпускулярного антигена сальмонелл, соответственно, без защитных веществ, с 1 % пектина и 1 % агар-агара; мышам групп № 4, 5, 6 ввели гидроксиламиновый антиген, соответственно, без защитных веществ, с 1 % пектина и 1 % агар-агара в количестве, эквивалентном  $15 \cdot 10^9$  м.к.; мышам группы № 7 ввели орально корпускулярный гретый антиген с 1 % пектина в дозе  $15 \cdot 10^9$  м.к., мышам группы № 8 – соответствующую дозу гидроксиламинового антигена. Через 12 дней мышам групп №№ 7, 8 инокулировали повторно орально аналогичные дозы антигенов. Присутствие О-антигена в содержимом различных отделов желудочно-кишечного тракта и крови определяли через 1; 3; 6; 9; 15; 20; 36 и 48 ч после его введения. Объектами исследования служили: содержимое тонкого и толстого отделов кишечника, фекалии и кровь. Результаты опытов представлены в табл. 1 и 2. Как следует из приведенных данных, агар-агар обеспечивал более длительное присутствие О-антигена в толстом кишечнике. Этот вывод подтверждается при анализе сроков обнаружения корпускулярного антигена в фекалиях (рис. 1). В частности, корпускулярный антиген с агар-агаром, пектином и без защитных

веществ выявляли, соответственно, в течение 42; 30 и 14 ч; гидроксиламиновый, соответственно, 9 и 9 ч, при отсутствии антигена, введенного без защитных веществ. Таким образом, корпускулярный антиген от разрушения наиболее эффективно защищал агар-агар. В целом корпускулярный антиген сохранял активность дольше, чем гидроксиламиновый.

Таблица 1

**Титры корпускулярного антигена сальмонелл в желудочно-кишечном тракте и крови лабораторных мышей при оральном введении**

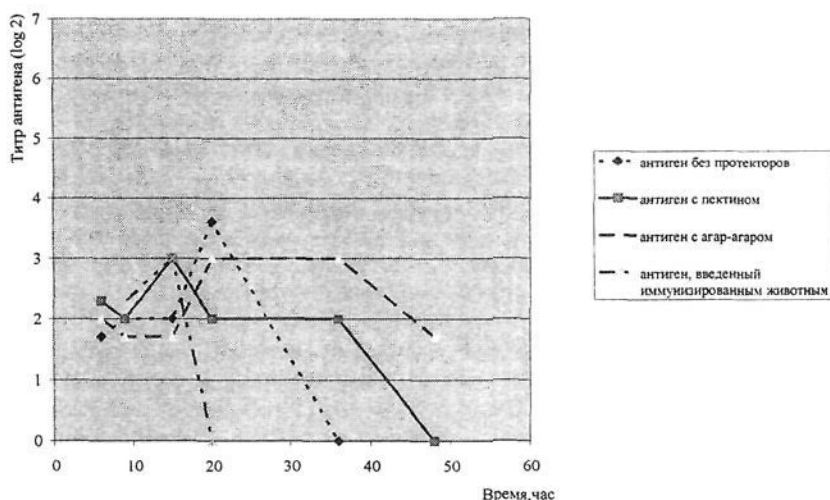
| Тип антигена                                                             | Время после введения антигена, ч | Средний титр антигена в РНАт (S) и ошибка (M), $\log_2$ , n=3 |                |                 |                |                  |                |         |                |
|--------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|---------------------------------------------------------------|----------------|-----------------|----------------|------------------|----------------|---------|----------------|
|                                                                          |                                  | кровь                                                         |                | тонкий кишечник |                | толстый кишечник |                | фекалии |                |
|                                                                          |                                  | S                                                             | M <sub>s</sub> | S               | M <sub>s</sub> | S                | M <sub>s</sub> | S       | M <sub>s</sub> |
| Корпускулярный антиген без протективных веществ (группа № 1)             | 1                                | -                                                             | -              | 5,7             | 0,3            | 4                | -              | -       | -              |
|                                                                          | 3                                | 3                                                             | -              | 3,3             | 0,3            | 4                | -              | -       | -              |
|                                                                          | 6                                | 5,7                                                           | 0,3            | 2               | -              | 2,3              | 0,3            | 1,7     | 0,3            |
|                                                                          | 9                                | 3                                                             | -              | 2               | -              | 1,7              | 0,7            | 2       | -              |
|                                                                          | 15                               | 4                                                             | 0,7            | 2               | -              | 1,3              | 0,3            | 2       | -              |
|                                                                          | 20                               | 4                                                             | -              | 2               | -              | 1,3              | 0,3            | 3,6     | 0,7            |
|                                                                          | 36                               | 2                                                             | -              | 1,7             | 0,7            | 1,7              | 0,7            | -       | -              |
|                                                                          | 48                               | -                                                             | -              | -               | -              | -                | -              | -       | -              |
| Корпускулярный антиген с 1 % пектина (группа № 2)                        | 1                                | -                                                             | -              | 5               | -              | 3                | -              | -       | -              |
|                                                                          | 3                                | -                                                             | -              | 4,3             | 0,3            | 4,3              | 0,3            | -       | -              |
|                                                                          | 6                                | 7                                                             | -              | 4,3             | 0,3            | 5,3              | 0,3            | 2,3     | 0,3            |
|                                                                          | 9                                | 4                                                             | -              | 2               | -              | 4                | -              | 2       | -              |
|                                                                          | 15                               | 6,3                                                           | 0,7            | 3,3             | 0,3            | 3,6              | 0,3            | 3       | -              |
|                                                                          | 20                               | 4,7                                                           | 0,7            | 2               | -              | 3                | -              | 2       | -              |
|                                                                          | 36                               | 2,3                                                           | 0,3            | -               | -              | 1,7              | 0,3            | 2       | -              |
|                                                                          | 48                               | -                                                             | -              | -               | -              | -                | -              | -       | -              |
| Корпускулярный антиген с 1 % агар-агара (группа №3)                      | 1                                | -                                                             | -              | 5,3             | 0,3            | 3                | -              | -       | -              |
|                                                                          | 3                                | 3                                                             | -              | 4               | -              | 4                | -              | -       | -              |
|                                                                          | 6                                | 5                                                             | -              | 4,3             | 0,3            | 5                | -              | 2       | -              |
|                                                                          | 9                                | 4                                                             | 0,7            | 3,3             | 0,3            | 5,7              | 0,7            | 1,7     | 0,3            |
|                                                                          | 15                               | 4                                                             | -              | 2               | -              | 4                | -              | 1,7     | 0,3            |
|                                                                          | 20                               | 3,3                                                           | 0,7            | -               | -              | 3                | -              | 3       | 1,02           |
|                                                                          | 36                               | 2,3                                                           | 0,3            | -               | -              | 1,7              | 0,3            | 3       | 0,3            |
|                                                                          | 48                               | -                                                             | -              | -               | -              | 1,3              | 0,7            | 1,7     | 0,3            |
| Корпускулярный антиген, введенный иммунизированным животным (группа № 7) | 1                                | 3,3                                                           | 0,3            | 4               | -              | -                | -              | -       | -              |
|                                                                          | 3                                | 3,3                                                           | 0,3            | 5               | -              | -                | -              | -       | -              |
|                                                                          | 6                                | 3                                                             | -              | 3               | -              | 2                | -              | -       | -              |
|                                                                          | 9                                | 4                                                             | -              | -               | -              | 3,3              | 0,7            | 2,3     | 0,3            |
|                                                                          | 15                               | 4                                                             | -              | -               | -              | 3                | -              | 3       | -              |
|                                                                          | 20                               | 4                                                             | -              | -               | -              | -                | -              | -       | -              |
|                                                                          | 36                               | -                                                             | -              | -               | -              | -                | -              | -       | -              |
|                                                                          | 48                               | -                                                             | -              | -               | -              | -                | -              | -       | -              |

Таблица 2

**Титры гидроксиламинового антигена сальмонелл в желудочно-кишечном тракте и крови лабораторных мышей при оральном введении**

| Тип антигена                                                                | Время после введения антигена, ч | Средний титр антигена в РНАт (S) и ошибка (M), log <sub>2</sub> , n=3 |                |                 |                |                  |                |         |                |
|-----------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|----------------|-----------------|----------------|------------------|----------------|---------|----------------|
|                                                                             |                                  | кровь                                                                 |                | тонкий кишечник |                | толстый кишечник |                | фекалии |                |
|                                                                             |                                  | S                                                                     | M <sub>s</sub> | S               | M <sub>s</sub> | S                | M <sub>s</sub> | S       | M <sub>s</sub> |
| Гидроксиламиновый антиген без протективных веществ (группа № 4)             | 1                                | -                                                                     | -              | 5,7             | 0,3            | 2,3              | 0,3            | -       | -              |
|                                                                             | 3                                | -                                                                     | -              | 4,3             | 0,3            | 7                | -              | -       | -              |
|                                                                             | 6                                | -                                                                     | -              | -               | -              | 3,3              | 0,3            | -       | -              |
|                                                                             | 9                                | -                                                                     | -              | -               | -              | 3                | -              | -       | -              |
|                                                                             | 15                               | -                                                                     | -              | -               | -              | -                | -              | -       | -              |
|                                                                             | 20                               | -                                                                     | -              | -               | -              | -                | -              | -       | -              |
|                                                                             | 36                               | -                                                                     | -              | -               | -              | -                | -              | -       | -              |
|                                                                             | 48                               | -                                                                     | -              | -               | -              | -                | -              | -       | -              |
| Гидроксиламиновый антиген с 1 % пектина (группа № 5)                        | 1                                | -                                                                     | -              | 4,7             | 0,7            | 3                | -              | -       | -              |
|                                                                             | 3                                | -                                                                     | -              | 4,3             | 0,3            | 3,3              | 0,3            | -       | -              |
|                                                                             | 6                                | -                                                                     | -              | 3,3             | 0,3            | 5,3              | 0,3            | 2       | -              |
|                                                                             | 9                                | 4                                                                     | -              | 1,7             | 0,3            | 4                | -              | 2,3     | 0,3            |
|                                                                             | 15                               | 4,7                                                                   | 0,7            | -               | -              | 3,6              | 0,3            | 2       | -              |
|                                                                             | 20                               | 2                                                                     | -              | -               | -              | -                | -              | -       | -              |
|                                                                             | 36                               | -                                                                     | -              | -               | -              | -                | -              | -       | -              |
|                                                                             | 48                               | -                                                                     | -              | -               | -              | -                | -              | -       | -              |
| Гидроксиламиновый антиген с 1 % агар-агара (группа № 6)                     | 1                                | -                                                                     | -              | 4               | -              | -                | -              | -       | -              |
|                                                                             | 3                                | -                                                                     | -              | 4               | -              | 2,3              | 0,3            | -       | -              |
|                                                                             | 6                                | -                                                                     | -              | 2               | -              | 6,7              | 0,3            | 2       | -              |
|                                                                             | 9                                | 3,3                                                                   | 0,7            | -               | -              | 5,7              | 0,7            | 1,7     | 0,3            |
|                                                                             | 15                               | 4                                                                     | -              | -               | -              | 4                | -              | 1,3     | 0,7            |
|                                                                             | 20                               | 3,3                                                                   | 0,7            | -               | -              | 1,3              | 0,7            | -       | -              |
|                                                                             | 36                               | -                                                                     | -              | -               | -              | -                | -              | -       | -              |
|                                                                             | 48                               | -                                                                     | -              | -               | -              | -                | -              | -       | -              |
| Гидроксиламиновый антиген, введенный иммунизированным животным (группа № 7) | 1                                | 2                                                                     | -              | 3               | -              | -                | -              | -       | -              |
|                                                                             | 3                                | 2                                                                     | -              | 2               | -              | -                | -              | -       | -              |
|                                                                             | 6                                | 4                                                                     | -              | -               | -              | 2                | -              | -       | -              |
|                                                                             | 9                                | 4                                                                     | -              | -               | -              | 3,3              | 0,3            | 2       | -              |
|                                                                             | 15                               | -                                                                     | -              | -               | -              | -                | -              | -       | -              |
|                                                                             | 20                               | -                                                                     | -              | -               | -              | -                | -              | -       | -              |
|                                                                             | 36                               | -                                                                     | -              | -               | -              | -                | -              | -       | -              |
|                                                                             | 48                               | -                                                                     | -              | -               | -              | -                | -              | -       | -              |

Существенно влияла на динамику О-антигенов сальмонелл в желудочно-кишечном тракте предшествующая оральная иммунизация животных. В кишечнике ранее иммунизированных животных антиген деградирует быстрее, что согласуется со сроками их появления в крови: у иммунизированных мышей корпускулярный и гидроксиламиновый антигены с пектином регистрировали в крови через час после введения, у интактных, соответственно, через 6 и 9 ч.



**Рисунок 1 – Динамика обнаружения корпускулярного антигена сальмонелл в фекалиях**

### **2.2.3. Результаты изучения в опытах на мышах безвредности и иммуногенных свойств препаратов из инактивированных сальмонелл при оральном введении**

#### **2.2.3.1. Безвредность корпускулярного и гидроксиламинового антигенов *Salmonella choleraesuis***

О безвредности введенных орально антигенов сальмонелл судили по приросту массы иммунизированных и контрольных мышей. Животных массой 12,4...12,7 г распределили по принципу аналогов в 15 групп по 10 мышей в группе. Мышам групп № 1...6 ввели орально возрастающие дозы корпускулярного гетерогенного антигена *S. choleraesuis* штамм 370 с 1 % пектина ( $1,56 \cdot 10^9$ ;  $3,12 \cdot 10^9$ ;  $6,25 \cdot 10^9$ ;  $12,5 \cdot 10^9$ ;  $25 \cdot 10^9$ ;  $50 \cdot 10^9$  м.к.); мышам групп № 8...13 аналогичные, в пересчете на микробные клетки, дозы гидроксиламинового антигена; мышам групп № 7 и 14 ввели, соответственно, корпускулярный и гидроксиламиновый антигены в дозе  $4,16 \cdot 10^9$  м. к., трехкратно, с интервалом 3 дня (суммарная доза  $12,5 \cdot 10^9$  м. к.). Животным группы № 15 ввели равный объем 1 % пектина. Животных всех групп взвешивали перед иммунизацией, а также на 8 и 16 сутки после введения антигенов.

Оральная инокуляция антигенов сальмонелл привела к замедлению темпов прироста массы животных через 8 суток. Отмечена обратная корреляция между дозой антигена и приростом массы мышей как в случае корпускулярного ( $r = -0,96$ ), так и гидроксиламинового ( $r = -0,83$ ) антигенов.

Иммунизация в дозе  $12,5 \cdot 10^9$  м. к. дробно, трехкратно, по  $4,16 \cdot 10^9$  м. к. с интервалом в три суток несколько снизила токсическое действие антигенов, однако эта разница не имела статистической значимости ( $p > 0,01$ ).

Таким образом, тест прироста массы мышей может быть использован для оценки безвредности инактивированных бактериальных вакцин, предназначенных для оральной иммунизации.

#### *2.2.3.2. Результаты изучения синтеза антител при оральной иммунизации мышей препаратами из инактивированных сальмонелл*

**Влияние защитных веществ на синтез антител при оральной иммунизации мышей антигенами сальмонелл.** Животных иммунизировали орально, однократно в дозе  $25 \cdot 10^9$  м.к. корпускулярного антигена и равнозначным количеством гидроксиламинового антигена *Salmonella choleraesuis* штамм 370. В качестве защитных (протективных) веществ использовали пектин и агар-агар. Мышей распределили в 8 групп и ввели следующие препараты: 1 группа (12 мышей) – корпускулярный антиген без протективных веществ; 2 группа (12 мышей) – корпускулярный антиген с 1 % пектина; 3 группа (12 мышей) – корпускулярный антиген с 1 % агар-агара; 4 группа (12 мышей) – гидроксиламиновый антиген без протективных веществ; 5 группа (12 мышей) – гидроксиламиновый антиген с 1 % пектина; 6 группа (12 мышей) – гидроксиламиновый антиген с 1 % агар-агара; 7 группа (6 мышей) – физиологический раствор с 1 % пектина; 8 группа (6 мышей) – физиологический раствор с 1 % агар-агара. По три животных каждой группы убили на 7, 15, 20 и 25 сутки после иммунизации и исследовали кровь и содержимое толстого кишечника на наличие антител в РНГА.

Результаты исследований представлены в табл. 3. Как видно, оральное введение антигенов сальмонелл с защитными веществами (агар-агар, пектин), по сравнению с иммунизацией антигенами без протекторов, обеспечивало более быстрое появление О-антител в крови и толстом кишечнике; длительное персистирование антител в крови и толстом кишечнике; большие средние и максимальные титры гуморальных, а в случае корпускулярного антигена и секреторных антител.

**Зависимость синтеза гуморальных и секреторных антител от дозы орально введенного антигена сальмонелл.** Мышам десяти групп (по 25 животных в группе) ввели корпускулярный и гидроксиламиновый антигены с 1 % пектина в различных дозах: по  $50 \cdot 10^9$ ;  $25 \cdot 10^9$ ;  $12,5 \cdot 10^9$ ;  $6,25 \cdot 10^9$  и  $3,12 \cdot 10^9$  м.к. Через 5; 7; 9; 12; 15; 20; 25 и 30 суток исследовали на наличие антител кровь и содержимое толстого отдела кишечника. Результаты представлены в табл. 4.

**Корпускулярный антиген.** Установлено, что сроки появления секреторных О-антител в толстом отделе кишечника не зависели от дозы (в пределах испытанных доз) введенного антигена. Не удалось установить корреляции между количеством введенного антигена и длительностью регистрации антител в толстом кишечнике. Выявленные различия величин средних титров секреторных антител за период их обнаружения в зависимости от дозы антигена статистически незначимы ( $p > 0,01$ ).

Таблица 3

Влияние защитных веществ на синтез О-антител при оральной иммунизации мышей антигенами сальмонелл

| Тип антигена      | Тип защитного вещества (протектор) | Первичная регистрация антител, сутки |                  | Продолжительность обнаружения антител, сутки |                        | Средние титры антител за период наблюдения, $\log_2$ |                  | Максимальные титры антител, $\log_2$ |                  |
|-------------------|------------------------------------|--------------------------------------|------------------|----------------------------------------------|------------------------|------------------------------------------------------|------------------|--------------------------------------|------------------|
|                   |                                    | кровь                                | толстый кишечник | кровь                                        | толстый кишечник       | кровь                                                | толстый кишечник | кровь                                | толстый кишечник |
| Корпускулярный    | без протектора                     | 15                                   | 15               | однократно на 15 сутки                       | однократно на 15 сутки | 3,6                                                  | 3,3              | 3,6                                  | 3,3              |
|                   | пектин                             | 7                                    | 7                | 13                                           | 13                     | 4,2                                                  | 3,6              | 5,7                                  | 3,6              |
|                   | агар-агар                          | 7                                    | 7                | 13                                           | 13                     | 4,5                                                  | 4,3              | 6,0                                  | 5,6              |
| Гидроксиламиновый | без протектора                     | 15                                   | 15               | однократно на 15 сутки                       | однократно на 15 сутки | 2                                                    | 2                | 2,0                                  | 2,0              |
|                   | пектин                             | 15                                   | 7                | однократно на 15 сутки                       | 8                      | 2,3                                                  | 2                | 2,3                                  | 2,0              |
|                   | агар-агар                          | 15                                   | 7                | однократно на 15 сутки                       | 8                      | 2,6                                                  | 2                | 2,6                                  | 2,0              |
| Контроль          | пектин                             | -                                    | -                | -                                            | -                      | -                                                    | -                | -                                    | -                |
|                   | агар-агар                          | -                                    | -                | -                                            | -                      | -                                                    | -                | -                                    | -                |

Таблица 4

## Зависимость синтеза О-антител от дозы орально введенного антигена сальмонелл

| Тип антигена      | Доза антигена, м. к. | Первичная регистрация антител, сутки |                  | Продолжительность обнаружения антител, сутки |                  | Средние титры антител за период наблюдения, $\log_2$ |                  | Максимальные титры антител, $\log_2$ |                  |
|-------------------|----------------------|--------------------------------------|------------------|----------------------------------------------|------------------|------------------------------------------------------|------------------|--------------------------------------|------------------|
|                   |                      | кровь                                | толстый кишечник | кровь                                        | толстый кишечник | кровь                                                | толстый кишечник | кровь                                | толстый кишечник |
| Корпускулярный    | $50 \cdot 10^9$      | 7                                    | 7                | 23                                           | 8                | 4,6                                                  | 3,3              | 6,3                                  | 4,0              |
|                   | $25 \cdot 10^9$      | 7                                    | 7                | 13                                           | 8                | 3,8                                                  | 3,3              | 5,7                                  | 4,0              |
|                   | $12,5 \cdot 10^9$    | 9                                    | 7                | 11                                           | 8                | 3,4                                                  | 3,0              | 4,0                                  | 3,3              |
|                   | $6,25 \cdot 10^9$    | 9                                    | 7                | 11                                           | 8                | 2,6                                                  | 3,1              | 3,3                                  | 3,3              |
|                   | $3,12 \cdot 10^9$    | 12                                   | 7                | 8                                            | 8                | 2,3                                                  | 3,1              | 2,3                                  | 3,3              |
| Гидроксиламиновый | $50 \cdot 10^9$      | 12                                   | 9                | 3                                            | 6                | 2,4                                                  | 3,3              | 2,6                                  | 3,6              |
|                   | $25 \cdot 10^9$      | 12                                   | 9                | 3                                            | 6                | 2,3                                                  | 2,4              | 2,3                                  | 3,3              |
|                   | $12,5 \cdot 10^9$    | -                                    | 9                | -                                            | 6                | -                                                    | 2,7              | -                                    | 3,3              |
|                   | $6,25 \cdot 10^9$    | -                                    | 7                | -                                            | 8                | -                                                    | 2,5              | -                                    | 3,0              |
|                   | $3,12 \cdot 10^9$    | -                                    | 7                | -                                            | 8                | -                                                    | 2,5              | -                                    | 3,0              |

Отмечена связь средней степени между дозой антигена и сроками появления гуморальных антител ( $r = -0,67$ ). Средний титр гуморальных антител находился в зависимости от дозы антигена ( $r = 0,99$ ).

Таким образом, на основании результатов, полученных при испытании корпускулярного антигена, можно сделать следующие выводы:

- доза антигена (в пределах испытанных доз) в меньшей степени влияла на величину средних и максимальных титров О-антител в толстом кишечнике, чем на уровень антител в крови;

- существует зависимость между дозой антигена и сроками первичной регистрации, продолжительностью циркуляции, средними и максимальными титрами О-антител в крови.

*Гидроксиламиновый антиген.* При исследовании гидроксиламинового антигена выявлены, в целом, аналогичные закономерности применительно к секреторным О-антителам. Синтез гуморальных антител был слабым и непродолжительным.

*Влияние кратности введения антигена и интервалов на синтез О-антител.* Мышей распределили в 6 групп (по 30 мышей в группах № 1...4 и 25 мышей в группах № 5 и № 6). Корпускулярный и гидроксиламиновый (в равнозначном количестве) антигены с пектином ввели однократно, орально, в дозе  $37,5 \cdot 10^9$  м.к. и в дозе  $12,5 \cdot 10^9$  м.к. ввели трижды с интервалом три дня (суммарная доза  $37,5 \cdot 10^9$  м.к.). Кроме того, корпускулярный и гидроксиламиновый антигены с пектином ввели в дозах  $12,5 \cdot 10^9$  м.к. дважды, с интервалом 14 суток. На 5; 7; 9; 12; 15; 20; 25 и 30 сутки после заключительного введения антигена исследовали на наличие О-антител кровь и содержимое толстого отдела кишечника.

Однократное оральное введение корпускулярного антигена в дозе  $37,5 \cdot 10^9$  (группа № 1) привело к появлению антител в крови и толстом кишечнике на 7 суток в равных титрах –  $3 \log_2$ . Максимальный уровень гуморальных ( $5,7 \log_2$ ) и секреторных ( $4 \log_2$ ) антител регистрировали на 15 сутки. Антитела в крови и содержимом кишечника сохранялись, соответственно, 13 и 8 суток.

Дробное трехкратное с интервалом трое суток введение мышам группы № 3 равной суммарной дозы корпускулярного антигена ( $37,5 \cdot 10^9$  м.к.) привело к появлению антител в крови и содержимом кишечника на 5 сутки после заключительного скормливания антигена, соответственно, в титрах  $3 \log_2$  и  $3,3 \log_2$ . Максимальный титр гуморальных антител наблюдали на 15 сутки ( $6 \log_2$ ), секреторных на 12 сутки ( $4,7 \log_2$ ). Секреторные и гуморальные антитела регистрировали на протяжении 20 суток, соответственно, на 12 и 7 суток длительнее, чем при однократной иммунизации.

Аналогичные закономерности (группы № 2, 4) выявлены при инокуляции мышам гидроксиламинового антигена, однако интенсивность серологического ответа и продолжительность обнаружения антител в этом случае были ниже, чем при введении корпускулярного антигена.

Мышей группы № 5 иммунизировали орально корпускулярным антигеном с пектином в дозе  $25 \cdot 10^9$  м.к. и через 14 суток, при титре гуморальных антител  $5,7 \log_2$  и секреторных антител  $3,6 \log_2$  ввели повторно

орально аналогичную дозу антигена. После первой иммунизации, в интервале между 15...25 сутками, шло постепенное снижение уровня гуморальных антител, далее, через 15 суток после повторного введения антигена, уровень антител возрос до  $4,6 \log_2$ , достигнув второго максимума на 30 сутки. Антитела в крови и толстом кишечнике исчезли через 25 суток после повторного введения антигена. Близкие закономерности были выявлены при иммунизации мышей по аналогичной схеме гидроксиламиновым антигеном (группа № 6), однако интенсивность серологического ответа оказалась ниже. Так в интервале между 19...30 сутками антитела не были обнаружены, но появились вновь на 35 сутки и исчезли к 45 суткам.

Таким образом, трехкратное, с интервалом двое суток введение корпускулярного антигена по сравнению с однократной иммунизацией равнозначной суммарной дозой антигена более эффективно.

Двукратная иммунизация с интервалом 14 суток корпускулярным антигеном по сравнению с однократным введением аналогичной суммарной дозы антигена также обеспечила более высокие титры и длительное присутствие секреторных и гуморальных антител.

#### *2.2.3.3. Формирование гиперчувствительности замедленного типа при оральной иммунизации мышей корпускулярным антигеном сальмонелл*

Мышей распределили в группы № 1...6 по 5 животных. Мышам групп № 1...3 ввели орально корпускулярный антиген с 1 % пектина в дозе  $25 \cdot 10^9$  м. к., мышам групп № 4...6 – физиологический раствор с 1 % пектина (контроль). Через 7, 14 и 20 суток после иммунизации мышам всех групп в подушечки задних правых лап ввели подкожно разрешающую дозу корпускулярного антигена в дозе  $1,25 \cdot 10^9$  м. к. в объеме 0,05 мл, а в подушечки левых задних лап – физиологический раствор в той же дозе и объеме. Контролем служили интактные мыши (группы № 4...6), не получавшие орально корпускулярный антиген сальмонелл. Через 24 ч оценивали воспалительную реакцию по разнице масс опытных и контрольных лап и рассчитывали индекс реакции.

Результаты опыта показали, что состояние ГЗТ было непродолжительным: на 7-е сутки сдвиг индекса реакции составил 40 %, на 14-е сутки – 10 % и на 20-е сутки разницы в массе лапок опытных и контрольных мышей не наблюдали.

#### *2.2.3.4. Оценка иммуногенности корпускулярного и гидроксиламинового антигенов Salmonella choleraesuis на мышах*

*Сравнительная оценка иммуногенности корпускулярного и гидроксиламинового антигенов Salmonella choleraesuis в опытах прямого заражения мышей.* Проведению опыта предшествовало определение  $LD_{50}$  *S. choleraesuis* штамм 370 на мышах. При внутрибрюшинном заражении  $LD_{50}$  составила 223,3 тыс. м.к., при оральном – 399 млн. м.к. Таким образом,  $LD_{50}$  при внутрибрюшинном и оральном способах заражения существенно различались.

Иммуногенную активность препаратов определяли на белых мышах живой массой 18...20 г, которых по принципу аналогов распределили в 11 групп. Животным первых пяти групп ввели орально возрастающие дозы корпускулярного антигена с 1 % пектина ( $0,78 - 1,56 - 3,12 - 6,25 - 12,5 \cdot 10^9$  м. к.), мышам последующих пяти групп – аналогичные дозы гидроксиламинового антигена, контрольным животным – 1%-й пектин в физиологическом растворе. На 12 сутки после иммунизации животных заразили орально в дозе  $5 LD_{50}$  культуры *S. choleraesuis* штамм 370. Часть животных не заражали, убивали на 12, 15 и 20 сутки после иммунизации и исследовали на наличие секреторных (толстый кишечник) и гуморальных антител.

ИД<sub>50</sub> корпускулярного антигена составила  $1,952 \cdot 10^9$  м.к., гидроксиламинового –  $2,36 \cdot 10^9$  м.к. Гидроксиламиновый антиген не индуцировал синтез гуморальных антител на 12 сутки, и средний уровень секреторных антител был ниже, чем у животных, которых иммунизировали корпускулярным антигеном.

Как видно из табл. 5, уровень защиты мышей зависел от дозы антигена ( $r = 0,98$ ) и в случае корпускулярного антигена коррелировал со средним титром гуморальных антител ( $r = 0,89$ ). Менее выражена зависимость уровня защиты мышей от титра секреторных кишечных антител. Аналогичная зависимость между уровнем защиты мышей и титрами секреторных антител проявлялась и при иммунизации гидроксиламиновым антигеном.

Таблица 5

**Корреляция уровня защиты иммунизированных животных и титров антител**

| Тип антигена           | Доза<br>антигена,<br>м. к. | Титр антител, log <sub>2</sub> |                                          |                |                                          | Защита<br>животных,<br>% |
|------------------------|----------------------------|--------------------------------|------------------------------------------|----------------|------------------------------------------|--------------------------|
|                        |                            | секреторных                    |                                          | гуморальных    |                                          |                          |
|                        |                            | на 12<br>сутки                 | средний<br>титр (12,<br>15, 20<br>сутки) | на 12<br>сутки | средний<br>титр (12,<br>15, 20<br>сутки) |                          |
| Корпускулярный         | 12,5·10 <sup>9</sup>       | 3,3                            | 2,1                                      | 3,3            | 3,4                                      | 80                       |
|                        | 6,25·10 <sup>9</sup>       | 3,3                            | 2,2                                      | 3              | 2,65                                     | 80                       |
|                        | 3,12·10 <sup>9</sup>       | 3,3                            | 2,1                                      | 2,3            | 2,3                                      | 70                       |
|                        | 1,56·10 <sup>9</sup>       | 3                              | 1,66                                     | 2,3            | 2,3                                      | 50                       |
|                        | 0,78·10 <sup>9</sup>       | 2,3                            | 1,43                                     | 2,3            | 1,43                                     | 30                       |
| Гидроксил-<br>аминовый | 12,5·10 <sup>9</sup>       | 3,3                            | 1,66                                     | -              | -                                        | 70                       |
|                        | 6,25·10 <sup>9</sup>       | 3                              | 1,66                                     | -              | -                                        | 60                       |
|                        | 3,12·10 <sup>9</sup>       | 2,3                            | 1,43                                     | -              | -                                        | 60                       |
|                        | 1,56·10 <sup>9</sup>       | 2,3                            | 1,43                                     | -              | -                                        | 40                       |
|                        | 0,78·10 <sup>9</sup>       | 2,3                            | 1,43                                     | -              | -                                        | 20                       |

**Сроки формирования иммунитета при оральной иммунизации мышей антигенами *Salmonella choleraesuis* с пектином.** Мышей разделили на 7 групп. Животным первых трех групп ввели корпускулярный антиген с 1 %

пектина в дозе  $12,5 \cdot 10^9$  м. к., последующих трех групп – гидроксиламиновый антиген в аналогичных дозах. Животным контрольной группы ввели 1%-й пектин. Перед заражением по три животных каждой группы убили и исследовали на наличие антител кровь и содержимое толстого отдела кишечника. Мышей заразили внутрибрюшинно 5 LD<sub>50</sub> *S. choleraesuis* штамм 370 через 7, 15 и 30 суток после иммунизации.

При однократной оральной иммунизации мышей корпускулярным антигеном специфическая устойчивость формировалась к 7 суткам, достигала максимума к 15 и резко снижалась к 30 суткам. При оральной иммунизации и внутрибрюшинном заражении устойчивость мышей оказалась низкой: на 15 сутки в случае корпускулярного антигена не превышала 60 %, гидроксиламинового – 40 %.

*Оценка иммуногенности корпускулярного антигена в опыте контактного заражения мышей.* Цель опыта – изучить возможность определения иммуногенности препарата на модели с оральной иммунизацией, контактным заражением животных и оценкой результата по показателям колонизации сальмонеллами толстого отдела кишечника мышей и диссеминации возбудителя из кишечника во внутренние органы.

Животных распределили в три группы. Мышам первой группы ввели орально двукратно, с интервалом 7 суток корпускулярный антиген с 1 % пектина в дозе  $12,5 \cdot 10^9$  м.к., мышам второй группы (контроль) – раствор пектина (1 %), мышам третьей группы орально суточную культуру *S. choleraesuis* в дозе  $1 \cdot 10^6$  м.к. Через 12 дней после иммунизации мышей всех трех групп объединили в одной клетке с общей кормушкой и поилкой. Контрольное бактериологическое исследование мышей группы № 3 на 10 сутки после заражения показало наличие *S. choleraesuis* в фекалиях у всех животных.

После 10 суток совместного содержания мышей первой и второй групп наркотизировали и исследовали содержимое слепой кишки, кровь, печень и почки на наличие сальмонелл.

Колонизацию сальмонеллами толстого отдела кишечника наблюдали у 100 % неиммунизированных и 60 % иммунизированных животных (табл. 6). У неиммунизированных мышей из органов и тканей за пределами кишечного тракта было выделено 18 культур сальмонелл, что составляет 60 % от максимально возможного их обнаружения, у иммунизированных – 2 культуры (6,6 %). С учетом колонизации кишечника частота выделения сальмонелл от неиммунизированных мышей составила 70 % (28 культур), иммунизированных – 20 % (8 культур), то есть частота изоляции сальмонелл от неиммунизированных мышей была в 3,5 раза выше. Диссеминация сальмонелл из кишечника в кровь и паренхиматозные органы у неиммунных мышей была в 9 раз выше, чем у иммунизированных животных.

Таким образом, данная лабораторная модель может быть использована для оценки иммуногенности испытуемого препарата и дает информацию по двум показателям: колонизационная резистентность кишечника и уровень диссеминации возбудителя в органы и ткани.

Таблица 6

**Результаты бактериологического исследования орально  
иммунизированных и контрольных мышей в опыте контактного  
заражения**

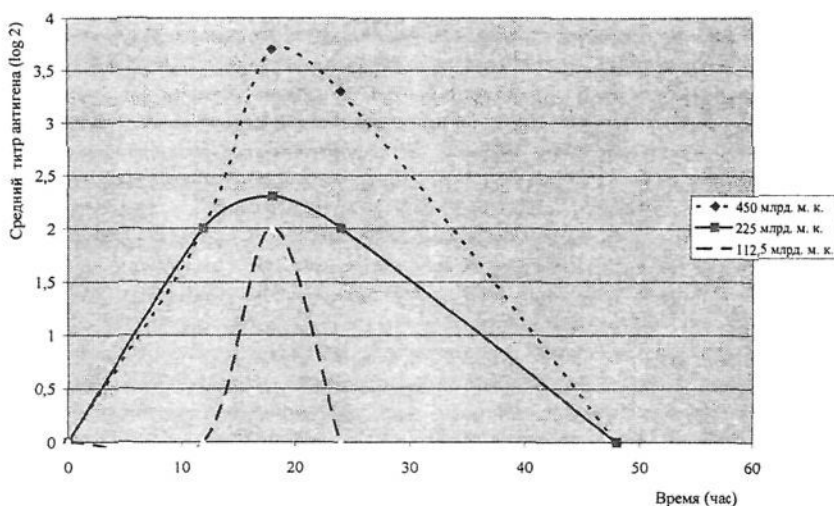
| Группа животных         | Кол-во животных | Выделено культур сальмонелл |    |                                  |     |                     |     |        |    |       |    |       |    |
|-------------------------|-----------------|-----------------------------|----|----------------------------------|-----|---------------------|-----|--------|----|-------|----|-------|----|
|                         |                 | всего                       |    | из<br>крови,<br>печени,<br>почек |     | в том числе         |     |        |    |       |    |       |    |
|                         |                 |                             |    |                                  |     | толстый<br>кишечник |     | печень |    | кровь |    | почки |    |
|                         |                 | абс                         | %  | абс                              | %   | абс                 | %   | абс    | %  | абс   | %  | абс   | %  |
| Иммунизи-<br>рованные   | 10              | 8                           | 20 | 2                                | 6,6 | 6                   | 60  | -      | -  | -     | -  | 2     | 20 |
| Неиммунизи-<br>рованные | 10              | 28                          | 70 | 18                               | 60  | 10                  | 100 | 8      | 80 | 6     | 60 | 4     | 40 |

**2.2.4. Результаты испытания безвредности и антигенных свойств  
корпускулярного антигена *Salmonella choleraesuis* на поросятах**

**2.2.4.1. Динамика выявления О-антигенов сальмонелл в фекалиях поросят  
после однократного орального введения корпускулярного антигена *Salmonella  
choleraesuis***

В опыт были включены подсосные клинически здоровые поросята одного помета средней массой 6 кг в возрасте 25 суток. Поросят не подвергали вакцинации согласно принятой в хозяйстве схемы иммунизации против сальмонеллеза. Животных распределили в три группы по три животных в каждой и ввели орально корпускулярный антиген *S. choleraesuis* с пектином (1 %) в дозах: группа 1 –  $450 \cdot 10^9$  м.к., группа 2 –  $225 \cdot 10^9$  м.к., группа 3 –  $112,5 \cdot 10^9$  м.к. Фекалии исследовали на наличие О-антигена через 12; 18; 24 и 48 ч после оральной иммунизации в РНАт.

Сроки появления антигенов в фекалиях поросят и их титры зависели от дозы введенного антигена (рис. 2). При всех дозах максимальные титры РНАт наблюдали через 18 ч после введения антигена. Продолжительность регистрации антигенов в фекалиях также определялась дозой введенного антигена и составила 12 ч при дозах  $450 \cdot 10^9$  и  $225 \cdot 10^9$ , при дозе  $112,5 \cdot 10^9$  – однократно через 18 ч. Результаты исследований показали, что время прохождения корпускулярным антигеном желудочно-кишечного тракта свиней и мышей близко. Таким образом, при групповой оральной иммунизации свиней о поступлении в организм животных антигена бактерий можно судить по результатам исследования фекалий животных в РНАт через 18...20 ч после введения препаратов, содержащих антигены сальмонелл.



**Рисунок 2 – Динамика выявления О-антигенов сальмонелл в фекалиях поросят после однократного орального введения различных доз корпускулярного антигена с пектином**

#### 2.2.4.2. Безвредность корпускулярного антигена *Salmonella choleraesuis* для поросят при оральном введении

Результаты получены на тех же животных, на которых исследовали динамику прохождения антигенов сальмонелл по желудочно-кишечному тракту (п. 2.2.4.1.).

Степень безвредности препарата оценивали по общему состоянию поросят, температурной реакции в поствакцинальный период, а также по разнице привесов при отъеме у поросят, вакцинированных орально корпускулярным антигеном и привитых применяемой в хозяйстве живой сальмонеллезной вакциной из штаммов *S. typhimurium* № 3 и *S. choleraesuis* № 9 в соответствии с инструкцией (контроль).

У поросят после введения корпускулярного антигена с пектином через 6...15 ч наблюдали несколько угнетенное состояние, у отдельных животных рвоту, подъем температуры тела до 40,1...41,3 °С, существенных различий температурной реакции в зависимости от дозы не наблюдали. Температура тела снизилась до нормы в течение 10...25 ч, что в целом соответствует времени прохождения корпускулярного антигена сальмонелл по желудочно-кишечному тракту поросят и мышей. Динамика движения антигена сальмонелл в кишечном тракте мышей и поросят показывает, что реакция животных являлась ответом на разрушение клеток сальмонелл и освобождение эндотоксина.

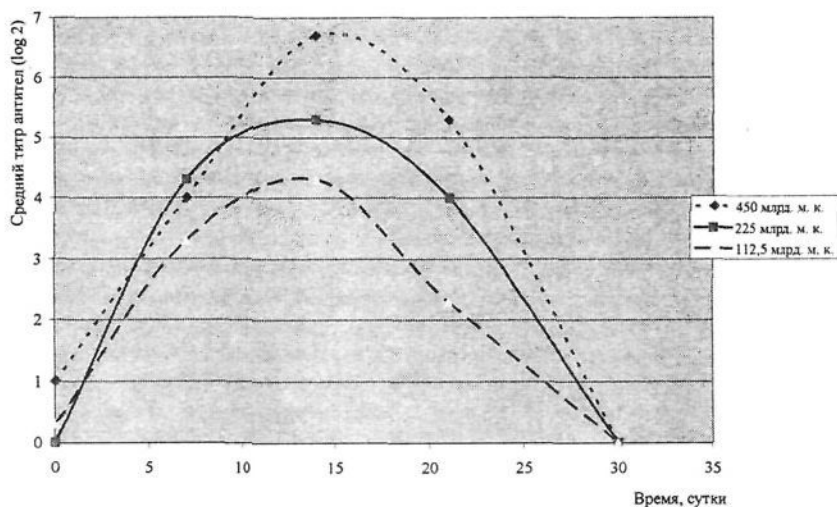
Взвешивание поросят при отъеме в возрасте 46 суток показало, что средняя масса орально иммунизированных поросят составила 10,6 кг, в том числе по группе иммунизированных антигеном в дозе  $450 \cdot 10^9$  м.к. – 10,7 кг,  $225 \cdot 10^9$  м.к. – 10,0 кг,  $112,5 \cdot 10^9$  м.к. – 11,3 кг. Средняя масса тела у поросят контрольной группы при отъеме составила 9,8 кг. Таким образом, оральная однократная иммунизация поросят корпускулярным антигеном не привела к отрицательному эффекту по показателю прироста массы тела животных.

#### *2.2.4.3. Синтез О-антител у поросят при оральной иммунизации корпускулярным антигеном *Salmonella choleraesuis**

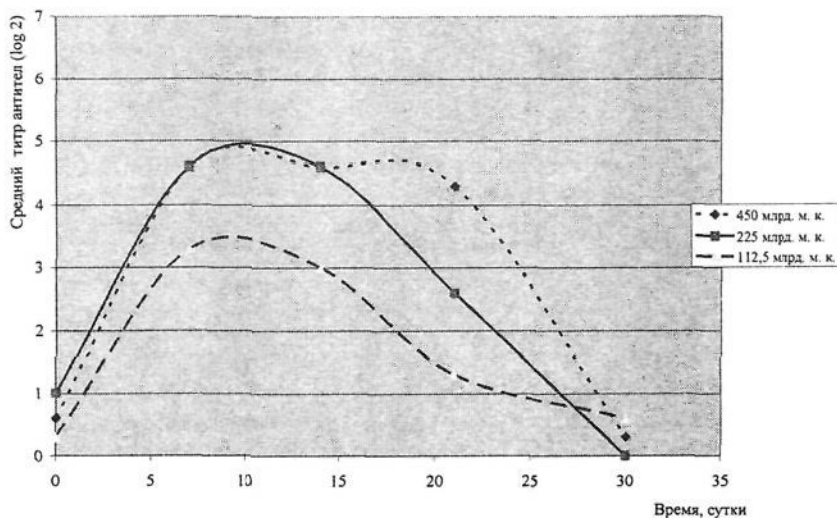
В опыт были взяты поросята двух пометов. Девяти поросётам одного помёта в возрасте 25 суток были введены орально различные дозы корпускулярного антигена с пектином из *S. choleraesuis* штамм 370 по схеме, изложенной в разделе 2.2.4.1. Во втором помёте поросят не иммунизировали. У всех поросят исследовали пробы крови и фекалий на наличие антител в РНГА на 7, 14, 21 и 30 сутки после иммунизации. Параллельно аналогичные исследования проводили у трех поросят, привитых живой бивалентной сальмонеллезной вакциной из аттенуированных штаммов *S. typhimurium* № 3 и *S. choleraesuis* № 9 согласно инструкции по применению. Результаты исследований представлены на рис. 3, 4.

Появление антител в фекалиях и крови наблюдали на 7-е сутки. Максимального уровня гуморальные антитела достигли через 14 дней. К 21 суткам наблюдали снижение гуморальных и копроантител. Средний титр гуморальных антител коррелировал с дозой введенного антигена – положительная связь ( $r=0,99$ ). В случае копроантител зависимость титра антител от дозы антигена также носила характер положительной связи ( $r=0,98$ ). Существенного изменения уровня гуморальных и секреторных антител в период наблюдения у неиммунизированных поросят не отмечали. Подкожная иммунизация поросят живой бивалентной вакциной из *S. typhimurium* № 3 и *S. choleraesuis* № 9 привела к существенному нарастанию титра гуморальных антител на 14...30 сутки, что несколько позднее, чем после оральной иммунизации; уровень копроантител возрос к 21...30 суткам, но был ниже, чем на 7...21 сутки после оральной вакцинации.

Таким образом, оральное введение подсосным поросётам 25-дневного возраста корпускулярного антигена *S. choleraesuis* с пектином (1 %) привело к появлению и нарастанию антител к О-антигенам (рецепторы 6, 7) в крови и фекалиях. Интенсивность синтеза антител находилась в зависимости от дозы введенного антигена. В целом, динамика синтеза гуморальных и копроантител у однократно орально иммунизированных поросят близка к таковой у привитых однократно мышей.



**Рисунок 3 – Динамика гуморальных О-антител у поросят после однократного орального введения корпускулярного антигена сальмонелл с пектином**



**Рисунок 4 – Динамика О-копроантител у поросят после однократного орального введения корпускулярного антигена сальмонелл с пектином**

#### 4. ВЫВОДЫ

1. О-антигены сальмонелл, введенные орально с агар-агаром и пектином, длительное время сохраняют активность в желудочно-кишечном тракте мышей, чем аналогичные антигены без защитных веществ.

2. Предшествующая оральная иммунизация мышей антигенами сальмонелл приводит при ревакцинации к ускоренной элиминации антигена из желудочно-кишечного тракта и быстрому его появлению в крови.

3. О-антигены сальмонелл с защитными веществами при оральной иммунизации индуцируют более ранний и длительный синтез гуморальных и секреторных кишечных антител, чем антигены без протекторов.

4. Максимальные титры О-антигена сальмонелл в фекалиях орально иммунизированных свиней регистрируются через 18...20 часов, антител в крови и фекалиях – на 12...14 сутки. Эти показатели могут служить критериями получения животными достаточной дозы бактериального антигена при групповой оральной иммунизации.

5. Лабораторную оценку безвредности препаратов, содержащих инаktivированные сальмонеллы и предназначенных для оральной иммунизации животных, можно проводить в тесте прироста массы мышей на беспородных белых мышах; антигенных свойств – путем определения уровня антител в крови и содержанием толстого отдела кишечника мышей.

6. Двукратная с интервалом 7 суток оральная иммунизация мышей корпускулярным антигеном сальмонелл в дозе  $12,5 \cdot 10^9$  м. к. повышает колонизационную резистентность кишечника мышей по отношению к сальмонеллам в 3,5 раза и снижает интенсивность их диссеминации из кишечника в кровь и паренхиматозные органы в 9 раз.

7. Уровень специфической защиты орально иммунизированных корпускулярным антигеном мышей коррелирует с титрами гуморальных антител ( $r=0,89$ ) и дозой введенного антигена ( $r=0,98$ ).

8. Разработана лабораторная модель оценки иммуногенных свойств препаратов из инаktivированных сальмонелл на беспородных белых мышах с оральной иммунизацией и контактным заражением. Иммуногенность оценивается по уровню колонизации сальмонелл в кишечнике и их диссеминации из кишечника в кровь и внутренние органы.

#### 5. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Разработаны методические рекомендации «Лабораторная модель для оценки препаратов, содержащих инаktivированные сальмонеллы и предназначенных для оральной иммунизации животных» (рассмотрены и одобрены Ученым Советом ветеринарно-санитарного факультета МГУПБ от 20.03.2008, протокол № 42).

В качестве вещества, защищающего орально введенные антигены сальмонелл от разрушающего действия желудочно-кишечного сока и ферментов, предложено использовать агар-агар.

Для контроля безвредности препаратов, содержащих инактивированные сальмонеллы и предназначенных для оральной иммунизации, рекомендован тест прироста массы мышей.

#### **Список работ, опубликованных по теме диссертации**

1. Беликов Д.В. Проблемы оральной иммунизации // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2007. – №2. – С. 3 – 7.
2. Беликов Д.В. Динамика прохождения антигенов сальмонелл через желудочно-кишечный тракт при оральном введении и серологический ответ у лабораторных животных / Д.В. Беликов, Д.И. Скородумов // Живые системы и биологическая безопасность населения: материалы 6 международной научной конференции студентов и молодых ученых. – М., 2007. – С. 244 – 245.
3. Беликов Д.В. Влияние протективных веществ и иммунного статуса лабораторных животных на динамику прохождения сальмонеллезных антигенов по желудочно-кишечному тракту / Д.В. Беликов, Д.И. Скородумов, В.В. Субботин, М.Н. Лощинин, Л.В. Анисимова, Л.Б. Соловьев, Л.А. Коротеева // Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов: материалы международной научно-практической конференции. – Щелково, 2007. – С. 229 – 233.
4. Беликов Д.В. Влияние агар-агара, пектина и предшествующей оральной иммунизации на динамику движения орально введенных антигенов сальмонелл по желудочно-кишечному тракту животных / Д.В. Беликов, Д.И. Скородумов, В.В. Субботин, М.Н. Лощинин, Е.Э. Школьников, Л.В. Анисимова, Л.А. Коротеева // Журнал ветеринарии и кормление. – 2008. – №1. – С. 6 – 7.
5. Беликов Д.В. Антигенные и иммуногенные свойства препаратов из инактивированных сальмонелл при оральной иммунизации животных. Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2008. – №5. – С. 21 – 25.

Подписано в печать 19.09.08. Усл. печ. л. 1,25.

Тираж 100 экз. Заказ 07/20

МГУПБ. 109316, Москва, ул. Талалихина, 33.

ООО «Полисувенир». 109316, Москва, ул. Талалихина, 33.

Тел. 677-03-86