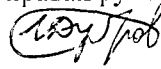


На правах рукописи



ДУБРОВИН ИВАН ИГОРЕВИЧ

2

**РАЗРАБОТКА, ПОЛУЧЕНИЕ И ПРИМЕНЕНИЕ ПО-
ЛИВАЛЕНТНОЙ СЫВОРОТКИ ПРОТИВ ПСЕВДО-
МОНОЗА ЖИВОТНЫХ**

16 00 03 – Ветеринарная микробиология, вирусология, эпи-
зоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ



диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Краснодар 2007

Работа выполнена в ГНУ « Краснодарский научно – исследовательский ветеринарный институт»

Научный руководитель Заслуженный деятель науки Кубани
доктор ветеринарных наук, профессор
Болоцкий Иван Александрович

Официальные оппоненты доктор ветеринарных наук, профессор
Тутов Иван Кириллович

доктор ветеринарных наук, профессор
Малышева Людмила Александровна

Ведущая организация Северо – Кавказский зональный научно –
исследовательский ветеринарный институт (СИЗНИВИ)

Защита диссертации состоится «30» мая 2007 года в 10 часов
на заседании диссертационного совета Д 220 038 07 в Кубанском
государственном аграрном университете (350044, г Краснодар, ул
Калинина 13)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Кубанского го-
сударственного аграрного университета

Автореферат разослан «28» апреля 2007 г

Ученый секретарь
диссертационного совета,
профессор



Родин И А

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

АКТУАЛЬНОСТЬ. В России возбудитель псевдомоноза *P aeruginosa* выделяется из патологического материала сельскохозяйственных животных и птиц во всех регионах, в том числе и в Краснодарском крае (Казеев Г В 1972, Шипицын А Г 1982, Васильев А К 2003, Болоцкий И А 2006, Марченко Т.В 2006.)

Некоторыми авторами Honma I D et al (1982), Matthews – Greer L V (1987) Седов Н К (1987), на уровне лабораторных исследований предлагались гипериммунные сыворотки против псевдомоноза, но для массового использования основным видам сельскохозяйственных животных пока не предложено ни одного эффективного специфического биопрепарата. Высокая инфицированность сельскохозяйственных животных возбудителями псевдомоноза, заболеваемость их, а также контаминация кормов, продуктов животноводства *P aeruginosa* и постоянная угроза заражения человека, наносит не только громадный экономический ущерб, но имеет и социальное значение. Поэтому исследования направленные на решение обозначенных проблем являются весьма актуальными

ЦЕЛЬ И ЗАДАЧИ ИССЛЕДОВАНИЙ. Целью нашей работы являлось изучение эпизоотологии и этиологической структуры псевдомоноза животных в крае, изучение основных биологических свойств выделенных изолятов *P aeruginosa* и на их основе разработать технологию получения в лабораторных и производственных условиях гипериммунной поливалентной сыворотки, испытать ее в лабораторных условиях и на практике при энзоотиях псевдомоноза

Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи

- изучить распространение и этиологическую структуру псевдомоноза свиней и крупного рогатого скота в хозяйствах Краснодарского края,
- изучить некоторые биологические свойства выделенных культур *P aeruginosa*,
- разработать технологию лабораторного/промышленного изготовления гипериммунной поливалентной сыворотки против псевдомоноза животных,

- провести испытания опытных микросерий сыворотки и при псевдомонозе животных в производственных условиях,

НАУЧНАЯ НОВИЗНА. Изучена эпизоотология и этиологическая структура псевдомоноза свиней и крупного рогатого скота в Краснодарском крае. Отобраны 10 культур *P. aeruginosa* десяти серотипов наиболее часто выделяемых от животных в крае с наиболее выраженными антигенными и иммуногенными свойствами, на которые оформлены паспорта. Данные штаммы *P. aeruginosa* использованы в лабораторных и производственных условиях для получения гипериммунных поливалентных сывороток. Впервые разработана технология лабораторного и производственного получения гипериммунной поливалентной сыворотки против псевдомоноза животных. Разработаны методы контроля активности полученной сыворотки, которая успешно испытана в производственных условиях при псевдомонозе поросят и телят.

ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ. В результате изучения этиологии заболевания, установлены наиболее часто выделяемые от животных культуры *P. aeruginosa*, из них отобраны 10 изолятов десяти серотипов с выраженными антигенными, иммуногенными и вирулентными свойствами. Штаммы можно использовать для приготовления поливалентных сывороток и вакцин против псевдомоноза.

Разработана и испытана технология получения и контроля в лабораторных и производственных условиях поливалентной гипериммунной сыворотки против псевдомоноза животных.

Изготовленная поливалентная сыворотка показала хороший профилактический и лечебный эффект на поросятах, телятах и свиноматках при энзоотиях псевдомоноза, и может быть рекомендована для широкого производственного изготовления и применения.

АПРОБАЦИЯ РАБОТЫ. Основные положения и результаты исследований изложенные в диссертационной работе, доложены и одобрены

- на 7^{ой} региональной научно – практической конференции молодых ученых «Научное обеспечение агропромышленного комплекса», Краснодар 2005,

- на международной научно – практической конференции, посвященной 60 – летию ГНУ Краснодарского НИВИ «Актуальные проблемы ветеринарии в современных условиях», Краснодар, 2006,

- на заседаниях Ученого совета НИВИ 2005 – 2007гг

ПУБЛИКАЦИИ по материалам исследований опубликовано 6 научных работ.

ОСНОВНЫЕ ПОЛОЖЕНИЯ ДИССЕРТАЦИИ, ВЫНОСИМЫЕ НА ЗАЩИТУ:

- эпизоотология псевдомоноза в Краснодарском крае,

- биологические свойства изолятов *P. acutigenosa*, выделенных от животных,

- получение в лабораторных условиях микросерий гипериммунной поливалентной сыворотки против псевдомоноза животных и их испытание,

- получение в производственных условиях на волах гипериммунной поливалентной сыворотки против псевдомоноза и изучение ее свойств

- испытание опытной гипериммунной поливалентной сыворотки против псевдомоноза на свиньях и телятах

ОБЪЕМ И СТРУКТУРА ДИССЕРТАЦИИ Диссертация изложена на 130 страницах машинописного текста, иллюстрирована 26 таблицами, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследования и их обсуждения, выводов и практических предложений. Список цитируемой литературы включает 175 источников, из них 104 отечественных и 71 иностранных авторов

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследования проводили в соответствии с государственным планом научных работ по заданиям, утвержденным Российской Академией сельскохозяйственных наук в 2004 – 2007 годах в лаборатории эпизоотологии Краснодарского научно – исследовательского ветеринарного института, Краснодарской межобластной ветеринарной лаборатории, на Армавирской биофабрике, в хозяйствах Краснодарского края

При выполнении работ было поставлено 8 научно производственных опытов, при этом использовано 2456 белых мышей, 195 морских свинок, 24 кролика, 855 поросят разного возраста, 111 телят в возрасте 1 – 2 месяцев, 238 свиноматок и 9 волов – продуцентов

Всего проведено 480 бактериологических исследований проб различных материалов из хозяйств края и опытных животных, 340 серологических исследований, 65 гематологических, 65 биохимических

Распространение, вопросы сезонности и зональности псевдомоноза животных изучали путем анализа данных собственных исследований, данных межобластной и некоторых районных ветеринарных лабораторий, за последние 5 лет

При бактериологических исследованиях 480 проб материала от животных, используемых кормов, проб воды, навоза, объектов животноводческих ферм было изолировано 672 различных микроорганизмов, из них 105 изолятов *P. aeruginosa* Культуральные, различные биологические свойства выделенных культур, изучали проведением бактериологических, биохимических, серологических и других исследований

Для проведения исследований пользовались известными методами, изложенными в руководствах «Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии» (1985), «Медицинские лабораторные технологии» (1999), а также руководствовались «Методическими рекомендациями по диагностике, профилактике и лечению псевдомоноза сельскохозяйственных животных» (2003)

В процессе проведения бактериологических исследований были использованы материал от животных павших и вынужденно убитых и пробы объектов окружающей среды, вода, корма и др

Посевы делали в пробирки с МПА, МПБ, МППБ, а также на чашки Петри с агаром Эндо Пробирки и чашки Петри с посевами инкубировали в термостате при 37°C в течении 24 – 48 часов, после чего отдельные колонии характерные для *P. aeruginosa* пересеивали на другие среды для дальнейших исследований

Культурально – морфологические свойства изолятов, а также биохимическую и протеолитическую активность изучали общепринятыми методами

Серологические исследования проводили методом постановки реакции агглютинации на стекле и пробирочным методом по общепринятым методикам, описанным в «Методических указаниях по лабораторным исследованиям на псевдомонад животных и птиц» (1988года) Серотипизацию выделенных изолятов *P. aeruginosa* проводили с типоспецифическими сыворотками изготовленными ГИСК им Тарасевича в Москве, а также с сыворотками, изготовленными Армавирской биофабрикой (20 серотипов) Постановкой реакции агглютинации пробирочным методом мы также определяли уровень специфических антител в сыворотках крови кроликов и волков, гипериммунизированных определенными культурами *P. aeruginosa*

Вирулентные свойства выделенных изолятов *P. aeruginosa* определяли на беспородных белых мышах весом 18 – 20грамм За меру вирулентности культуры синегнойной палочки считали среднюю смертельную дозу микроорганизмов LD50 (доза микробов вызвавших гибель 50% зараженных мышей), которую вычисляли по методу Кербера

Полученные дозы LD50 и LD100использовали при определении антигенных и иммуногенных свойств изучаемых изолятов, и превентивной активности опытных сывороток крови

С использованием вышеописанных методов исследований было изучено 105 изолятов, из них были отобраны 10 наиболее часто выделяемых от свиней и крупно рогатого скота культуры *P. aeruginosa*, наиболее вирулентные и активные в антигенном и иммуногеном отношении, на них оформлены паспорта

Антигеном для получения гипериммунной моно и поливалентной сывороток служили эти 10 штаммов *P. aeruginosa* №18 (O1), №47(O2), №37 (O3), №19 (O4), №2 (O6), №13 (O10), №70 (O11), №66 (O13), №29 (O18), №28 (O19), изолированные нами

Получение гипериммунных сывороток в предварительных опытах проводили в лаборатории КНИВИ и кролиководческом хозяйстве ООО «Усть – Лабинскгазстрой» Усть – Лабинского района, на беспородных здоровых кроликах, массой по 3 0 – 3 5 кг

Иммунизацию кроликов, проводили моно и поливалентными антигенами инактивированными 0,3% формалина. Поливалентные антигены составляли из моноантигенов, добавляя каждого десятую часть. В 1 см³ смешанного антигена содержалось 1 миллиард микробных тел каждого серотипа

Было использовано 24 кролика, которых разделили на 6 групп и им по группам вводили антигены из десяти серотипов

Активность сыворотки определяли по уровню (титров) специфических антител к каждому серотипу в реакции агглютинации с антигенами используемыми для получения сывороток и по уровню защитных свойств на белых мышцах, с последующим их заражением каждым из исходных штаммов используемых для получения сывороток

Опыты по получению гипериммунных сывороток на волах проводили на Армавирской биофабрике. Руководствуясь методикой Пруцакова С В (2000) Для этой цели было отобрано девять волов четырех летнего возраста, массой 750 – 800 кг

Антиген для гипериммунизации волов готовили поливалентный. Культуру каждого штамма *P. aeruginosa* выращивали на бульоне Хоттингера отдельно, доводили концентрацию до 10 миллиардов микробных тел в 1 см³ инактивировали 0 3 % формалина, все 10 антигенов смешивали в равных объемах инактивировали 14 суток

В производственных условиях эффективность (активность) гипериммунной сыворотки проверяли на свиньях (поросятах и свиноматках) и на телятах, в хозяйствах неблагополучных по псевдомонозу

Цифровые данные полученных результатов собственных исследований подвергали биометрической обработке с помощью программ Microsoft Excel 2000 на компьютере с процессором

Pentium 3, степень достоверности «Р» устанавливали по распределению Стьюдента.

2.2. ЭПИЗООТОЛОГИЯ ПСЕВДОМОНОЗА ЖИВОТНЫХ В КРАСНОДАРСКОМ КРАЕ.

2.2.1 РАСПРОСТРАНЕНИЕ И КЛИНИЧЕСКОЕ ПРОЯВЛЕНИЕ ПСЕВДОМОНОЗА

Чтобы внести более полную ясность в эти вопросы, мы подвергли анализу результаты бактериологических исследований материалов от разных видов животных, а также кормов, смывов с животноводческих объектов и окружающей среды, проведенных в лаборатории эпизоотологии Краснодарского НИВИ, ветеринарных лабораториях края, (в том числе и межобластной), за последние 5 лет. При этом было установлено, что *P. aeruginosa* выделяется в 10,7 – 12% от количества выделенных микроорганизмов.

Инфицированность синегнойной палочкой животных, птиц, кормов и объектов внешней среды, в крае имеет широкое распространение.

На протяжении ряда лет идет постоянное интенсивное инфицирование кормов, животных, объектов окружающей среды, а следовательно и продуктов животноводства, мяса, молока и других продуктов получаемых из зерновой основы и т.д.

Нами в лаборатории КНИВИ и хозяйствах края исследовано 480 проб патологического материала от животных разных видов, в том числе 171 проба от крупного рогатого скота, 197 проб патологического материала от павших и больных свиней. Исследовано 68 проб различных кормов, используемых на животноводческих фермах и 44 пробы материала из самых различных объектов внешней среды: вода, навозные стоки, смывы со станков и кормушек в животноводческих корпусах и т.д.

Общая обсемененность изучаемых объектов была очень высокой. Из общего количества изолированных культур было выделено *E. coli* – 26,2%, *Streptococcus albus* ssp. – 23,7%, *P. vulgaris*, *P. subtilis* ssp. – 16,7%, *P. aeruginosa* – 15,6%, различные грибы – 8,4%, *Salmonella* – 7,3%, различные анаэробы – 2,1%. Как видно из результатов исследований выделение изолятов *P. aeruginosa* в общем из всех учтенных объектов стоит на четвертом месте, причем от 25 до 32% выделение культур было в чистом виде, а большей частью в

ассоциациях с другими микроорганизмами по 2, 3, 4 и более
Выделение изолятов из патологического материала от свиней составляло 19,5%, от крупного рогатого скота 16,3%, а из кормов 12,4%

Отмечено повышенное выделение культур возбудителя в районах с наиболее интенсивным животноводством и птицеводством в Тимашевском, Брюховецком, Ленинградском, городе Краснодаре

Установлено наибольшее количество выделение культур в осеннее – зимнее – весенний период с ноября по март месяцы по 11 – 12% В летние же месяцы выделение культур *P aeruginosa* резко сокращалось, достигая минимума в июле – августе – 5 – 6%

Источниками псевдомонозной инфекции на животноводческих фермах являлись молодые животные (поросята, телята и т д) больные псевдомонозом, а так же взрослые свиноматки, коровы больные эндометритами, маститами, хряки – производители и пробники псевдомоносоносители

Заболевание поросят и телят псевдомонозом регистрировали в Брюховецком, Щербиновском, Каневском, Ейском, Павловском и Выселковском районах чаще в хозяйствах с низкой санитарной культурой, с длительным и неправильным хранением кормов Во всех случаях диагноз подтверждали лабораторными исследованиями

2 2 2 БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ВЫДЕЛЕННЫХ ИЗОЛЯТОВ *P AERUGINOSA*

Выделенные 105 изолятов *P aeruginosa* в лабораторных условиях подвергали всесторонним исследованиям Бактериальные клетки *P aeruginosa* представляли собой грамотрицательные, подвижные, короткие, прямые с закругленными концами палочки, расположенные одиночно, иногда парами, а изредка короткими цепочками

Выделенные культуры спор и капсул не образовывали, но активно продуцировали слизь, которая выявлялась при окраске по Гинсу

Продуцирование сине – зеленого пигмента пиоцианина отмечено у 102 (97 1%) изолированных культур

Гемолитическими свойствами *P. aeruginosa*, в нашем случае 93 культуры (88.6%) обладали β – гемолизом и только 12 культур (11.4%) обладали α – гемолизом

Все полученные изоляты пептонизировали молоко

Кислотобразующие свойства активно проявлялись только при ассимиляции глюкозы (68.5%), Не очень активно выделенные культуры образовывали сероводород (43.8%), еще меньше индол (21.0%)

Типизацию полученных изолятов *P. aeruginosa* проводили в реакции агглютинации на стекле иногда пробирочным способом Типированию поддались 103 культуры (98%), оставшиеся 2 культуры не дали положительной реакции агглютинации ни с одной из 20 типоспецифических сывороток Установлена положительная реакция агглютинации с 14 сыворотками Изоляты от свиней относились к 11 серотипам, наибольший процент изолятов следующих серотипов O4, O10, O18, O19 по 12,5%, O6, O13 – по 10,1%, O11 – 8,3%

От крупного рогатого скота изолировано 9 серотипов *P. aeruginosa* O19 – 20%, O3 – 17,1%, O11 – 14,3%, O1, O6 и O18 по 11,4%, O13 – 8,6%

Изоляты выделенные из кормов O1, O3, O19 по 23%, O13 – 15,4%, O11 и O18 по 7,7% Из объектов внешней среды изолированы культуры серо типов O1, O2, O3, O13, и O12

Не все изоляты *P. aeruginosa* обладали одинаковой вирулентностью, 9 из 105 (8,6%) вообще были авирулентны По степени вирулентности отмечено, что высоковирулентных изолятов, т.е. вызывающих гибель белых мышей от 125 миллионов микробных тел, было 54,3%, вирулентных – 21% и слабовирулентных – 16,1% Наибольшее количество вирулентных изолятов получено от свиней – 95,9%, от крупного рогатого скота – 94,4% От этих же видов живогных больше всего выделено высоковирулентных культур 63,2 и 63,9% соответственно

Исследованиями не отмечено четкой зависимости между серогрупповой принадлежностью и уровнем вирулентности выделенных изолятов

С целью определения иммуногенности подобранных 10 культур *P. aeruginosa* мы из каждого изолята готовили убитый моноангиген и вводили их белым мышам Напряженность

иммунитета проверяли заражением опытных мышей LD100 исходными монокультурами через 21 день после иммунизации

Опыты показали, что все испытуемые культуры *P. aegyptiosus* оказались достаточно иммуногенными, создавали протективную защиту в 85 – 95% опытных животных

Окончательно отобрали 10 культур *P. aegyptiosus*, десяти серотипов O1, O2, O3, O4, O6, O10, O11, O13, O18, O19, которые использовали в дальнейшей работе для приготовления гипериммунных сывороток

2.3. ПОЛУЧЕНИЕ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ ГИПЕРИММУННЫХ СЫВОРОТОК ПРОТИВ ПСЕВДОМОЗОА И ИХ ИЗУЧЕНИЕ.

Работу проводили на кроликах и белых мышах

Антиген для иммунизации кроликов готовили по описанной выше методике с содержанием 1 миллиарда микробных тел на миллилитр

Использовано 24 кролика. В первых четырех группах кроликам вводили моноантиген. Первая группа серотипа O2 штамма №47. Вторая группа серотипа O4 штамма №19. Кроликам третьей группы серотипа O13 штамма №66, кроликам четвертой группы моноантиген серотипа O13 штамма №66, но две последние инъекции делали с иммуностимулятором - левамизолом по 0,3 см³ подкожно.

В пятой и шестой группах использовали 10 кроликов по 5 в каждой группе. Кроликам пятой группы вводили полиантиген состоящий из 10 моноантигенов десяти серотипов O1, O2, O3, O4, O6, O10, O11, O13, O18, O19 с содержанием 1 миллиард микробных тел на см³.

Пяти кроликам шестой группы вводили такой же полиантиген, но во время двух последних (6 –й и 7 – й) инъекций вводили левамизол по 0,3 см³ на кролика.

Кроликам всех групп антиген вводили по одной схеме: первые две инъекции через 4 дня по 1 миллиарду микробных тел, третью и четвертую по 2 миллиарда микробных тел, а пятую, шестую и седьмую по 3 миллиарда микробных тел каждого серотипа.

Специфические антитела кроликов уже после третьей иммунизации достигали средних титров 1 213 – 1 320. После пятикратного введения 1 512 – 1 640. После семикратной инъекции антигенов титры антител утроились по сравнению с предыдущим исследованием, а у кроликов, которым вводили антигены с левамизолом – титры были на 33 – 40% выше, чем у кроликов, которым левамизол не вводили.

Изучали динамику формирования защитных свойств после трех, пяти и семикратного введения антигена, с левамизолом и без левамизола. Сыворотку кроликов каждой группы смешивали в равных количествах и вводили мышам внутривенно в разных дозах, а через сутки их заражали гомологичными культурами в дозе LD100,

Дозы в 0,2 см³ защищали 36 – 60% мышей от гибели. А дозы 0,5 см³ защищали все 100% мышей.

После пятикратного введения антигена защитные свойства в дозе 0,1 миллилитр стали выше в 2 – 4 раза по сравнению с первым исследованием. Доза 0,2 миллилитра предохраняла все 100% мышей от заражения, кроме серотипа O2, где защита составила 80%. У кроликов после семикратного введения антигенов защитные свойства в дозе 0,1 миллилитр выражались 80 – 100%, а у тех, которым вводили левамизол, они были 100%. Сыворотки кроликов всех групп после семикратного введения антигенов в дозе 0,2 миллилитра защищали всех мышей, взятых в опыты.

2.4. ПОЛУЧЕНИЕ ПОЛИВАЛЕНТНЫХ ГИПЕРИММУННЫХ СЫВОРОТОК ПРОТИВ ПСЕВДОМОНОЗА НА ВОЛАХ И ИХ ИЗУЧЕНИЕ.

В цехе №3 Армавирской биофабрики было отобрано 9 здоровых волов черно - пестрой породы, 4 – 4,5 летнего возраста, массой 750 – 800 кг. У волов предварительно определили фоновые показатели крови и сыворотки.

Была разработана схема гипериммунизации волов поливалентным псевдомонозным антигеном, состоящим из тех же 10 серотипов как и для кроликов.

Было сформировано две группы волов. Первая – 5 волов, и вторая – 4 вола, которым кроме антигена после грундиммунизации вводили левамизол.

Согласно используемой схемы грундиммунизация продолжалась 34 дня. Всего было сделано 10 инъекций через 3 – 4 дня каждая. Начали вводить антиген с дозы в $5,0 \text{ см}^3$ постепенно увеличивая ее на определенный объем. В одном см^3 содержалось 1 миллиард микробных клеток каждого из 10 серотипов *P. aeruginosa*. После грундиммунизации проводили основную иммунизацию – гипериммунизацию антигеном в дозе 150 см^3 всего три раза через 3 – 4 дня. Волам обеих групп во время грундиммунизации вводили только поливалентный антиген. Волам второй группы после окончания грундиммунизации, с одиннадцатой инъекции вводили подкожно по 10 см^3 раствора левамизола. Антиген для гипериммунизации волов готовили в условиях Армавирской биофабрики по описанной методике.

У волов кровь для контроля брали до опыта, на седьмой день после первого введения антигена, через 21 день после начала иммунизации, через 32 дня после начала введения антигена. После окончания основной гипериммунизации спустя 8 дней у волов взяли кровь для получения сыворотки из расчета 16 грамм на килограмм веса вола. Из взятой крови получили сыворотку, консервировали 0,5% раствором фенола, выдерживали 30 суток, подвергли фильтрации через фильтроэлемент «Мелипор», а затем фасовали во флаконы, проверяли по внешнему виду, а также на безвредность, стерильность и активность.

Поливалентные сыворотки подвергли исследованию на активность по уровню титров специфических антител и по защитным (превентивным) свойствам.

До введения антигена у волов не было выявлено специфических антител к *P. aeruginosa*. После двукратного введения поливалентного антигена титры антител достигли титров $1:34 \pm 4,86$. После шестикратного – титры возросли в 14 раз. Антитела формировались ко всем 10 антигенам входящим в общий полиантиген с некоторой разницей в величине титра. После десятикратной иммунизации титры увеличились в среднем в 30 раз. После тринадцатикратной иммунизации титры антител повысились до уровня $1:1820$. Антигены всех 10 серотипов вызывали интенсивное образование специфических антител, в титрах $1:720 - 1:2560$, но более активны оказались антигены серотипов O1, O4, O6, O18 и O19.

В группе волов, которым вводили левамизол титры антител были выше на 28%

Отобранные для гипериммунизации волов штаммы *P. aeruginosa* оказались с высокими антигенными свойствами, активно способствовали образованию специфических антител

Превентивные (защитные) свойства сывороток крови гипериммунизированных волов определяли на белых мышах весом 18 - 20 грамм. В опыт взяли 180 мышей, на каждый серотип по 15 зверьков, и 30 контрольных. Полученную сыворотку исследовали после 13 инъекций антигена без левамизола. Брели дозы сыворотки по 0,05 – 0,1 и 0,2 см³ и каждую вводили внутривентриально мышам, а затем через одни сутки всех 15 мышей заражали 2LD50 культурой каждого серотипа внутривентриально, используемого для получения сыворотки. Контрольным вводили сыворотку от здорового крупного рогатого скота в дозе 0,2 миллилитра.

Гипериммунная сыворотка после 13 кратного введения антигена приобрела, высокие превентивные свойства и в дозе 0,2 миллилитра защищала 86% мышей от заражения гомологичными культурами 10 серотипов *P. aeruginosa*. Доза в 0,1 миллилитра защищала 72% мышей. Наиболее высокие иммуногенные свойства показали антигены серотипов O1, O6, O13, O19. В контроле пали все 30 мышей.

Затем мы проверили как шло увеличение защитных свойств по мере иммунизации волов и как на это влияло введение левамизола.

После шестикратного введения антигена, гипериммунные сыворотки защищали только 60% опытных мышей. После десятикратного введения антигена защита мышей увеличивалась до 74%, а тринадцатикратное введение антигена предотвращало гибель 86% белых мышей. Еще выше защитные свойства сыворотки были выражены у волов, которым вводили левамизол. Они возросли до 94%.

Отмечена закономерность, чем выше титры специфических антител, тем выше защитные свойства гипериммунной сыворотки.

Культуры серотипов O1, O6, O13, O19 вызывали более интенсивное проявление защитных свойств сывороток крови.

Таблица 1

№ п/п	серотип антигена	к-во мышей	доза сыво- ротки в мл	после введения антигена			
				6-ти кратного	10-ти кратно-	13 – ги кратного	
						без лева- мизола	с лева- мизолом
1	O1	20	0 2	2/3	1/4	-/5	-/5
2	O2	20	0 2	2/3	2/3	1/4	-/5
3	O3	20	0 2	2/3	2/3	2/3	1/4
4	O4	20	0 2	2/3	1/4	1/4	-/5
5	O6	20	0 2	1/4	-/5	-/5	-/5
6	O10	20	0 2	3/2	1/4	1/4	1/4
7	O11	20	0 2	3/2	2/3	1/4	1/4
8	O13	20	0 2	2/3	1/4	-/5	-/5
9	O18	20	0 2	2/3	2/3	1/4	-/5
10	O19	20	0 2	1/4	1/4	-/5	-/5
	контроль	30	Пр	-	-	30/-	-
	Всего мышей	23		20/30	13/37	7/43	3/47
	%	10		40/60	26/74	14/86	6/94

Примечание в числителе к-во павших мышей, в знаменателе к-во выживших

Выясняли сроки проявления защитных свойств гипериммунной сыворотки от момента введения. Группам мышей по 5 штук вводили по 0,2 см³ исследуемой сыворотки без левамизола, а другим группам, также по 0,2 см³ с левамизолом. Затем мышей каждой группы заражали культурой каждого из 10 серотипов 2LD50 на 5, 10, 14, 16 дни после введения сыворотки. В контроле мышам вводили обычную сыворотку КРС.

Опытные сыворотки уже через пять дней после введения, защищали 86% зараженных мышей, через 10 дней 80%, через 14 дней – 58%, а через 16 дней – 18%.

В группе мышей, которым вводили сыворотку, полученную с левамизолом, на 14 день живыми остались 66% зараженных мышей, а на 16 день – 22%.

Данный опыт был повторен на морских свинках, которым гипериммунную сыворотку, вводили внутримышечно по 1 см³

Результаты были аналогичными с предыдущим опытом. На десятый день после введения сыворотки защитные свойства проявлялись активно, сохранено 84% зверьков. На четырнадцатый день они составляли лишь 62 – 68%, а на 16 день после введения сыворотки, ее защита составляла всего лишь 20 – 24%

Мы разработали и предлагаем контроль на активность сыворотки ставить на белых мышах или на морских свинках. Для этого брать 5 мышей 18 – 20 грамм весом на каждый серотип используемого антигена, вводить внутривнутрибрюшинно по 0,3 миллилитра готовой сыворотки и через сутки заражать их внутривнутрибрюшинно или подкожно по 0,3 миллиарда микробных тел вирулентного используемого штамма. Учет вести 10 суток. Если выживает 80% мышей, при гибели 80% в контроле, то сыворотку считать активной, и она проходит контроль. Белых мышей можно заменить морскими свинками 250 – 300 грамм весом.

На каждый штамм антигена брать 5 свинок, подкожно вводить им по 2 миллилитра испытуемой сыворотки, через 1 сутки заражать внутривнутрибрюшинно 2 LD₅₀ каждого серотипа. Срок наблюдения 10 суток. Если выжило 4 свинки из 5, при гибели в контроле 4 из 5 – сыворотку считать активной, прошедшей контроль.

Нами установлено, что в процессе гипериммунизации, за период в 50 дней от начала до конца опыта в крови волов на 10% уменьшились показания гемоглобина, количество эритроцитов на 5%, но возросло количество лейкоцитов на 9,5%.

Уменьшилось количество эозинофилов и моноцитов, но на 18% увеличилось палочкоядерных и на 26% сегментоядерных лейкоцитов, в основном обеспечивающих фагоцитоз в организме животного.

Содержание общего белка сыворотки крови за период гипериммунизации возросло на 8,3%, причем у волов, которым антиген вводили с левдмизолом это увеличение выше на 2%. Произошел сдвиг в соотношении белковых фракций сыворотки доноров. Содержание γ – глобулинов за период гипериммунизации увеличилось на 16,4%, содержание альбуминов за этот же период уменьшилось на 17,6%.

2. 5. ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ГИПЕРИММУННОЙ ПОЛИВАЛЕНТНОЙ СЫВОРОТКИ ПРОТИВ ПСЕВДОМОНОЗА НА СВИНЬЯХ.

В СПК «Щербиновский», на СТФ№1 сразу после отъема начали болеть поросята 50 – 60 дневного возраста

Отмечали повышение температуры тела на 0,5 – 1,0 °С, иногда диарея, чаще кашель, прогрессирующее исхудание, значительный падеж (до 35%) Лечение стрептомицином, тетрациклиновыми давало низкую эффективность В лаборатории эпизоотологии КНИВИ были изолированы вирулентные культуры *P aeruginosa* серогипа O2 Из больных и здоровых поросят были сформированы группы и по группам начали их лечить и профилактировать заболевание разными методами Лечение поросят стрептомицином и тетрациклином давало эффективность 61,5%

Лечение гипериммунной поливалентной сывороткой против псевдомоноза изготовленной на Армавирской биофабрике серия № 1 в дозе 0,3 миллилитра на килограмм веса два раза с интервалом 5 -7 дней давало эффективность 71%.

Применение гипериммунной сыворотки подкожно в дозе 0,5 см³/кг дважды с интервалом в 5 – 7 дней давало эффективность 86%, а применение сыворотки по 1 см³/кг эффективно в 81%. Применение гипериммунной сыворотки здоровым поросятам с профилактической целью по 0,5 см³ на килограмм веса животного даже однократно обеспечило сохранность поросят на 90,6%

Установлено, что из 58% проб материалов от поросят, лечившихся сывороткой удавалось выделить *P aeruginosa* Это удавалось и у 26% проб мочи от вылечившихся поросят. Применение сыворотки не обеспечивало стерилизацию организма поросят от возбудителя болезни

В тоже время из материала павших и вынужденно убитых поросят лечившихся антибиотиками, возбудитель *P aeruginosa* удавалось изолировать только в 12% случаев, а из мочи вылечившихся антибиотиками поросят изоляты *P aeruginosa* выделить не удалось

Таблица №2

Группа животных (поросята)	к-во поросят в опыте	дозы и кратность сыворотки в мл/кг	пало голов	выздоровело голов	% эффективности
Больные	62	0,3×2	18	44	71,0
Больные	64	0,5×2	9	55	86,0
Больные	63	1,0×1	12	51	81,0
Больные	26	Стрептомидин, тетрациклин	10	16	61,5
Здоровые контактные	53	0,5×1	5	48	90,6
Здоровые контактные контроль	14	-	8	6	42,8

Второй опыт провели в ЗАО «Дружба» На СТФ №1 начались массовые аборт и мертворождения свиноматок. Абортировали матки за 15 – 20 дней до опоросов. У плодов отмечали кровоизлияние на сердце, селезенке, даже по коже, в пахах. У свиноматок отмечали мертворождения. Часть приплода была мертвой, а иногда мумифицированной, разложившейся. У таких свиноматок отмечали трудно излечимые, катарально – гнойные эндометриты. Часть поросят, родившихся нормальными, были слабыми, с плохим сосательным рефлексом, весом 700 – 800 грамм. При лабораторных исследованиях выделяли *R. aeruginosa*, серотипа O2. Схема и результаты опыта сведены в таблицу № 3.

Высокую эффективность 96,8% показало комбинированное применение супоросным свиноматкам поливалентной сыворотки Армавирской биофабрики серии №1 и антибиотиков (стрептомицин, полимиксин) за 20 – 25 дней до ожидаемого опороса. Затем (по убывающей) была группа свиноматок, которым применяли гипериммунную сыворотку по 0,5 миллилитра на килограмм веса двукратно через 7 – 10 дней. Аборты и мертворождения у животных этих групп не регистрировали. Хороший терапевтический эффект по профилактике и лечению эндометритов (84,2%) отметили в группе

опоросившихся свиноматок, которым применяли препарат жироформ вместе с гипериммунной сывороткой

В этом же хозяйстве при распространении заболевания на поросят группы дорастивания, была проверена эффективность сыворотки опытной серии №1

Наиболее эффективным было применение больным пороссятам сыворотки по 0,5 миллилитра на килограмм веса в комбинации с антибиотиком полимиксином – 96,3% Хорошие результаты получены при применении здоровым пороссятам сыворотки с профилактической целью – 89% и применение больным пороссятам сыворотки по 0,5 см³/кг дважды с интервалом в 5 – 7 дней – 80,1%

Таблица №3

Группы свиноматок	к-во свиноматок	сыворотка	аборт мертворожденные	эндометрит	выздоровело	%эффективности
		доза кратность				
Супоросные	54	0,5×2	-	6	48	88,9
Супоросные	62	0,5×1 полимиксин	-	2	60	96,8
Супоросны контроль	48	полимиксин стрептомицин	2	9	37	77,1
Эндометритные	38	0,5×1 жир-рм	-	6	32	84,2
Опоросившиеся контроль	36	жироформ	-	11	25	69,4

В племзаводе ЗАО «Краснодонское» Волгоградской области заболели пороссята 2 – 3 месячного возраста. Заболевание сопровождалось диареей, кашлем, исхуданием, иногда у поросят отмечали судороги

В лаборатории племзавода изолирована *P. aetuginosa* высокой вирулентности (серотип Об)

Для профилактики и лечения больных применили опытную поливалентную сыворотку против псевдомонады, серии №1,

изготовленную на Армавирской биофабрике Сыворотку вводили подкожно по 0,5 мл/ кг больным пороссятам двукратно через 10 дней и 1 раз здоровым Параллельно была сформирована группа больных, которых лечили антибиотиками

Лечением установили, что сыворотка предотвращала заболевание у здоровых пороссят в 96,0% При лечении явно больных пороссят сывороткой эффективность составила 84,5% При лечении традиционными методами эффективность составила 46,1%

2.6. ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ГИПЕРИММУННОЙ ПОЛИВАЛЕНТНОЙ СЫВОРОТКИ ПРОТИВ ПСЕВДОМОНОЗА НА ТЕЛЯТАХ.

В ООО «Атаманское» на МТФ№ 1 началось заболевание телят 4 – 15 дневного возраста Болезнь характеризовала острым течением, потерей аппетита и слабостью Температура тела повышалась до 41 °С, учащался пульс и дыхание, у некоторых появлялось слюнотечение, нервные явления, серозный ринит

Бактериологическими исследованиями подтвержден диагноз на псевдомоноз серотипа O1 Отобрали 38 больных телят разделили их на группы и начали лечить различными методами, в том числе и сывороткой, изготовленной на Армавирской биофабрике серия №1

Результаты опыта отражены в таблице № 4 Наиболее эффективным оказалось применение гипериммунной сыворотки телятам с профилактической целью по 0,5см³ веса 2 раза с интервалом в 10 дней Из 18 телят, которым применяли сыворотку заболело только 2 и то в легкой форме, которые быстро выздоровели Сохранность в группе составило 100%

Применение гипериммунной сыворотки больным телятам подкожно по 0,5 м³/кг 2 раза с интервалом 5 – 7 дней оказалось эффективным на 81,2 % Ниже эффективность была в группе телят, которых лечили стрептомицином, полимиксином в течение 3 – 4 дней, выздоровело 8 (66,7%)

Таблица №4

№	Группы телят	к-во опыте	введение сыворотки		забо- тело телят	пало телят	выз- доро- вело голов	% Эффе- тивнос- сти
			доза	крат- ность				
1	Больные	16	0,5	2	16	3	13	81,2
2	Больные	12	анти-	отики	12	4	8	66,7
3	Здоровые	18	0,5	2	2	-	18	100,0
4	Контроль	2	-		2	1	1	50,0

Второй опыт провели в феврале 2007 года на предприятии «Колос» ЗАО фирмы «Агрокомплекс» на МТФ № 1 Заболевание телят началось с признаков поражения органов дыхания и пищеварения Болели телата в возрасте 10 – 20 дней Температура тела повышалась до 41,3 °С Одышка, кашель, иногда пенистые истечения из носа, вялость, потеря аппетита, быстрое исхудание, у некоторых телят диарея Падеж доходил до 38%

Выделена культура *P aeruginosa*, серотипа О3

Отобрали 38 больных телят в возрасте 12 – 15дневного возраста, разделили их на группы и начали лечить, сывороткой из отовленной на Армавирской биофабрике ^итрадиционными методами лечения

Наибольшая эффективность получена при лечении больных телят сывороткой по 0,5см³, дважды и антибиогиками – 100% Высокие результаты 91,7% получены при лечение одной сывороткой по 0,5 см³ дважды с интервалом в 5 дней

Введение сыворотки здоровым телятам с профилактической целью, предохраняло 90% поросят это на 20% выше, чем применение одних антибиотиков

3. ВЫВОДЫ

1 Инфицированность свиней в крае возбудителем псевдомоноза составляет 8,7 – 13,1 %, крупного рогатого скота – 9,8 – 12,9 %, птиц 10,3% - 11,1% Такая эпизоотическая ситуация способствует проявлению как самостоятельному заболеванию молодняка, так и абортam, мертворождениям, ММА у маток, высокой контаминации кормов, а это в свою очередь – массовым осложнениям при отравлениях и незаразных заболеваниях

2 а) Выделенные из различных объектов изоляты *P aeruginosa* были высоковирулентными – 54,3%, вирулентными – 21,0%, слабовирулентными – 16,1%, и авирулентными – 8,6% Наибольшей вирулентностью обладали культуры выделенные от свиней – 99,9%, и от крупного рогатого скота – 94,4%

б) Серологические исследования показали, что в крае животных инфицируют 14 серотипов *P aeruginosa* У свиней 11, у крупного рогатого скота – 9 Наиболее часто выделяли изоляты от данных видов животных следующих серотипов O1, O2, O3, O4, O6, O10, O11, O13, O18, O19

3 Используемые 10 штаммов *P aeruginosa* десяти серотипов для получения гипериммунных поливалентных сывороток против псевдомоноза животных проявляли высокие антигенные и иммуногенные свойства В процессе гипериммунизации они способствовали образованию специфических антител в титрах $1\ 2515 \pm 123$ у кроликов, и $1\ 1820 \pm 68,36$ у волов, а также стимулировали формирование защитных свойств сывороток крови у кроликов и волов

4 Защитные свойства гипериммунных поливалентных сывороток против псевдомоноза четко проявлялись при введении лабораторным животным с последующим их заражением гомологичными штаммами Сохранность последних составляла от 90 до 100%

5 Введение кроликам и волам в период гипериммунизации иммуностимулятора левамизола способствовало более интенсивному накоплению специфических антител и повышению превентивных свойств сывороток на 18 – 29%

6. Гипериммунизация волов антигенами *P aeruginosa* вызвала в организме последних существенную перестройку отмечено уменьшение эритроцитов на 5 % и гемоглобина на 10%, увеличи-

лось количество лейкоцитов на 9,5% и особенно сегментоядерных и палочкоядерных на 26%. Увеличилось содержание общего белка сыворотки крови на 8,3%, содержание γ – глобулинов на 16,4%, а содержание альбуминов снизилось на 17,6%

7 а) Применение гипериммунной поливалентной сыворотки при энзоотиях псевдомоноза поросят профилактировало заболевание в 89,0 – 96,0 % , излечивало больных в 80,1 – 86,0 % , что на 24,0 – 30,4 % выше традиционной терапии антибиотиками. У свиноматок применение сыворотки значительно сокращало аборты, мертворождения и заболевание эндометритами

б) Применение гипериммунной поливалентной сыворотки телятам при энзоотиях псевдомоноза профилактировало заболевание на 90,0 – 100,0 % , при лечении больных показало эффективность 81,2 – 91,7 %

в) Профилактическая и терапевтическая эффективность сыворотки повышалась на 8 – 20 % при комбинированном применении ее с антибиотиками (полмиксин, тетрациклин)

8 Высокая терапевтическая эффективность сыворотки проявлялась до 10 дня, затем начинала снижаться, на 14 день составляла 62 – 68%, а к 16 дню всего 20 – 24%

9 Общая экономическая эффективность от применения гипериммунной поливалентной сыворотки при энзоотиях псевдомоноза поросят и телят составила 7 рублей на каждый вложенный рубль

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1 Огобраны по антигенным и иммуногенным свойствам культуры *P. aeruginosa* 10 серотипов наиболее часто выделяемых у сельскохозяйственных животных для гипериммунизации волов с целью получения в производственных условиях поливалентной сыворотки против псевдомоноза

2 Разработана и испытана технология промышленного производства и методы контроля гипериммунной поливалентной сыворотки против псевдомоноза на волах

3 Подготовлена НТД на гипериммунную поливалентную сыворотку против псевдомоноза животных

4 Разработана инструкция по применению гипериммунной сыворотки против псевдомоноза с профилактической и лечебной целью для поросят и телят при энзоотиях псевдомоноза

5. СПИСОК РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1 Дубровин И И Вопросы эпизоотологии псевдомоноза сельскохозяйственных животных в Краснодарском крае / Васильев А К , Болоцкий И А , Семенов В И , Пруцаков С В , Дубровин И И // Материалы международной научно-практической конференции "Ветеринарная медицина-2005 сучасний стан та актуальні проблеми забезпечення ветеринарного благополуччя гваріинництва", / Васильев А К , Болоцкий И А , Семенов В И , Пруцаков С В , Дубровин И И , Харьков, 2005, с 198 – 202

2. Дубровин И И Экспериментальное получение и испытание эффективности гипериммунной сыворотки против псевдомоноза животных / Пруцаков С В , Дубровин И И , Болоцкий И А , Семенов В И , Васильев А К И А , Семенов В И , Васильев А К //Материалы международной научно-практической конференции "Профилактика и меры борьбы с лейкозом крупного рогатого скота в Российской Федерации", Екатеринбург, 2005., стр 192– 196

3 Дубровин И И Испытание гипериммунных сывороток при псевдомонозе сельскохозяйственных животных /Дубровин И И //Материалы 7 региональной научно – практической конференции молодых ученых « Научное обеспечение агропромышленного комплекса»Краснодар, 8-9 декабря 2005 г стр 204–205

4 Дубровин И И Эпизоотология псевдомоноза животных в России и южном федеральном округе / Пруцаков С В , Семенов В И , Болоцкий И А , Васильев А К , Дубровин И И // Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 60 – летию ГНУ Краснодарского НИВИ «Актуальные проблемы ветеринарии в современных условиях» г Краснодар, 2006, стр 204 – 207

5 Дубровин И И Изыскание методов специфической терапии животных, больных псевдомонозом /Дубровин И И , Болоцкий И А , Семенов В И , Пруцаков С В , Васильев А К , //Материалы международной научно-практической конференции, посвященной 60 – летию ГНУ Краснодарского НИВИ «Актуальные проблемы ветеринарии в современных условиях» г Краснодар, стр 137– 139

6 Дубровин И И Распространение псевдомоноза свиней и специфическая терапия при данном заболевании /Болоцкий И А , Васильев А К , Дубровин И И , Семенов В И , Пруцаков С В // Свиноводство - 2007 -№3

Подписано в печать 27 04 2007 г. Формат 60x84 $\frac{1}{16}$
Бумага офсетная Офсетная печать
Печ л 1 Заказ № 257
Тираж 100 экз

Отпечатано в типографии КубГАУ
350044, г Краснодар, ул Калинина, 13