

На правах рукописи



БЕДОЕВА Залихан Михайловна

**ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ИММУНОЛОГИЧЕСКОГО
МОНИТОРИНГА И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ОСТРЫХ
КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ ЖИВОТНЫХ
И УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СРЕДСТВ
СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОФИЛАКТИКИ**

16.00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология
03.00.23 – биотехнология

А В Т О Р Е Ф Е Р А Т
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2006

Работа выполнена в Федеральном государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина» (ФГОУ ВПО МГАВМиБ)

Научные консультанты: доктор биологических наук, профессор, академик РАСХН Воронин Евгений Сергеевич; доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАСХН Девришов Давудай Абдулсемедевич

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор Тихонов Игорь Владимирович; доктор ветеринарных наук, профессор Белоусов Василий Иванович; доктор ветеринарных наук Пирожков Михаил Константинович.

Ведущая организация: государственное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности».

Защита диссертации состоится «24» ноября 2006 г. в «14» часов на заседании диссертационного совета Д.220.042.01 в ФГОУ ВПО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии им. К.И. Скрябина» по адресу: 109472, г. Москва, ул. Академика Скрябина, 23. тел. (495) 377-93-83.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГОУ ВПО МГАВМиБ.

Автореферат разослан «24» октября 2006 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Грязнева Т.Н.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Актуальной проблемой остаются заболевания желудочно-кишечного тракта молодняка сельскохозяйственных животных, проявляющиеся диареей. ОКЗ регистрируются во всех странах и устойчиво занимают ведущее место среди всех инфекционных заболеваний. Совокупный экономический ущерб, наносимый животноводству в зависимости от уровня развития может достигать до 50% и более.

Отечественными и зарубежными исследователями установлено, что массовые диареи, как патология у молодняка сельскохозяйственных животных, вызываются комплексом причин, в котором ключевой основой является инфекционная природа (Воронин Е.С. с соавт. 1989, 1996; Девришов Д.А., 2000; Moon H.W. et al., 1976; Raska H., 1980. Smith H.W., 1995). Микроорганизмы, вызывающие синдром острого кишечного заболевания (ОКЗ), являются в основном сателлитными для макроорганизма и внешней среды. Их патогенное действие, прежде всего, проявляется при пониженной естественной резистентности организма, воздействии стресс факторов (технологические нарушения в кормлении, содержании и воздействии неблагоприятных факторов внешней среды).

Рекомендуемые профилактические мероприятия - обеспечение полноценного кормления и надлежащих условий содержания коров, поддержание на должном уровне ветеринарно-санитарного состояния ферм и родильных отделений, своевременное выпаивание телят молозивом, не в полной мере дают ожидаемый результат, так как не учитывают инфекционный фактор развития диарей.

Многообразие факторов возникновения ОКЗ снижает эффективность профилактических и терапевтических мероприятий и требует проведения широкого спектра диагностических исследований в большинстве случаев результаты, которых имеют ретроспективное значение.

В этой связи вопросы разработки средств для эпизоотологического мониторинга и оперативной, и ретроспективной диагностики ОКЗ являются весьма актуальными для своевременного проведения лечебно-профилактических и ветеринарно-санитарных мероприятий.

Наиболее приемлемой среди известных диагностических тестов для широкого практического применения является реакция непрямой гемагглютинации (РНГА) с применением антигенных диагностикумов,

которая характеризуется высокой специфичностью, чувствительностью и методически доступна для ветеринарных лабораторий.

Цель и задачи исследований. Целью работы являлось проведение эпизоотологического мониторинга и лабораторно-диагностических исследований по выделению и идентификации микроорганизмов, являющихся основными этиологическими факторами возникновения острых кишечных болезней молодняка сельскохозяйственных животных; разработка тест-систем для диагностики, иммунологического мониторинга и прогнозирования инфекционного процесса, а также усовершенствование средств специфической профилактики ОКЗ.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи:

1. Провести эпизоотологический мониторинг и установить роль микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae в этиологии ОКЗ.
2. Идентифицировать и изучить иммунобиологические свойства штаммов микроорганизмов основных возбудителей ОКЗ.
3. Разработать биотехнологические параметры получения и очистки бактериальных антигенов, и создания эритроцитарных тест-систем для диагностики эшерихиоза, сальмонеллеза, клебсиеллеза и протейной инфекции.
4. Провести исследования по оптимизации методов получения, стабилизации и сенсibilизации эритроцитов.
5. Разработать схемы гипериммунизации кроликов для получения высоко-специфических иммунных сывороток к штаммам E.coli, Salmonella, Klebsiella, Proteus.
6. Компоновка диагностических эритроцитарных антигенных РНГА-наборов к энтеробактериям и их экспериментальные и производственные испытания.
7. Провести исследования по мониторингу иммунного фона у животных с использованием РНГА.
8. С учетом данных эпизоотических и иммунологических исследований усовершенствовать антигенный состав вакцины против ОКЗ, а также технологические параметры ее производства и применения.

Научная новизна. Впервые проведен эпизоотологический мониторинг распространения энтеробактерий – возбудителей желудочно-кишечных болезней сельскохозяйственных животных в различных регионах России.

Выделены и охарактеризованы по антигенному составу и факторам патогенности микроорганизмы семейства Enterobacteriaceae, являющиеся основными возбудителями ОКЗ.

Усовершенствованы методы получения антигенов, обработки и сенсибилизации эритроцитов для изготовления эритроцитарных диагностикумов.

Впервые разработаны антигенные эритроцитарные тест-системы для диагностики, иммунологического мониторинга и прогнозирования бактериальных инфекций у животных, вызываемых микроорганизмами родов *E.coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus*.

Усовершенствована технология производства и применения вакцины ассоциированной инактивированной против колибактериоза, сальмонеллеза, клебсиеллеза и протейной инфекции телят, поросят, ягнят и пушных зверей (вакцина ОКЗ).

Научная новизна результатов исследований подтверждена 9 патентами на изобретение:

- Патент Российской Федерации на изобретение № 2218395 «Штамм бактерий *Proteus vulgaris* № 25, используемый для изготовления иммунных препаратов» от 10.12.2003.

- Патент Российской Федерации на изобретение № 2217494 «Штамм бактерий *Proteus mirabilis* № 26, используемый для изготовления иммунных препаратов» от 27.11.2003.

- Патент Российской Федерации на изобретение № 2218176 «Штамм бактерий *Salmonella dublin* № 19, используемый для изготовления вакцин и диагностических препаратов» от 10.12.2003.

- Патент Российской Федерации на изобретение № 2218177 «Штамм бактерий *Salmonella enteritidis* № 22, используемый для изготовления вакцин и диагностических препаратов» от 10.12. 2003.

- Патент Российской Федерации на изобретение № 2216350 «Штамм бактерий *Salmonella typhimurium* № 14, используемый для изготовления вакцин и диагностических препаратов» от 20.11.2003.

- Патент Российской Федерации на изобретение № 2222591. «Штамм бактерий *E.coli* 09:K99 № 28, используемый для изготовления иммунных препаратов» от 27.01.2004. ,

- Патент Российской Федерации на изобретение № 2222592. «Штамм бактерий *E.coli* 0138:K88 № 27, используемый для изготовления иммунных препаратов» от 27.01.2004.

- Патент Российской Федерации на изобретение № 2221864. «Штамм бактерий *K. pneumoniae* № 23, используемый для изготовления иммунных препаратов» от 20.01.2004.

- Патент Российской Федерации на изобретение № 2224019. «Штамм бактерий *K. pneumoniae* № 24, используемый для изготовления иммунных препаратов» от 20.01.2004.

Практическая значимость. Разработаны и утверждены в установленном порядке 4 набора нормативных документов, регламентирующих промышленное производство, контроль и применение антигенных эритроцитарных диагностикумов для диагностики, иммунологического мониторинга и прогнозирования бактериальных инфекций у животных, вызываемых возбудителями семейства Enterobacteriaceae утвержденные Департаментом ветеринарии МСХ РФ в 2004 г.

Разработаны методические рекомендации: Методические рекомендации по диагностике и иммунологическому мониторингу эшерихиозов у сельскохозяйственных животных; Методические рекомендации по диагностике и иммунологическому мониторингу сальмонеллезов у сельскохозяйственных животных; Методические рекомендации по диагностике и иммунологическому мониторингу протейной инфекции у сельскохозяйственных животных; Методические рекомендации по диагностике и иммунологическому мониторингу клебсиеллезной инфекции у сельскохозяйственных животных (утверждены Отделением ветеринарной медицины РАСХН, протокол №2 от 25 апреля 2006 г).

Апробация результатов диссертации. Основные положения диссертационной работы изложены в отчетах НИР ФГОУ ВПО МГАВМиБ им.К.И.Скрябина за 1997-2005гг и 36 печатных работах. Материалы диссертации доложены на научных конференциях профессорско-преподавательского состава, научных сотрудников и аспирантов ФГОУ ВПО МГАВМиБ (1997-2002 гг.); международных научных и научно-практических конференциях (Щелково, 2001г, Киров, 2001, Самарканд, 2003, 2006, Москва, 2005, 2006).

Основные положения и результаты, выносимые на защиту:

1. Результаты эпизоотологического мониторинга и клинико-диагностических исследований при ОКЗ молодняка крупного рогатого скота.
2. Этиопатогенетические факторы и возбудители ОКЗ молодняка животных и их иммунобиохимическая характеристика.
3. Биотехнологические и методические основы получения и конъюгации антигенных комплексов *E.coli*, *Salmonella*, *Klebsiella*, *Proteus* и референс-сывороток к ним для РНГА.
4. Результаты экспериментальных и производственных испытаний разработанных РНГА тест-систем;
5. Результаты исследований по усовершенствованию вакцины ОКЗ.

Публикации. По результатам диссертационной работы опубликовано 36 работ, в том числе 14 статей в научных журналах, 8 - в сборниках научно-практических конференций, 5 методических рекомендаций, 9 патентов.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 302 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, результатов исследований, обсуждения, выводов, практических предложений, списка использованной литературы (246 отечественных и 130 иностранных авторов), приложений. Работа содержит 41 таблицу и 38 рисунков.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Материалы и методы исследований

Работа выполнена в период с 1988 по 2005 гг. в ФГОУ ВПО МГАВМиБ, ФГУП (ОАО) «Покровский завод биопрепаратов», ООО «Агровет» и в животноводческих хозяйствах и фермах различных регионов России (Московская область, Тульская область, Ставропольский, Краснодарский края и др.), а также в некоторых животноводческих хозяйствах стран СНГ (Казахстан, Кыргызстан).

Объектом исследования служили 854 теленка в возрасте от 1-го до 120 дней и 1248 стельных коров.

Различными методами было исследовано 1658 проб крови, патологического материала (кусочки паренхиматозных органов, кровь из сердца, содержимое отделов кишечника и желудка), содержимого прямой кишки от больных и здоровых телят, а также 289 проб смывов с объектов внешней среды (поилки, подстилка и предметы ухода за телятами).

Бактериологические исследования проводили современными методами выделения и идентификации бактериальной микрофлоры, а также с использованием СИБ (системы индикаторные бумажные), ПБДЭ (пластины бактериологические дифференциальные энтеробактерий). Результаты идентификации выделенных изолятов оценивали по определителю микроорганизмов Берджи (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1997). Первичную идентификацию проводили с использованием простых и селективно-дифференциальных сред (МПА, МПБ, среда Эндо, агар Плоскирева, висмут-сульфит агар, селенитовая среда, среда Минка, среда Ворфеля – Фергюсона, среда Олькеницкого и желточно-солевой агар Чистовича) и микроскопированием мазков окрашенных по Граму.

Количественный подсчет микробных клеток в единице содержимого кишечника и патологическом материале проводили в модификации НИЛИПиБ (Е.С. Воронин, Д.А. Девришов и др., 2004).

Антибиотикочувствительность определяли с помощью стандартных дисков.

Отбор штаммов для разработки диагностикумов проводили с учетом данных эпизоотологического и иммунологического мониторинга, патогенных и вирулентных свойств.

Изучение продукции экзо- и энтеротоксинов штаммами энтеробактерий проводили биологическими (метод лигированной кишки кролика, и на животных) и иммунологическими методами (реакция двойной диффузии в геле, РНГА и ИФА).

Гематологические исследования проводили общепринятыми методами, а также с использованием автоматических гемоцитометров марки Picoscel и Abacus junior VET.

Растворимые антигены к этиологическим значимым штаммам энтеробактерий получали различными методами: экстрагирование антигенов трихлоруксусной кислотой по Буавену, водно-фенольной экстракцией по Вестфалю, водно-солевой экстракцией, водной экстракцией, аутолизом, экстрагированием солянокислым гидроксиламином.

У полученных различными методами антигенов изучали физические (рН, оптическая плотность), биохимические (содержание белков, углеводов, липидов, нуклеиновых кислот) свойства с использованием общепринятых методов (по Lowry, реакции с фенол-серной кислотой, по Вобо и Еагон, по А. Спирину), а также на современном аналитическом оборудовании высокой чувствительности - автоматический биохимический анализатор Stat Fax 1904 Plus, цифровой спектрофотометр Apel PD-303U, автоматический иммуноэлекторофорез.

Получение гипериммунных сывороток проводили на здоровых интактных кроликах породы шиншилла обоего пола массой 2,5-3,0 кг, путем иммунизации их соответствующими антигенами (растворимые и корпускулярные инактивированные и живые антигены).

Антигенные свойства и иммуногенную активность полученных антигенов и контрольных гипериммунных сывороток изучали в РА, РНГА с гетерологичными и гомологичными антигенами и в реакции иммунодиффузии в агаровом геле по Оухтерлони (РИД).

В качестве носителей гемосенсибинов использовали эритроциты барана, стабилизированные формалином по методу Вайнбаха (1958) в модификации НИЛИПиБ.

Чувствительность и специфичность разработанных эритроцитарных диагностикумов определяли с референс-сыворотками в РНГА и реакции торможения непрямо́й гематтглютинации (РТНГА). Постановку РНГА проводили микрометодом в планшетах для иммунологических реакций

с U-образными лунками в объеме 50 мкл. Предварительные результаты реакции оценивали через 3 – 4 часа, окончательные – через 18 – 24 часа. РТНГА ставили в полистироловых планшетах в объеме 1000 мкл. Начальное разведение антигена составляло 100 мкг в мл, из которого готовили двукратные разведения антигена от 1:20 до 1:40960. Доза сыворотки составляла величину от 2 до 4 гемагглютинирующих единиц (ГАЕ). Учет реакции проводили через 18-20 часов.

Статистическую обработку данных проводили по методу Ашмарина И.П., Воробьева А.А., (1962), Пушкарева Н.В., Соболева А.Д., (1983) и использовали статистические программы (Excel и др.).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Эпизоотологический мониторинг и клинико-диагностические исследования

В результате эпизоотологического мониторинга, проведенного в животноводческих хозяйствах различных регионов страны, установлено, что острые кишечные заболевания у молодняка начинаются в 1–3 дня после рождения и проявляются поносом с быстро начинающимся обезвоживанием. В зависимости от физиологического развития животного, условий содержания и ухода, воздействия стресс-факторов, уровня обсемененности внешней среды условно-патогенными микроорганизмами болезнь протекала в сверхострой, острой и легкой формах.

Сверхострая форма характеризовалась повышением температуры тела, угнетением и быстрой гибелью животных в первые сутки после рождения без выраженных признаков диарей.

При острой форме на 2 – 3 сутки развивалась диарея (часто с примесью крови), развивалось обезвоживание (запавшие глазные яблоки, сухое носовое зеркальце, редкое или полное отсутствие диуреза, слабый тургор кожной складки). Температура понижалась до 36° – 37°С с последующей гибелью через 2–3 дня после появления симптомов.

Легкая форма характеризовалась кратковременной диареей. При этом общее клиническое состояние было удовлетворительным. Своевременное применение этиотропных и симптоматических средств способствовало выздоровлению.

При вскрытии 350 трупов павших животных с признаками острых кишечных заболеваний, отмечали характерную картину - содержимое кишечника жидкое с пузырьками газа, иногда с примесью крови, на слизистой оболочке кишечника отмечали множественные кровоизлияния и катарально-геморрагический гастроэнтероколит. Под эпикардом и

на эпикарде по ходу сосудов наблюдали кровоизлияния. Увеличение селезенки и застойные явления.

У телят из благополучной и неблагополучной по ОКЗ ферм изучали динамику заселения пищеварительного тракта микрофлорой в раннем постнатальном периоде и определяли ее количественный и качественный состав. Результаты исследования представлены в табл. 1.

1. Динамика заселения желудочно-кишечного тракта телят

Исследуемые животные	Концентрация бактерий кишечного содержимого в различные сроки исследования		
	1 сутки	3-4 сутки	7-14 суток
Телята из благополучной фермы	<i>E.coli</i> – 10^3 бифидобактерии- 10^5 лактобациллы - 10^6	Бифидо- и лактобактерии - 10^7 <i>E.coli</i> – 10^4 , <i>Proteus</i> , <i>Staphylococcus</i> – 10^3	Бифидо- и лактобактерии - 10^8 - 10^{10} , <i>E.coli</i> - 10^4 <i>Staphylococcus</i> - 10^3
Телята из неблагополучной фермы	бифидобактерии 10^3 лактобациллы - 10^4 <i>E.coli</i> – 10^6 - 10^7 , <i>Proteus</i> - 10^5 , <i>Staphylococcus</i> 10^3 - 10^4	Бифидо- и лактобактерии - 10^3 - 10^4 , <i>E.coli</i> – 10^5 - 10^6 <i>Proteus</i> - 10^5 , <i>Staphylococcus</i> 10^3 - 10^4	Бифидо- и лактобактерии – 10^6 - 10^7 <i>E.coli</i> – 10^5 - 10^6 <i>Proteus</i> 10^5 , <i>Staphylococcus</i> – 10^5 - 10^6

Как видно из данных таблицы, контаминация условно-патогенными микроорганизмами отмечалась с первых часов после рождения.

У телят из благополучной фермы в первые сутки после рождения при бактериологическом исследовании выделяли эшерихий, протей, энтерококки – 10^3 и бифидо- и лактобактерии 10^5 - 10^6 . На 3 – 4 сутки после рождения бифидобактерии и лактобациллы выделялись 10^6 – 10^8 , число эшерихий возросло, выделяли протей, стафилококки в – 10^3 .

К 7–14-дневному возрасту телят, при количественном подсчете микробных клеток, установлено, что бифидобактерии и лактобациллы содержались почти в равных соотношениях в концентрации 10^8 – 10^{10} , число эшерихий более 100 млн, а популяций стафилококков и протей было в 2 раза меньше, что характеризует нормобиоз кишечника животных.

Развивающиеся под влиянием различных факторов нарушения в микробиоценозе чаще всего выражались в дефиците бифидобактерий и лактобацилл, увеличении популяционного уровня различных видов условно-патогенных микроорганизмов.

У телят из неблагополучной фермы концентрация условно-патогенной микрофлоры была достоверно высокой 10^6 – 10^7 по сравнению с данными, полученными от здоровых животных. В содержимом кише-

ника больных телят бифидобактерии и лактобациллы отсутствовали или находились в незначительных количествах (10^2 - 10^3).

Гематологические исследования крови у телят, благополучных по ОКЗ, существенных сдвигов в гемограмме не выявляли (табл. 2.).

2. Гематологические показатели телят периода новорожденности в совхозе «Ямской» Московской области

Возраст телят, дн.	Гемоглобин, г/л	Эритроциты, $10^{12}/л$	Лейкоциты, $10^9/л$
1	133±4,5	8,52±0,19	9,2±0,34
4	125±2,2	6,80±0,25	6,9±0,12
7	120±2,0	6,71±0,14	6,9±0,11
14	116±1,7	7,85±0,15	5,8±0,15

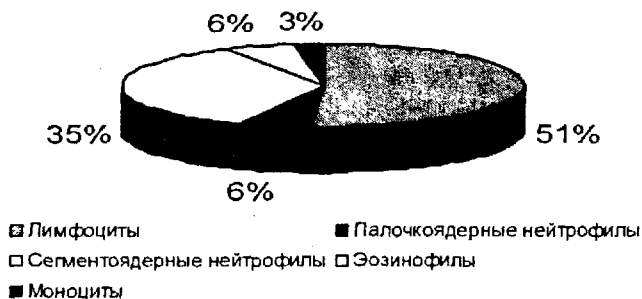
В первые 4 дня жизни в лейкоцитарной формуле преобладали клетки нейтрофильного ряда. Количество сегментоядерных нейтрофилов составляет до кормления 66,4±0,5%, а после первой выпойки молозива – 61,0±1,5%. С 4-дневного возраста происходило явное преобладание лимфоцитов. К 14-дневному возрасту относительное количество лимфоцитов повысилось на 33,3% при снижении нейтрофилов на 52,2%. Гранулоциты базофильного ряда у новорожденных телят не обнаруживались. Со стороны моноцитов и эозинофилов заметных количественных изменений не установлено. Результаты исследования представлены в табл. 3.

3. Лейкоцитарная формула крови телят периода новорожденности в совхозе «Ямской» Московской области

Возраст телят, дн.	Базо-филы, %	Эозино-филы, %	Нейтрофилы			Лимфо-циты, %	Моно-циты, %
			юные, %	палочко-ядерные, %	сегменто-ядерные, %		
1	-	1,9±0,1	0,6±0,1	11,8±0,18	61,0±1,5	29,0±0,1	1,6±0,05
5	-	1,0±0,1	0,4±0,05	5,9±0,05	39,0±1,5	58,0±0,2	1,5±0,05
10	-	1,5±0,4	0,3±0,05	4,9±0,25	34,0±1,7	63,0±0,3	1,3±0,08
14	-	1,7±0,08	-	4,8±0,20	30,0±0,3	65,3±0,2	1,1±0,05

У больных животных в первый день заболевания в крови отмечали снижение содержания гемоглобина (133 г/л – у здоровых и 98 г/л – у больных) и эритроцитов (7,5-8,52 млн./мкл – у здоровых и 6,9 млн./мкл – у больных). Это, видимо, связано с различной скоростью оседания эритроцитов, изменением их формы под действием токсинов энтеробактерий. Количество лейкоцитов снизилось почти в 5 раз по сравнению со здоровыми телятами того же возраста и в среднем составило 1,9 тыс/мм³ крови. Также происходило снижение содержания гемоглобина, увеличивалось процентное содержание лимфоцитов, эозинофилов и умень-

шалось содержание сегментоядерных нейтрофилов. Количество моноцитов составило 2,5%, а палочкоядерных 6%. Результаты исследования представлены на рис. 1.



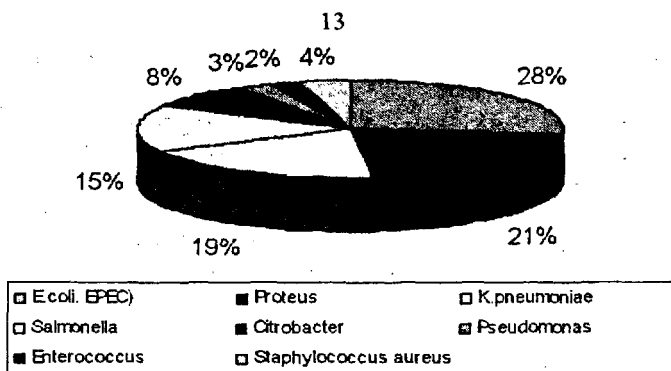
1. Диаграмма белой крови у телят больных ОКЗ

В сыворотке крови больных телят отмечено значительное снижение общего белка.

При расчете коэффициента корреляции выявлена высокая положительная связь изученных показателей с патологическим состоянием у животных.

При бактериологическом исследовании фекальных проб от больных и патологического материала от павших животных (толстый и тонкий отделы кишечника, мезентериальные лимфоузлы, сердце, почки, селезенка), костный мозг, а также смывов из объектов внешней среды было выделено и идентифицировано большое количество микроорганизмов из семейства *Enterobacteriaceae*. Часто из одного и того же хозяйства от животных выделялись 3–4 вида патогенных бактерий, что свидетельствует об ассоциированном течении болезни. Такая форма течения болезни у животных указывает на высокую степень вирулентности, а также устойчивости и приспособляемости энтеробактерий к факторам внутренней среды организма животных.

Микробиологическими исследованиями было идентифицировано 1260 культур. При изучении тинкториальных, морфологических, культуральных и ферментативных свойств было установлено, что изучаемые культуры хорошо росли на обычных и дифференциально-диагностических средах. В мазках, окрашенных по Граму, наблюдали в основном грамотрицательную микрофлору. Результаты исследования представлены на рис. 2.



2. Видовой спектр выделенных изолятов

Анализ видового спектра изучаемых культур показал, что наибольшие количества выделенных изолятов из всех объектов относились к патогенным и энтеротоксигенным сероварам *E.coli* (28,1 %), *Proteus* (21,2%), *Klebsiella pneumoniae* (19,1%), *Salmonella* (15,3%), *Citrobacter* (8,2%), *Staphylococcus* (4%), *Pseudomonas* (3,1%), *Enterococcus* (2,1%). При серологической идентификации выделенных 1260 изолятов установлено, что среди отдельных родов наиболее часто в большинстве обследованных регионах страны выделяли *E.coli* 09 (35,2 %); *E.coli* 0138 (28,4%); *E.coli* 0119 (18,7%); *Klebsiella pneumoniae* (78%); *Salmonella dublin* (25%); *Salmonella enteritidis* (31%); *Salmonella typhimurium* (29%); *Proteus mirabilis* (29%); *Proteus vulgaris* (53%).

Все выделенные изоляты энтеробактерий от больных и павших животных характеризовались высокой резистентностью к антибиотикам (гентамицину, сизомицину, бензилпенициллину, пefлоксацину, пиперациллину, кларитромицину, рокситромицину, эритромицину, офлоксацину, цефезолину, полимиксину, стрептомицину, тетрациклину, левомицетину).

Штаммы, у которых была доказана этиологическая роль в возникновении заболевания и ее исходе, а также с учетом их частоты регистрации в большинстве регионов были отобраны для дальнейших исследований. Всего было отобрано 30 культур у которых были изучены адгезивные, энтеротоксигенные, гемолитические и вирулентные свойства как основные факторы, определяющие их патогенность для животных.

Все штаммы *E.coli*, *Salmonella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus* обладали адгезивным антигенами (агглютинировали с антиадгезивными сыворотками K99, K88 и в ДМРГА).

При изучении токсигенных свойств было установлено, что *E.coli* 09, *E.coli* 0138, все штаммы *Salmonella* и *Proteus* продуцировали энтеротоксины и обладали гемолитической активностью. Штаммы *Klebsiella pneumoniae* характеризовались капсулообразованием, свидетельствующим о их патогенности.

Таким образом, отобранные штаммы характеризовались широкой распространенностью и наличием основных факторов патогенности, что было подтверждено при экспериментальном заражении лабораторных животных-гибель наступала через 24-72 часа.

В связи с тем, что в хозяйствах ОКЗ у молодняка преимущественно вызываются ассоциациями возбудителей, нами были проведены опыты по изучению патогенного действия различных сочетаний отобранных штаммов на здоровых лабораторных моделях. При заражении ассоциациями эшерихий сальмонелл и клебсиелл животные погибали в течение 10-12 часов; протеи сальмонеллы и эшерихии вызывали гибель через 7-8 часов после заражения.

В результате проведенных исследований установлено, что при смешанном инфицировании происходит усиление патогенных свойств, вызывая синегридный эффект.

Из 30 наиболее значимых в этиопатогенезе штаммов энтеробактерий для биотехнологических целей были отобраны 10 штаммов, обладающие более выраженной патогенностью, адгезивной и гемолитической активностью. Основные биологические характеристики штаммов представлены в табл. 4.

4. Биологические свойства производственных штаммов энтеробактерий

Штаммы	Антигенные свойства	Адгезивные свойства	Вирулентные свойства
<i>E.coli</i>	O9	K99	$1,2 \times 10^8$
<i>E.coli</i>	O138	K88	$4,6 \times 10^7$
<i>E.coli</i>	O119	-	$2,8 \times 10^7$
<i>K. pneumoniae</i>	K8	ДМРГА +	$3,1 \times 10^8$
<i>K. pneumoniae</i>	K2	ДМРГА +	$1,3 \times 10^7$
<i>S. dublin</i>	O9 (1 и 5 комплекс) H-p.g	ДМРГА +	$5,8 \times 10^8$
<i>S. enteritidis</i>	O9 (1 и 5 комплекс) H-g.m	ДМРГА +	$1,6 \times 10^7$
<i>S. typhimurium</i>	O4 (1 и 2 комплекс) и H-I	ДМРГА +	$< 3,2 \times 10^6$
<i>Pr. vulgaris</i>	O16 и H6	ДМРГА +	$< 2,4 \times 10^6$
<i>Pr. mirabilis</i>	O13 и H2	ДМРГА +	$< 1,7 \times 10^6$

Для производственных штаммов важным является наличие признаков, обеспечивающих индикаторную характеристику. Нами были проведены исследование по выработке маркировочных признаков путем

клонирования на селективных средах с добавлением антибиотиков. По результатам длительных селективных пассажей были выработаны генетически устойчивые признаки у всех отобранных штаммов – антибиотикорезистентность, не изменяющаяся при длительном пассировании, как на питательных средах, так и при пассировании на лабораторных животных. Также были проведены исследования по изучению нуклеотидного состава. Результаты исследований представлены в табл. 5.

5. Результаты генетической идентификации

Штаммы энтеробактерий	Нуклеотидный состав	Антибиотикорезистентность
E.coli 09:K99	ДНК (%ГЦ) – 62, плаз. м.в. 84 МД	стрептомицин, пefлоксацин, полимиксин
E.coli 0138:K88	ДНК (%ГЦ) – 59,2 плаз. м.в. 76 МД	эритромицин, сизомицин, рокситромицин
E.coli 0119	ДНК (%ГЦ) – 58,1 плаз. м.в. 73 МД	цефезолин, левомецетин, рокситромицин, сизомицин
K. pneumoniae	ДНК (%ГЦ) – 56,8, плаз. м.в. 60МД	бензилпенициллин, эритромицин, стрептомицин
K. pneumoniae	ДНК (%ГЦ) – 57,9, плаз. м.в. 60МД и 2МД.	эритромицин, левомецетин, стрептомицин
S. dublin	ДНК(%ГЦ) – 52, плаз. м.в. 63 МД	стрептомицин, рокситромицин, клоритромицин
S.enteritidis	ДНК (%ГЦ) – 53,1 плаз. м.в. 60 МД	бензилпенициллин, стрептомицин,
S.typhimurium	ДНК (%ГЦ) – 53,1 содержит плаз. м.в. 64 МД	бензилпенициллин, эритромицин, стрептомицин,
Pr. vulgaris	ДНК (%ГЦ) – 55,2 плаз. м.в. 64 МД	левомецетин, гентамицин, эритромицин
Pr. mirabilis	ДНК (%ГЦ) – 54,0 плаз. м.в. 64 МД	тетрациклин, пенициллин, стрептомицин, полимиксин

Полученные данные были использованы как генетические маркеры штаммов. Все 10 штаммов депонированы во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве под следующими номерами: E.coli 0138:K88 №27; E.coli 09:K99 №28; K.pneumoniae №23; K.pneumoniae №24; P.vulgaris №25; P.mirabilis №26; S.dublin №19; S.enteritidis №22; S.typhimurium №14, предназначенных для изготовления иммунологических и диагностических препаратов. На все штаммы получены патенты на изобретение.

Таким образом, выделенные и идентифицированные по биологическим и иммуногенным свойствам штаммы энтеробактерий являются основными возбудителями кишечных инфекций, характеризуются

высокой вирулентностью и генетически устойчивыми признаками, позволяющими их дифференцировать от эпизоотологических изолятов, и могут быть использованы при производстве иммуннобиологических препаратов (диагностикумов и вакцин против эшерихиозов, сальмонеллезов, клебсиеллезов и протейной инфекции).

Разработка антигенных эритроцитарных диагностикумов

Разработка эритроцитарных диагностикумов предусматривает ряд биотехнологических последовательностей: выбор метода и получение антигенов из производственных штаммов; получение референс-сывороток к антигенам; подбор антигеноносителя и его стабилизация; оптимизация условий сенсибилизации эритроцитов; компоновка компонентов диагностического набора; разработка методов контроля и инструкции по применению; экспериментальные и производственные испытания и внедрение в ветеринарную практику новых тест-систем для диагностики и иммунологического мониторинга и прогнозирования острых кишечных инфекций.

Выбор метода получения антигенов из производственных штаммов

При разработке эритроцитарных диагностикумов первостепенное значение имеет получение растворимых антигенов, содержащих наиболее важные компоненты бактериальной клетки, необходимые для диагностических целей.

Для этих исследований было отработано несколько методов: экстрагирование антигенов трихлоруксусной кислотой по Буавену, водно-фенольная экстракция по Вестфалу, экстрагирование солянокислым гидроксиламином, водно-солевая экстракция и аутолиз. Проведенными исследованиями было установлено, что наиболее оптимальным и универсальным для всех штаммов методом получения растворимых антигенов с достаточной иммуногенностью является метод экстрагирования солянокислым гидроксиламином (ЭСГ) в нашей модификации, заключающийся в сокращении сроков инкубации за счет использования более ранней генерации (10-12 часового роста) культур энтеробактерий, выращенных на синтетической питательной среде, и оптимизации параметров отмывания и центрифугирования, а также подбора концентрации ($48-50 \times 10^9$ микр.кл./мл), установления расчетного количества гидроксиламина (0,05 мг на 10^9 микр.кл.), времени инкубации при 56° (48 часов) и перемешивания только в первые сутки

(2-4 раза в течение 10-15 минут). В результате оптимизации предварительных этапов нам удалось также сократить сроки диализа на 2-3 суток и повысить выход специфических антигенов в 3-3,5 раза.

Биохимический состав антигенов полученных, различными методами представлен в табл. 6.

6. Биохимический состав антигенов энтеробактерий, полученных различными методами

Метод	Химический состав, %	Штаммы			
		E.coli	Salmonella	K.pneumoniae	Proteus
Соляно-кислый гидроксид-амин	Белок	46,0-49,0	45,0-50,0	10,5-11,3	48,0-51,0
	Углеводы	37,0-38,0	25,0-30,0	53,9-57,5	33,5-34,7
	Липиды	13,1-15,0	12,0-14,0	2,2-2,4	13,5-14,7
	Нуклеиновые кислоты	4,3-4,6	2,0-3,0	3,5-3,7	4,5-5,0
	% выхода	11-14%	12-15	10-15	12-15
По Буавсну (ГХУ-кислота)	Белок	28,0-30,0	18,0-20,0	-	29,5-31,1
	Углеводы	51,0-53,0	35,0-45,0	-	52,8-54,0
	Липиды	11,0-13,0	8,0-8,5	-	14,0-15,1
	Нуклеиновые кислоты	0,45-0,62	1,5-2,0	-	0,53-0,68
	% выхода	4,1-4,3	4,0-4,5	-	4,2-4,5
Водно-солевая экстракция	Белок	-	50,0-55,0	-	-
	Углеводы	-	27,0-30,0	-	-
	Липиды	-	-	-	-
	Нуклеиновые кислоты	-	5,0-7,0	-	-
	% выхода	-	3,0-5,0	-	-
По Вестфалу (вода-фенол)	Белок	10,0-11,0	-	-	9,8-10,4
	Углеводы	35,5-37,0	-	-	34,2-35,8
	Липиды	8,0-9,0	-	-	8,1-9,0
	Нуклеиновые кислоты	9,6-10,1	-	-	10,5-10,9
	% выхода	4,6-4,9	-	-	4,5-4,8
Водная экстракция	Белок	-	-	21,5-23,1	-
	Углеводы	-	-	51,4-56,2	-
	Липиды	-	-	1,7-1,9	-
	Нуклеиновые кислоты	-	-	1,5-1,8	-
	% выхода	-	-	3-5	-
Аутолиз	Белок	-	-	11,6-12,4	-
	Углеводы	-	-	43,0-46,8	-
	Липиды	-	-	1,8-2,0	-
	Нуклеиновые кислоты	-	-	2,1-2,5	-
	% выхода	-	-	4-6	-

По содержанию белков и суммы углеводов и липидов можно косвенно судить о наличии в растворимом препарате основных антигенов клеточной стенки: О- и Н-антигенов эшерихий, сальмонелл и протеев, а высокое содержание углеводов в клебсиеллезном антигене вероятнее всего свидетельствует о присутствии кислых капсульных полисахаридов.

Из данных таблицы видно, что наиболее оптимальным методом получения растворимых антигенов является усовершенствованный метод дезинтеграции клеток солянокислым гидроксиламином. Этот метод не только позволяет получать препараты с наилучшими соотношениями антигенов клеточной стенки, но и является наиболее экономичным и технологичным, обеспечивает более высокий выход чистого антигена.

Получение референс-сывороток к антигенам энтеробактерий

Одним из важных компонентов тест-системы являются положительные сыворотки (референс-сыворотка), предназначенные для контроля чувствительности и специфичности эритроцитарных диагностикумов. Было испытано несколько схем иммунизации, при которых в качестве антигенных препаратов использовали как растворимые антигены, стимулирующие первичный иммунный ответ (ГА-антигены), так и корпускулярные препараты, полученные путем тепловой обработки или инаktivированных мертиолятом взвеси суточных агаровых культур штаммов, а также живые культуры. Для разных видов микроорганизмов схемы иммунизации были различными, в зависимости от степени патогенности их для иммунизируемых животных, а также иммуногенности конкретных штаммов. Инаktivированные антигены эшерихий оказались менее иммуногенными, в связи с чем для иммунизации были использованы живые культуры. Для получения гипериммунных сальмонеллезных сывороток не применяли корпускулярные антигены, ввиду высокой вирулентностью и использовали растворимые антигены сальмонелл.

По результатам проведенных исследований нами были разработаны методы иммунизации кроликов, обеспечивающие получение высокоактивных и специфичных референс-сывороток с титрами антител 1:5120 и выше у 100% иммунизированных кроликов. Схемы иммунизации представлены в табл. 7.

7. Схемы получения гипериммунных сывороток к энтеробактериям

Штаммы	Вид и доза антигена по срокам иммунизации						
	1 день	7 день	11 день	15 день	22 день	26 день	30 день
E.coli	ГА 50 мкг	ГА 50 мкг	ЖК $1,0 \times 10^9$	ЖК $1,5 \times 10^9$	ЖК $3,5 \times 10^9$	ЖК $2,0 \times 10^9$	ЖК $4,0 \times 10^9$
Proteus	ГА 30 мкг	ГК $0,5 \times 10^9$	ГК $1,0 \times 10^9$	ГК $2,0 \times 10^9$	-	-	-
K. pneumoniae	ГА 30 мкг	ГК $0,5 \times 10^9$	ГК $1,0 \times 10^9$	ГК $2,0 \times 10^9$	ГК $1,5 \times 10^9$	ГК $3,0 \times 10^9$	ГК $5,0 \times 10^9$
S. dublin и S. enteritidis	ГА 30 мкг	ГА 30 мкг	ГА 30 мкг	ГА 100 мкг	ГА 100 мкг	ГА 100 мкг	ГА 200 мкг
S. typhimurium	ГА 20 мкг	ГА 20 мкг	ГА 20 мкг	ГА 50 мкг	ГА 50 мкг	ГА 150 мкг	ГА 150 мкг

Примечание: ГА – растворимый антиген, полученный путем дезинтеграции тидроксаламином; ГК – корпускулярный антиген; ЖК – живая культура.

Специфичность гипериммунных сывороток проверяли в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) с гомологичными и гетерологичными антигенами.

В результате проведенных исследований было установлено, что клебсиллезные сыворотки давали перекрестные реакции с культурами *Salmonella* в титре 1:160 – 1:1280 и *E. coli* 09:K99 в титре 1:320, а также наблюдали внутривидовые перекрестные реакции между двумя штаммами *K. pneumoniae* при этом титры были достаточно высокими 1:1280 – 1:2560.

Гипериммунные сыворотки *Pr. vulgaris* и *Pr. mirabilis* давали перекрестные реакции с двумя штаммами *K. pneumoniae* в титре 1:160 – 1:1280, *S. dublin* и *S. enteritidis* 1:160 – 1:320, *E. coli* 0119 в титре 1:640.

Кроме того, отмечены перекрестные реакции между двумя видами *Proteus*, в титре 1: 5120.

У сальмонеллезных гипериммунных сывороток также отмечали выраженную реакцию между штаммами *S. dublin*, *S. enteritidis* и *S. typhimurium* в титрах 1:640 – 1:2560, а также они давали перекрестные реакции с гетерологичными культурами *E. coli* 0138:K88 в титре 1:160.

Более специфичными были эшерихиозные гипериммунные сыворотки, которые не давали внутривидовых перекрестных реакций. Существенных различий в титрах антител между нативными сыворотками и инактивированными в течение 1 часа при 56° С не было отмечено.

Для получения строго специфических сывороток нами были проведены исследования по адсорбции – удаление гетерологичных антител из сыворотки с помощью специфических антигенов-адсорбентов. В качестве адсорбентов использовали суточные культуры гетероло-

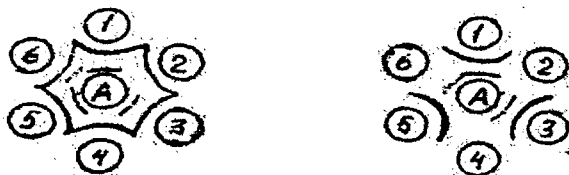
гичных штаммов энтеробактерий и растворимые антигены.

Насыщение сыворотки проводили взвесью нескольких интенсивно реагировавших штаммов, что приводило к снятию агглютининов к остальным гетерологичным штаммам. Полноту адсорбции проверяли в РА с гипериммунными сыворотками. После пятого этапа адсорбции нам удалось убрать межвидовые перекресты и получить строго специфические сыворотки. Однако внутривидовые перекрестные реакции между сероварами штаммов *K.pneumoniae*, *Salmonella*, *Pr.vulgaris* и *Pr.mirabilis* сохранялись в титрах 1:160 и выше.

Таким образом, нами были получены специфические референс-сыворотки: поливалентные сальмонеллезные сыворотки с титром 1:20480; поливалентные клебсиеллезные референс-сыворотки с титром 1:10240; поливалентные протейные референс-сыворотки с титром 1:20480 и моновалентные эшерихозные референс-сыворотки к сероварам: *E. coli* O119 с титром 1:10240; *E. coli* O9:K99 с титром 1:5120; *E. coli* O138:K88 с титром 1:10240.

Одной из основных характеристик антигенов, используемых в качестве гемосенситивов, является их антигенный состав. Проведенные исследования методом иммунодиффузии в агаровом геле по Оухтерлони позволили установить антигенный состав растворимых антигенов энтеробактерий.

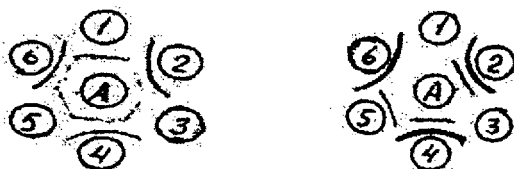
Результаты представлены на рис. 3.



1. *K. pneumoniae* 23 (кр.4)
2. *K. pneumoniae* 24 (кр. 1)
3. *K. pneumoniae* 23 (кр.5)
4. *K. pneumoniae* 24 (кр.2)
5. *K. pneumoniae* 23 (кр.6)
6. *K. pneumoniae* 24 (кр.3)

1. *K. pneumoniae* 23 (кр.4)
2. *E. coli* K88
3. *K. pneumoniae* 23 (кр.5)
4. *E. coli* K99
5. *K. pneumoniae* 23 (кр.6)
6. *E. coli* O1 19

Рис. 3. Специфичность антигена *K. pneumoniae* 23 в РИД
(антиген *K. pneumoniae* 23 - в центре)



1. *K. pneumoniae* 23 (кр.4)
2. *K. pneumoniae* 24 (кр. 1)
3. *K. pneumoniae* 23 (кр.5)
4. *K. pneumoniae* 24 (кр.2)
5. *K. pneumoniae* 23 (кр.6)
6. *K. pneumoniae* 24 (кр.3)

1. *E.coli* K88
2. *K.pneumoniae* 24 (кр. 1)
3. *E.coli* K99
4. *K.pneumoniae* 24 (кр. 2)
5. *E.coli* 0119
6. *K.pneumoniae* 24 (кр. 3)

Рис. 4. Специфичность антигена *K. pneumoniae* 24 в РИД
(антиген *K. pneumoniae* 24 - в центре)

В результате проведенных исследований было установлено, что антигены эшерихий образовывали линии преципитации, соответствующие О- и Н – антигенам эшерихий только с гомологичными сыворотками, т.е. обладали строгой специфичностью. Антигены *Pr. vulgaris* и *Pr.mirabilis* не образовывали линии преципитации с гетерологичными сыворотками, гипериммунные кроличьи сыворотки, полученные нами, давали с гомологичными антигенами по две линии преципитации. Наблюдались перекресты и между различными штаммами *Salmonella*, по-видимому это связано с наличием в их антигенной формуле родственных О- и Н – антигенов. Антигены *K. pneumoniae* образовывали линии преципитации как с гомологичными клебсиеллезными сыворотками, так и с сыворотками ко второму штамму *K. pneumoniae*, причем, если с гомологичной сывороткой антигены образовывали по 2 линии преципитации (К-антиген и, вероятно, общая для обоих штаммов нейтральная фракция полисахарида), то с гетерологичным клебсиеллезным антигеном образовывалась только одна линия преципитации, причем концы линий преципитации у гомологичных и гетерологичных препаратов сливались, что указывает на идентичность антигенов.

Подбор антигеноносителя и его стабилизация

Важным этапом при разработке РНГА тест-систем является носитель антигенов. В широкой практике чаще всего для этих целей используют эритроциты барана. Они являются наиболее пригодными корпускулярными носителями и успешно конкурируют с искусствен-

ными частицами (полистирол, поликриламид и т.д.) за счет наличия биологически активных эпитопов.

С целью выбора оптимального метода стабилизации эритроцитов было проведено сравнительное изучение четырех методов формализации: Фили (1958), П.И.-Шмутера М.Ф. (1969), Вайнбаха (1958), Вайнбаха в модификации НИЛИПиБ. Наиболее приемлемым для нас оказался метод Вайнбаха в нашей модификации (2006), которая заключалась в том, что формализацию эритроцитов проводили в течение 17 час, вместо 20 и встряхивали их первые 2 часа и последний час через каждые 15 мин, вместо постоянного перемешивания на магнитной мешалке. В модифицированном методе соотношение формалина и эритроцитов было 1:4 (у Вайнбаха – 1:3). Для консервации формализированных эритроцитов использовали 1% -ный формалин, вместо рекомендуемого раствора мертиолята 1:10000. Результаты исследования представлены в табл. 8.

8. Влияние различных методов формализации эритроцитов на чувствительность РНГА

Гемосенсиитин	Метод формализации			
	По Меньшову-Шмутеру	По Фили	По Вайнбаху	Модификации НИЛИПиБ
E. coli O138:K88	1:1280	<1:1280	1:5120	1:10240
E. coli O9:K99	1:640	>1:640	1:2560	1:5120
E. coli O119	1:1280	1:1280	1:5120	1:10240
K.pneumoniae №23	1:640	1:640	1:1280	1:1280
K.pneumoniae №24	1:1280	<1:1280	1:5120	1:10240
S. typhimurium	1:1280	1:5120	>1:10240	1:10240
S. enteritidis	1:640	1:1280	1:2560	1:5120
S. dublin	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240
Pr. mirabilis	1:1280	1:640	1:1280	1:5120
Pr. vulgaris	1:5120	1:2560	1:5120	1:10240

Из данных таблицы видно, что эритроциты, стабилизированные по методу Вайнбаха в модификации НИЛИПиБ, являются наиболее активными.

Формализированные эритроциты хранили в холодильнике при температуре (5±3) °С в течение 3–5 лет. В течение указанного срока наблюдения не было отмечено изменения каких-либо свойств эритроцитов.

Оптимизация условий сенсибилизации эритроцитов

Процесс сенсибилизации эритроцитов включает в себя нагрузку

формализированных эритроцитов антигенами.

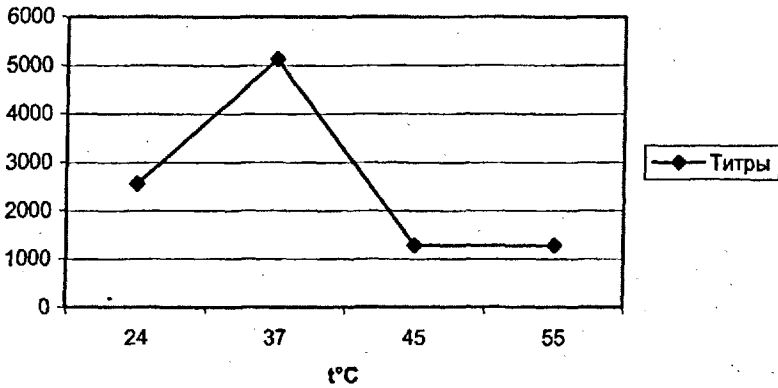
Для приготовления эритроцитарных диагностикумов нет рациональных методов и режимов, и в каждом конкретном случае подбираются они индивидуально.

При сенсибилизации эритроцитов учитывали такие факторы, как доза сенситина, температура, pH растворов и концентрацию эритроцитов.

Избыточная, как и недостаточная доза антигена, может привести к неспецифической агглютинации эритроцитов, а недостаточная, кроме того, не обеспечивает максимальной активности препарата. Для выбора сенсибилизирующей дозы в применении к конкретным антигенам энтеробактерий отработывали сенсибилизацию эритроцитов различными дозами: 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5 мг на 10 мл 2,5%-ной взвеси эритроцитов. Критерием оценки эффективности методов сенсибилизации служили чувствительность, величина ОСД и расход сенситина.

Для отработки оптимальной концентрации взвеси формализированных эритроцитов при нагрузке их антигенами испытаны концентрации: 5%; 10%; 15%; 20% эритроцитов барана. Наилучшие результаты удалось получить при использовании 5%-ной концентрации. С увеличением дозы антигена происходило нарастание титра РНГА (повышалось количество прочно связанного антигена) до определенной пороговой концентрации антигена, которая в нашем опыте равна 1,0 мг на 10 мл 2,5%-ной взвеси формализированных эритроцитов. При увеличении сенсибилизирующей дозы активность диагностикумов не только не возрастала более, но и в некоторых случаях даже снижалась. Такое снижение происходило, вероятно, от того, что избыточный, а потому непрочный связанный с носителем, антиген связывался с антителами сыворотки, но при этом не образовывался прочный комплекс «носитель – антиген – антитело», а потому не возникало визуальной агглютинации. Следовательно, увеличение количества антигена разумно до определенного предела, переход за который не приводило к увеличению чувствительности РНГА.

Для изучения роли температурного фактора на сенсибилизацию эритроцитов антигенами исследованы следующие параметры: 24°C, 37°C, 45°C и 55°C. Результаты представлены на рис. 5.

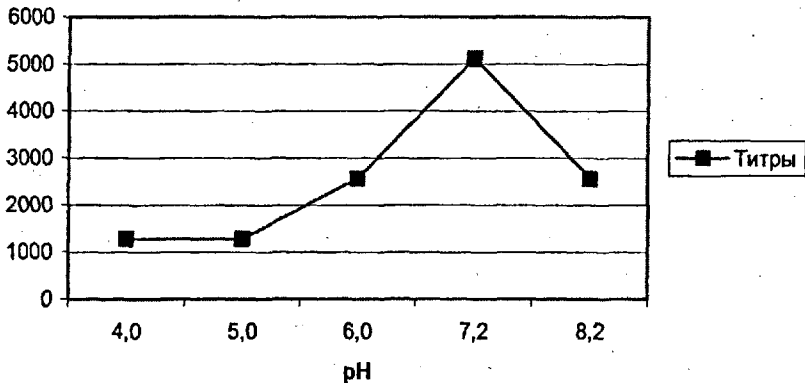


5. Влияние температуры на степень сенсibilизации эритроцитов

Из данного рисунка видно, что температура 37°C является наиболее оптимальной для проведения сенсibilизации эритроцитов.

Влияние pH среды на процесс сенсibilизации эритроцитов значение pH было изучено в диапазоне: 4,0; 5,0; 6,0; 7,2. Полученные результаты приведены на рис. 6.

Из данных рисунка видно, что оптимальное значение pH находится в пределах 6,0-7,2 ед.

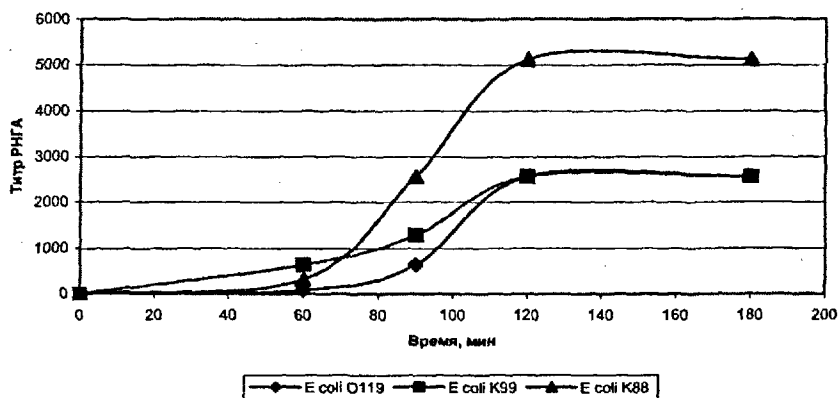


6. Зависимость уровня сенсibilизации от pH среды

Для различных антигенов методы сенсibilизации носителя могут существенно отличаться и от продолжительности сенсibilизации, которая может варьировать в достаточно широких пределах.

В своих исследованиях нами была изучена зависимость взаимодействия антигенов энтеробактерий с формализированными эритроцитами при экспозиции 60, 90, 120 и 180 минут.

При отработке оптимального времени сенсibilизации эритроцитов за рабочую дозу антигена принимали дозу, равную 1,0 мг на 10 мл 2,5%-ной эритроцитарной взвеси. Взаимосвязь чувствительности РНГА и длительности сенсibilизации формализированных эритроцитов представлена на рис. 7



7. Зависимость чувствительности РНГА от длительности сенсibilизации формализированных эритроцитов антигенами E.coli.

Как видно из приведенных графиков, активность полученных диагностикумов практически не менялась в интервале времени от 0 до 60 минут, затем возрастала с увеличением времени сенсibilизации в интервале от 60 до 120 минут, после чего активность полученных препаратов практически не менялась. Аналогичные результаты были получены нами и для остальных испытанных антигенов энтеробактерий.

Таким образом, время сенсibilизации эритроцитов целесообразно ограничить двумя часами.

На основе разработанных технологических параметров получения отдельных компонентов антигенных эритроцитарных диагностикумов были изготовлены экспериментальные серии эритроцитарных диагностикумов: эшерихиозные к сероварам E. coli 09:K99; E. coli 0138:K88; E.coli 0119; S.dublin; S.enteritidis; S.typhimurium; K.pneumoniae №23; K.pneumoniae №24; Pr.vulgaris; Pr.mirabilis. Контроль чувствительности и специфичности наработанных диагностических наборов проводили в

РНГА с гипериммунными сыворотками ко всем изученным штаммам. Результаты представлены в табл. 9.

9. Титры антител гипериммунных сывороток в РНГА с гомологичными и гетерологичными диагностикумами

Сыворотки	Диагностикумы									
	P.mirabilis	P.vulgaris	E.coli 09:K99	E.coli 0138:K88	E.coli 0119	S. dublin	S.typh	S.ent	K.pn. № 23	K.pn. № 24
Pr.mirabilis	20480	2560	80	40	80	80	40	40	40	40
Pr.vulgaris	2560	10240	20	20	160	20	20	20	160	80
S.dublin	<20	<20	20	20	20	20480	1280	5120	20	20
S.typhim.	<20	<20	<20	<20	<20	80	10240	5120	<20	<20
S.enter.	<20	20	<20	20	<20	5120	320	10240	<20	20
E.coli 09:K99	20	20	5120	40	40	20	40	40	<20	<20
E.coli 0138:K88	20	20	20	10240	20	20	40	20	<20	<20
E.coli 0119	<20	<20	20	20	10240	20	<20	20	<20	<20
K.pneum №23	80	80	20	40	40	40	40	20	5120	640
K.pneum №24	160	80	160	40	160	20	40	<20	2560	10240

Из данных таблицы видно, что титры антител к гомологичным штаммам *E.coli* составляли 1:5120 и выше, в то время как к гетерологичным антигенам были не выше 1:160, т.е. эшерихиозные диагностикумы являются чувствительными и высокоспецифичными препаратами. В то же время диагностикумы, сенсibilизированные двумя клебсиеллезными антигенами, давали перекрестные реакции в достаточно высоких титрах (до 1:2560–1:5120), что может быть следствием наличия перекрестов между нейтральными фракциями кислых полисахаридов обоих штаммов клебсиелл, присутствующих в гидрооксиламиновых препаратов антигенов. Значительные внутривидовые перекресты выявлены также между различными видами сальмонелл. Вероятно, это обусловлено тем, что согласно современной классификации все три вида сальмонелл, используемые нами в работе, принадлежат к одному виду сальмонелл: *Salmonella choleraesuis*. Существенные перекресты обнаружены также между сыворотками и антигенами *Pr. vulgaris* и *Pr. mirabilis*.

С целью дальнейшего изучения иммунологических свойств, полученные антигены и сыворотки были испытаны в реакции торможения непрямой гемагглютинации (РТНГА). Результаты представлены в табл. 10.

10. Минимальные нейтрализующие дозы антигенов эшерихиозных сывороток (мкг) в РТНГА с гипериммунными сыворотками

Антигены	Pr.vulg.	Pr.mir.	S. dublin	S.typh	S.enter	E.coli K99	E.coli K88	E.coli 0119	K.pn. № 23	K. pn. № 24
Сыв-ки										
Pr.vulgar.	$1:10^{-1}$	>50	>50	>50	>50	25	>50	>50	>50	>50
Pr.mirab.	>50	8×10^{-1}	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	50
S.dublin	>50	>50	2×10^{-1}	3,12	5×10^{-1}	>50	>50	12,5	1,6	1,6
S.typhimur.	>50	>50	>50	5×10^{-2}	12,5	>50	>50	>50	12,5	>50
S.enterit.	>50	>50	12,5	>50	1×10^{-1}	>50	>50	>50	12,5	25
E.coli K99	>50	>50	>50	>50	>50	8×10^{-1}	>50	>50	>50	>50
E.coli K88	>50	3,12	>50	>50	>50	>50	8×10^{-1}	>50	12,5	>50
E.coli 0119	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	8×10^{-1}	>50	>50
K.pneum. № 23	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	8×10^{-1}	3,12
K.pneum. № 24	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	>50	4×10^{-1}	1×10^{-1}

Полученные результаты в РТНГА свидетельствуют о высокой специфичности полученных эшерихиозных сывороток и антигенов. Антигены обоих штаммов протей также реагировали только с гомологичными сыворотками; в то время как минимальные нейтрализующие дозы (МНД) антигенов с гетерологичными сыворотками составляли 25-50 мкг и более, МНД протейных антигенов с гомологичными сыворотками составляла $1-8 \times 10^{-1}$.

Антигены обоих штаммов клебсиелл реагировали не только с гомологичными сыворотками, но и с сыворотками к другим штаммам *K.pneumoniae*, что подтверждает наличие общих антигенов, выделяемых при помощи солянокислого гидроксилamina. Результаты РТНГА с гипериммунными сыворотками к другим эшерихиозным укладаются в пределы ошибки метода (1-2 разведения). Аналогичные данные получены и при испытании сальмонеллезных сывороток и антигенов.

Обнаруженные перекресты в РНГА, РТНГА и результаты, полученные после адсорбции гипериммунных контрольных сывороток, обусловили необходимость объединения антигенов и изготовление поливалентных диагностикумов к бактериям родов *Proteus*, *Salmonella* и виду *Klebsiella pneumoniae* и моновалентных эшерихиозных диагностикумов к сероварам *E.coli* K99, *E.coli* K88, *E.coli* 0119.

Таким образом, на основании разработанных технологических параметров были наработаны экспериментальные серии моновалентных диагностикумов к трем сероварам эшерихий и поливалентные эритроцитарные сальмонеллезные, клебсиеллезные и протейные диагности-

кумы (всего 6 наборов).

Экспериментальные серии эритроцитарных диагностикумов к энтеробактериям были подвергнуты государственным испытаниям в Центральной научно-методической ветеринарной лаборатории и межобластных ветеринарных лабораториях (приказ Департамента ветеринарии МСХ РФ №30 от 20.11.2002г). По результатам испытаний все наборы были рекомендованы применения в ветеринарной практике для диагностики, иммунологического мониторинга и эпизоотологического прогнозирования ОКЗ у молодняка животных производственных испытаний

Производственные испытания

Наборы экспериментальных серии эритроцитарных диагностикумов к энтеробактериям были испытаны при изучении иммунного фона у животных (коров и свиней), иммунизированных вакциной ассоциированной инактивированной против колибактериоза, сальмонеллеза, клебсиеллеза и протейной инфекций молодняка сельскохозяйственных животных и пушных зверей (вакцина ОКЗ), неиммунизированных коров и свиней, а также 3-6- месячных телят.

Одновременно диагностикумы испытывали со стандартными гипериммунными сыворотками (листериозные, паратуберкулезные и бруцеллезные), используемыми в качестве контроля. Результаты исследования представлены в таб. 11.

11. Специфическая активность эритроцитарных диагностикумов в РНГА с различными сыворотками в сравнении с пуллорным эритроцитарным антигеном

Пробы сыворотки крови	Титры в РНГА с эритроцитарными диагностикумами						
	Proteus	Kl.pneum	E.coli 0119	E. coli 0138: K88	E. coli 09: K99	Salmonella	Пуллорный эритроцитарный
1	2	3	4	5	6	7	8
От вакцинированных коров	1:640	1:640	1:640	1:1280	1:1280	1:1280	1:160
От интактных коров	1:160	1:80	1:40	1:80	1:40	1:320	1:320
От телят 3-6 месяцев	1:10	1:40	1:10	1:40	1:10	1:10	1:20
От вакцинированных свиней	1:320	1:640	1:640	1:1280	1:640	1:1280	1:160
Диагностическая листеринная	<1:10	1:10	<1:10	1:10	1:10	<1:10	<1:10
Диагностическая бруцеллезная	1:80	1:80	1:40	1:160	1:20	1:10	1:40

1	2	3	4	5	6	7	8
Диагностическая паратуберкулезная	1:80	1:80	1:80	1:320	1:20	1:640	1:40
Контроль с эритроцитами барана	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.	отр.

Из данных таблицы видно, что эритроцитарные диагностикумы выявляют в сыворотках крови вакцинированных животных антитела в достаточно высоких титрах от 1:320 до 1:1280, в сыворотках крови неиммунизированных животных титры были на уровне 1:40–1:160, в сыворотках крови неиммунизированных телят титры антител выявлялись на уровне 1:20–1:40.

Контроль со стандартными сыворотками и эритроцитарными диагностикумами давал фоновый уровень антител, что свидетельствует о необходимости более тщательного подхода при подборе доноров для референс-сывороток.

Таким образом, разработанные антигенные эритроцитарные диагностикумы к трем сероварам *E. coli* 09:K99, *E. coli* 138 K88, *E. coli* 0119, *K. pneumoniae*, *Proteus*, *Salmonella* характеризуются высокой активностью и специфичностью и могут быть использованы для диагностики, эпизоотологического мониторинга и прогнозирования кишечных инфекций, вызываемых энтеробактериями.

Одним из основных моментов при профилактике острых кишечных инфекций является оценка эффективности применяемых вакцинных препаратов, а также оценка уровня защитного иммунного фона у животных, знание которых позволяет прогнозировать эпизоотологическую ситуацию в конкретном хозяйстве и своевременно проводить соответствующие ветеринарные мероприятия. В этой связи были проведены исследования по определению иммунного фона у глубоко-стельных коров, вакцинированных за 40–60 дней до отела вакциной ОКЗ и у новорожденных телят. Результаты исследования представлены в табл. 12.

12. Титры антител к энтеробактериям в сыворотках крови вакцинированных коров в динамике

Диагностикумы	Средние титры у коров			Титр АТ молозиве	Титр АТ у нов. телят (3день)
	фон	14 день	21 день		
1	2	3	4	5	6
<i>Proteus</i>	105,1±5,2	258,8±7,3	921,2±8,6	718,4±6,2	612,3±6,8
<i>E. coli</i> 09:K99	55,9±3,8	100,6±6,9	195,0±5,6	162,9±5,9	137,6±5,8
<i>E. coli</i> 0138:K88	152,9±6,1	649,4±8,3	1581,2±12,7	839,2±7,5	615,2±7,1

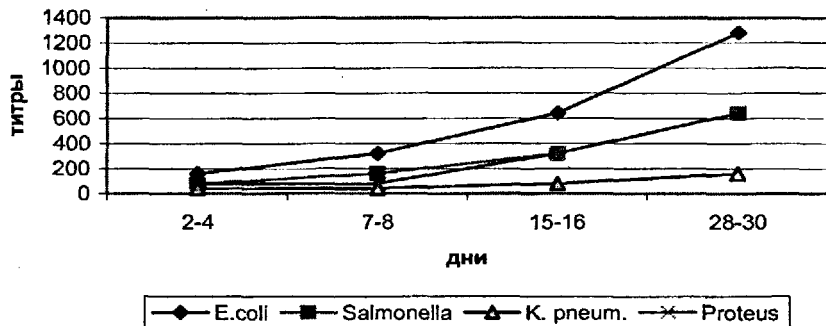
1	2	3	4	5	6
E.coli 0119	97,6±5,3	147,1±7,1	202,3±8,3	171,3±3,7	132,3±5,8
K.pneumoniae	155,3±6,5	917,6±7,9	1307,4±11,8	936,8±6,9	691,1±9,7
Salmonella	150,0±6,2	397,3±6,1	526,5±11,1	405,9±9,1	241,2±5,4

Представленные данные свидетельствуют о высокой иммуногенной активности вакцины ОКЗ. У всех вакцинированных животных установлено достоверное нарастание уровня антител ко всем штаммам, входящим в состав вакцины ($p \leq 0,05$). Уровень накопления антител в молозиве был также достаточно высоким (исследование молозива 1-го дня). У новорожденных телят, получавших молозиво от вакцинированных животных, уровень АТ был существенно ниже. Это свидетельствует о преимущественном участии энтеробактерий в местной защите путем адгезии на рецепторах эпителиальных клеток слизистой кишечника.

Таким образом, РНГА – диагностикумы позволяют проводить оценку иммунного фона у животных, что позволяет оценить эпизоотическое состояние и своевременно организовать проведение общих и специальных ветеринарных мероприятий.

Сравнительные исследования бактериологической диагностики ОКЗ и результатов серологических исследований (РНГА) по уровню титров антител показали возможность использования РНГА теста для ранней и ретроспективной диагностики кишечных инфекций.

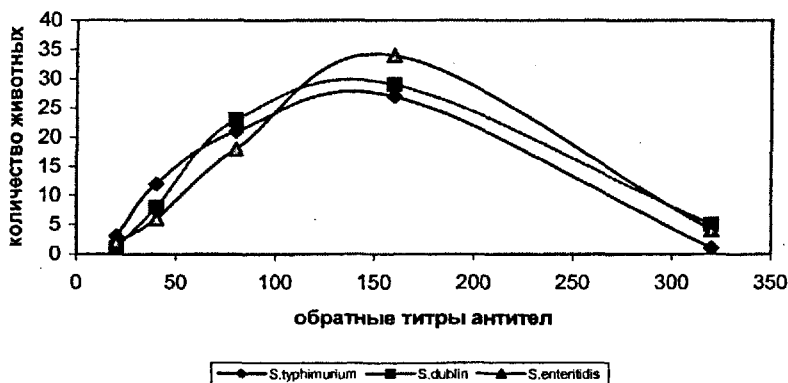
Исследования проводили на больных и здоровых телятах старше 5 – дневного возраста, полученных от невакцинированных коров. Сыворотки крови исследовали в сроки: 2 – 4; 7 – 8; 15 – 16 и 30 – 31 дни болезни (далее – 1, 2, 3 и 4 сроки взятия крови). В опыт отбирали телят в возрасте 5–12 дней. Результаты исследования представлены на рис. 8.



8. Титры антител в сыворотках крови от больных телят в динамике

Из данных графика видно, у телят, от которых были выделены патогенные культуры энтеробактерий (бактериологический диагноз считали положительным при выделении патогенных культур из фекалий не менее 10^6 микр. кл/г), титры антител к гомологичным штаммам существенно повышались (до 1:320 – 1:640) на 12–14 день.

При мониторинге иммунного фона у неиммунизированных коров (рис. 9) кривые распределения титров антител в сыворотках крови были на уровне нормальных величин (1:80–1:160), что подтверждает возможность широкого использования предложенных нами РНГА-тестов для проведения иммунологического мониторинга. Аналогичные результаты были получены и при испытании других диагностикумов.



9. Распределение титров антител к сальмонеллам у здоровых невакцинированных коров

При массовых исследованиях по выявлению защитного иммунного фона (стадного иммунитета) у животных, а также оценки эффективности иммунобиологических препаратов против ОКЗ определяют средний титр антител к антигенам. Для исследований необходимо брать пробы сывороток крови от не менее 10% животных данного хозяйства или региона.

В результате проведенных массовых исследований нами определены средние значения титров антител, характеризующие эпизоотологическое состояние в хозяйстве (регионе). Средний уровень титров антител у животных равный 1:160 и ниже, является фоновым, не обеспечивающим защиту от возникновения кишечных заболеваний инфекционной природы. Титр 1:320 и выше является достаточным для защиты от

инфекций, вызываемых энтеробактериями.

При постановке диагноза на острые кишечные инфекции по результатам исследований сывороток крови в РНГА – титры испытуемой сыворотки 1:320 и выше следует считать как положительный результат, свидетельствующий о роли энтеробактерий в заболеваемости животных, титр 1:160 как сомнительный результат, а титр 1:80 и менее оцениваются как отрицательный результат. В хозяйствах с массовыми респираторно-кишечными заболеваниями рекомендуется у животных с титром антител менее 1:320 исследовать парные пробы сывороток, полученные с интервалом 10-15 дней и при нарастании титра антител в 3 и более раз результаты оценивать как положительные на эшерихиоз, сальмонеллез, клебсиеллез или протейную инфекцию.

Усовершенствование средств специфической профилактики

В связи с изменением эпизоотической роли некоторых штаммов энтеробактерий в этиопатогенезе ОКЗ, а также установлением отдельных случаев осложнений у животных на фоне применения вакцины ассоциированной инактивированной против колибактериоза, сальмонеллеза, клебсиеллеза и протейной инфекции молодняка сельскохозяйственных животных и пушных зверей (вакцина ОКЗ) в хозяйствах неблагополучных по острым кишечным инфекциям, нами были проведены исследования по изучению причины реактогенности вакцины и методы их устранения.

Исследования были направлены на изучение как самой вакцины, так и всех компонентов, входящих в ее состав, путем дефракционирования на составляющие. Каждую полученную фракцию испытывали на лабораторных животных, глубокостельных коровах и телятах.

Эпизоотологическими данными и анализом антигенного состава вакцины ОКЗ установлено изменение структуры эпизоотологически значимых штаммов в этиопатогенезе кишечных заболеваний. Из числа 9 штаммов, входящих в состав вакцины, установлено, что сальмонеллы и клебсиеллы не в полной мере обеспечивают защиту от патогенных эпизоотических изолятов, выделенных от больных животных. С учетом данных эпизоотического мониторинга нами были наработаны экспериментальные серии вакцины с заменой всех трех штаммов сальмонелл и одного штамма клебсиелл на новые штаммы. В состав вакцины были введены штаммы: *S. dublin* №19, *S. enteritidis* №22, *S. typhimurium* №14 и штамм *K. pneumoniae* №24, играющие существенную роль в патологии молодняка животных, обладающие более выраженными иммуноген-

ными свойствами и чаще выделяемые во всех обследованных нами регионах РФ.

Также были проведены исследования по оптимизации антигенной нагрузки на вакцинированных животных, не снижая протективной активности вакцины. Установлено, что при введении в состав вакцины новых штаммов дозы 5 мл для коров; 1,0 мл для телят с общей концентрацией 13,5 млрд. вместо ранее рекомендуемых доз 7 мл и 1,5 мл с концентрацией 17 млрд микробных клеток в 1мл, обеспечивают выработку иммунных антител, достаточных для защиты от возникновения заболевания.

Результаты сравнительных экспериментальных исследований вакцин ОКЗ представлены в табл. 13.

13. Результаты экспериментальных исследований усовершенствованной вакцины ОКЗ на лабораторных моделях (белые мыши)

Испытуемые вакцины	Содержа-ние млрд. мк. кл./мл в вакцине	Доза вак-цины	Заражение вирулентными культурами E.c+S.+Kl+ Pt через 14 дней					Средний титр антител
			голов	выжило		пало		
				абс.	%	абс.	%	
Вакцина ОКЗ (ТУ-1988)	17	0,7 мл	20	19	95	1	5	800
	13,5	0,7 мл	20	17	85	3	15	400
Контроль	плацебо	0,7 мл	20	1	5	19	95	-
Вакцина ОКЗ (ТУ-1999)	17	0,5 мл	20	20	100	-	-	800
	13,5	0,5 мл	20	19	90	1	5	800
Контроль	плацебо	0,5 мл	20	0	-	20	100	-

Полученные результаты свидетельствуют, что усовершенствованная вакцина с новым антигенным набором обладала более высокой протективной активностью при инфицировании контрольными вирулентными культурами. Установлено, что после контрольного заражения смесью вирулентных штаммов энтеробактерий в дозе 250 млн. мк кл. (в равных соотношениях каждого штамма) в объеме 0,25 мл внутрибрюшинно протективная активность усовершенствованной вакцины была более высокой, обеспечивая 90-100%-ную сохранность среди вакцинированных животных. Проведенные иммунологические исследования поствакцинального иммунитета также свидетельствовали о достаточно высоком уровне титров антител ко всем антигенам, входящим в состав вакцины ОКЗ (на 20-й день после вакцинации).

Сравнительные испытания вакцины ОКЗ проводили и в производственных условиях хозяйств Московской области неблагополучных по острым кишечным заболеваниям. Установлено, что усовершенствованная вакцина не вызывала побочных реакций (была безвредна).

В то же время вакцина ОКЗ (ТУ-9384-022-00008064-98) при иммунизации в неблагополучных хозяйствах у отдельных животных (1-3%) вызывала реактогенность с симптомами аллергии (замедленного типа). У животных после введения вакцины через 30-40 минут наблюдается учащенное дыхание, судороги задних конечностей, слюнотечение и т.д.

Установлено, что реактогенность на вакцину ОКЗ связана с сенсibilизацией животных продуктами жизнедеятельности, а также на антигенные компоненты бактериальных клеток.

Для более глубокого изучения нами были проведены исследования на наличие в вакцине токсинов и энтеротоксинов (типов А и В, термолабильные и термостабильные) кишечной палочки, сальмонелл, протей.

Для выявления токсической субстанции вакцина была дефракционирована на фракции по молекулярной массе с использованием фильтра РМ-10 Амикон. Вакцину центрифугировали для отделения фракции содержащей гидроокись алюминия и сорбированные на ней антигенные субстанции и была обозначена как фракция №3. Осветленную фракцию, не содержащую гидроокись алюминия, пропускали через миллипоровский фильтр РМ-10 фирмы Амикон.

В результате нами были получены две фракции: низкомолекулярная с молекулярной массой меньше 10 000 дальтон, она была обозначена как фракция №1, и высокомолекулярная фракция, которая не проходила через фильтр РМ-10 Амикон и была обозначена как фракция № 2. Все три полученные фракции вводили телятам 1-1,5 месячного возраста в дозах, рекомендуемых для вакцины ОКЗ. Ни одна из полученных фракций не обладала токсической активностью. Только при введении телятам фракции № 2 отмечали болезненную реакцию на месте введения и учащение дыхания. Указанные симптомы исчезали через 30-40 минут без видимых осложнений. Таким образом, низкомолекулярная фракция вакцины не обладает токсичностью.

Наличие термолабильного энтеротоксина энтеробактерий в полученных фракциях вакцины определяли на лигированной кишке кролика по методу De S.N. Результаты исследования представлены в табл. 14.

14. Исследование токсичности вакцины ОКЗ различными биологическими и иммунологическими методами

№ пп	Исследуемый энтеротоксин	Биологический метод	Реакция непрямо́й гемагглютинации (РНГА)	Иммуноферментный анализ (ИФА)
1	Стафилококковый энтеротоксин типа А	Не определяли	Не обнаружен	Не обнаружен
2	Стафилококковый энтеротоксин типа В	Не определяли	Не обнаружен	Не обнаружен
3	Термолабильный энтеротоксин кишечной палочки	Не обнаружен	Не обнаружен	Не обнаружен
4	Термолабильный энтеротоксин сальмонелл	Не обнаружен	Не обнаружен	Не обнаружен
5	Термолабильный энтеротоксин <i>P.vulgaris</i>	Не обнаружен	Не обнаружен	Не обнаружен

Из данных таблицы видно, что вакцина не содержит термолабильных энтеротоксинов.

15. Биологическая активность вакцины ОКЗ на легированной кишке кролика

№ п/п	Исследуемые препараты	Кол-во вводимого препарата	Длина кишки в см	Объем жидкости в мл	Индекс дилатации (отношение объема к длине кишки)
1	Культуральный фильтрат штамма <i>Bacillus cereus</i> 1312 (контроль)	2,0	7,0	10,0	1,4
2	Вакцина ОКЗ нативная	2,0	10,1	1,0	0,09
3	Вакцина ОКЗ 1 фракция РМ-10 Амикон	2,5	10,3	1,0	0,097
4	Вакцина ОКЗ 2 фракция РМ-10 Амикон	2,5	10,2	1Д	0,107
5	Вакцина ОКЗ 3 фракция РМ-10 Амикон	2,5	10,2	0,9	0,088

Таким образом, нами установлено, что вакцина, ассоциированная инактивированная против колибактериоза, сальмонеллеза, клебсиллеза и протейной инфекции молодняка сельскохозяйственных животных и пушных зверей (по ТУ 9384-022-00008064-98 и ТУ 9384-047-00008064-99), не содержит термолабильного холероподобного энтеротоксина *E. coli* сальмонелл и термолабильного энтеротоксина *P.vulgaris* и термостабильных энтеротоксинов энтеробактерий.

Вероятно, аллергическая реакция, проявляемая у отдельных животных на введение вакцины ОКЗ, связана сенсibilизацией животных к аналогичным антигенам или эндотоксинам циркулирующих штаммов в хозяйствах, на суперантигены входящие в состав вакцины.

Введение в состав вакцины ОКЗ новых штаммов, а также снижение дозы вакцины, позволили существенно снизить токсическую реактивность вакцины до 0,5-1,0%, сохраняя высокую ее протективную активность. Результаты представлены в таб. 16.

16. Результаты изучения иммуногенных свойств вакцин ОКЗ

№ п/п	Вакцина	Группа животных	Кол-во голов	Поствакцинальная реакция		Средний титр	Заболело ОКЗ*		Эффективность, %
				гол	%		гол	%	
1	ОКЗ-1	Коровы	250	3	1,2	378±12,7	0	0	100
2		Телята**	600	12	2,0	315±18,6	75	12,5	87,5
3		Свиноматки	350	0	0	286±24,9	0	0	100
4		Поросята***	2500	0	0	420±56,2	200	8,0	92,0
5	ОКЗ-2	Коровы	400	0	0	358±30,3	0	0	100
6		Телята	1500	0	0	320±45,1	121	8,1	91,9
7		Свиноматки	270	0	0	301±26,2	0	0	100
8		Поросята	3000	0	0	480±60,4	250	8,3	91,7

Примечание. *Заболевшими считали наличие диарейного синдрома с актом дефекации жидкими калом не менее 4 раз в течение светового дня.

**Возраст телят – 2,5 мес.

*** Возраст поросят – 4 мес.

Таким образом, протективная и иммуногенная активности усовершенствованной вакцины ОКЗ существенно не отличаются от вакцины ОКЗ, изготовленной по ТУ 9384-022-00008064-98, но за счет снижения антигенной нагрузки на организм у вакцинированных животных не отмечается каких-либо побочных реакций. Экономическая эффективность производства повышается на 20%.

ВЫВОДЫ

1. Установлены клинко-эпизоотологические параметры и этиопатогенетические факторы возникновения и распространения ОКЗ. В структуре болезней молодняка раннего возраста удельный вес ОКЗ составляет более 90%. В структуре экономических потерь (падеж, вынужденный убой, санитарный брак, снижение продуктивности и генетического потенциала, недополученной продукции и др. ущерба) болезни раннего возраста составляют около 70% от всего наносимого ущерба.

2. С использованием современных методов идентификации и изучения иммунобиологических свойств определены и охарактеризованы основные микроорганизмы семейства *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Salmonella*, *Klebsiella pneumoniae* и *Proteus*), являющиеся основными возбудителями острых кишечных заболеваний телят раннего постнатального развития.

3. Отработанные методы подбора и селекции штаммов энтеробактерий позволили установить наиболее эпизоотологически значимые для биотехнологических целей штаммы *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Klebsiella pneumoniae* и *Proteus* для разработки диагностических и профилактических препаратов против кишечных инфекций у телят.

4. Усовершенствованный метод дезинтеграции бактериальных клеток энтеробактерий солянокислым гидроксиламином является наиболее эффективным (выход чистого антигена в 3-3,5 раза выше по сравнению с другими методами) для получения растворимых антигенов с наилучшим соотношением липополисахаридных и белковых компонентов для разработки диагностических препаратов.

5. Наиболее оптимальной сенсибилизирующей дозой при получении эритроцитарных диагностикумов является нагрузка 1,0 мг антигена на 10 мл 2,5% - ной взвеси формализированных эритроцитов при времени сенсибилизации в течение 2-х часов.

6. Разработанные схемы гипериммунизации кроликов позволяют получать специфические референс-сыворотки активностью 1:5120 – 1:20480.

7. В реакции иммунодиффузии со специфическими референс-сыворотками и с коммерческими сыворотками к О- и Н – антигенам энтеробактерий установлено, что полученные усовершенствованным методом антигены эшерихий, сальмонеллы и протей содержат как соматический О-антиген (липополисахарид), так и жгутиковый Н-антиген (белок), а клебсиеллезный антиген содержит капсульный кислый полисахарид (К-антиген) и соматический О-антиген.

8. Эритроцитарные диагностикумы и референс-сыворотки сохраняют активность не менее 2-х лет со дня изготовления, при температуре хранения 2-4°C.

9. Разработанные антигенные диагностические РНГА тест-системы могут быть использованы для иммунологического мониторинга животных и эпизоотологического прогноза ОКЗ, экспресс и ретроспективной диагностики острых кишечных инфекций, а также оценки эффективности иммунобиологических препаратов против кишечных инфекций.

10. При диагностике ОКЗ положительным результатом в РНГА следует считать титр испытуемой сыворотки 1:320 и выше (у невакцинированных животных). При титре 1:160 необходимо исследование парных проб. Титры 1:80 и менее оцениваются как отрицательные реакции.

11. При оценке иммунного фона средний уровень титра антител равный 1:160 и выше свидетельствует о достаточном уровне иммунитета для обеспечения защиты от *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Klebsiella pneumoniae* и *Proteus*, а при титре антител ниже 1:160 – о недостаточности механизме специфической защиты используемых вакцинных препаратов и необходимости проведения специальных и ветеринарно-санитарных мероприятий против ОКЗ.

12. В вакцине ОКЗ не содержатся остаточные количества бактериальных токсинов энтеробактерий (термостабильных и термолабильных). Реакция у отдельных животных в неблагополучных по ОКЗ хозяйствах при введении вакцины ОКЗ индуцирована антигенной нагрузкой на фоне сенсибилизации и усилением токсичности эндотоксинов организма суперантигенами вакцины.

13. Введение в состав вакцины ОКЗ новых штаммов, а также снижение дозы вакцины позволили в два и более раз (до 0,5-1%) снизить все побочные эффекты вакцины ОКЗ, при некотором повышении ее протективной и иммуногенной активности.

14. Использование усовершенствованной вакцины ОКЗ снижает производственные затраты на 20%.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ НАУЧНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты научных исследований внедрены в практику ветеринарной медицины. В установленном порядке на эритроцитарные диагностикумы и вакцину утверждены Департаментом Ветеринарии МСХ РФ нормативные документы, регламентирующие их производство и применение.

1. ТУ 938830-023-46392258-04 «Набор диагностический эритроцитарный эшерихиозный (для РНГА)». Наставление по применению, регистрационный № 13-5-02/0938, 02.02.04 г.

2. ТУ 938830-025-46392258-04 «Набор диагностический эритроцитарный сальмонеллезный (для РНГА)». Наставление по применению, регистрационный № 13-5-02/0905, 02.02.04 г.

3. ТУ 938830-024-46392258-04 Набор диагностический эритроцитарный клебсиеллезный (для РНГА)». Наставление по применению, регистрационный № 13-5-02/0903, 02.02.04 г;

4. ТУ 938830-026-46392258-04 «Набор диагностический эритроцитарный протейный (для РНГА)». Наставление по применению, регистрационный № 15-05-02/0904, 02.02.04 г.

5. ТУ 9384-047-00008064-99 «Вакцина ассоциированная инактивированная против колибактериоза, сальмонеллеза, клебсиллеза и протейной инфекции молодняка сельскохозяйственных животных и пушных зверей (вакцина ОКЗ)»

6. Результаты исследований по разработке антигенных эритроцитарных диагностикумов используются в учебном процессе при изучении курсов «Болезни молодняка», «Биотехнология», «Иммунологии» и «Эпизоотология», включены в учебные программы по курсу Иммунология для студентов сельскохозяйственных вузов.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ НАУЧНЫХ ВЫВОДОВ

1. Ветеринарным врачам хозяйств и ветеринарным диагностическим лабораториям необходимо проводить постоянный (не реже 1-го раза в квартал) иммунологический мониторинг для обеспечения эпизоотологического надзора и прогнозирования ОКЗ у молодняка животных.

2. При проведении диагностических исследований руководствоваться методическими рекомендациями: «Методические рекомендации по диагностике и иммунологическому мониторингу эшерихиозов у сельскохозяйственных животных»; «Методические рекомендации по диагностике и иммунологическому мониторингу сальмонеллезов у сельскохозяйственных животных»; «Методические рекомендации по диагностике и иммунологическому мониторингу клебсиеллезов у сельскохозяйственных животных»; «Методические рекомендации по диагностике и иммунологическому мониторингу протейной инфекции у сельскохозяйственных животных».

3. Разработанная нормативная документация на производство, контроль и применению наборов диагностических эритроцитарных к энтеробактериям (для РНГА) рекомендуется для использования на предприятиях биологической промышленности и ветеринарных лабораториях.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Ставцева Л.Я. Биологические препараты для профилактики диарей телят, вызванных условно-патогенными микроорганизмами. /Л.Я. Ставцева, Т.Н. Грязнева, Л.С. Блажева, З.М. Бедосва //Межвуз. сб. науч.

тр. «Современные аспекты профилактики инфекционных болезней молодняка». Кишинев. – 1989. – С. 27-31.

2. Бедоева З.М. Индикация эшерихий с адгезивным антигеном K99 в фекальных пробах телят, больных кишечной формой колибактериоза /З.М. Бедоева, В.М. Подкопаев //Методические рекомендации. - М.: МВА. - 1989.- 11 с.

3. Бедоева З.М. Идентификация энтеротоксигенных эшерихий с адгезивным K99 в РНГА и непрямом варианте РИФ /З.М. Бедоева //Ветеринария.- РЖ. – 1990. – № 2. – С. 28-30.

4. Воронин Е.С. Профилактика и лечение диарей телят с использованием неспецифических препаратов и бактериофагов /Е.С. Воронин, Д.А. Девришов, Л.Я. Ставцева, В.П. Шишков, З.М. Бедоева, Т.Н. Грязнева //Доклады ВАСХНИЛ. – 1990. – № 11. – С. 47-50.

5. Воронин Е.С. Экспериментальное воспроизведение диарей у новорожденных /Е.С. Воронин, Д.А. Девришов, Л.Я. Ставцева, З.М. Бедоева //Вестник с.-х. науки. – 1990. – № 10. – С. 5-9.

6. Воронин Е.С. Острые кишечные инфекции у телят в экспериментальных условиях /Воронин Е.С., Девришов Д.А., Л.Я. Ставцева, З.М. Бедоева //Межвуз. сб. науч. тр. МВА «Новое в диагностике, лечении и профилактике болезней молодняка с.-х. животных». – М.: МВА. – 1991. – С. 67-69.

7. Девришов Д.А. Рекицена – РД профилактический препарат против желудочно-кишечных заболеваний поросят / Д.А. Девришов, Г.Н.Печникова, З.М.Бедоева, А.А. Бурдов, Т.И.Мельницкая // Сб. науч. тр. МВА

8. Девришов Д.А. Применения Рекицена - РД для профилактики и лечения диарей телят и поросят /Д.А. Девришов, М.А. Исмаилов, Г.Н. Печникова, Т.П. Жарова, З.М. Бедоева, Е.С. Воронин //Межвуз. сб. науч. тр. МВА «Новое в диагностике, лечении и профилактике болезней животных». – М.: МВА. – 1996.- С. 23-27.

9. Девришов Д.А. Биоспорин как терапевтическое средство против желудочно-кишечных заболеваний поросят /Д.А. Девришов, Г.Н. Печникова, З.М. Бедоева, А.А. Бурдов //Межвуз. Сб. науч. тр. МВА «Актуальные вопросы инфекционных и инвазионных болезней животных». – М.: МВА. – 1995.- С. 81-84.

10. Девришов Д.А. Испытания фторазола при лечении диареи сельскохозяйственных животных /Д.А. Девришов, Е.С. Воронин, З.М. Бедоева, Г.Н. Печникова, Т.П. Жарова //Тез. докл. Всерос. науч. конф. «Инфекционные болезни с.-х. животных». – М.: МВА. – 1996. - С. 22-23.

11. Девришов Д.А. Профилактическое и терапевтическое действия биоспорина-В при диареях телят и поросят /Д.А. Девришов, М.А. Исмаилов, З.М. Бедоева, Г.Н. Печникова, Т.П. Жарова //Сб. науч. тр. МГАВМиБ им. К.И. Скрябина. В кн.: Вопросы физико-химической биологии. – М.: МВА. – 1997.- С. 19-21.

✓ 12. Воронин Е.С. Экспериментальное испытание ассоциированной инактивированной вакцины ОКЗ /Е.С. Воронин, Д.А. Девришов, З.М. Бедоева, В.В. Шведов //Ветеринария. – 1998. – №12 – С. 12 – 14.

У 13. Девришов Д.А. Протективная активность вакцины ОКЗ /Д.А. Девришов, Е.С. Воронин, З.М. Бедоева //Ветеринария. – 1999. – № 4. – С. 14-17.

14. Девришов Д.А. Экспериментальные данные по получению гипериммунных сывороток для диагностики инфекционных, болезней вызываемых энтеробактериями /Д.А. Девришов, З.М. Бедоева, Е.В. Зайцева //Сб. матер. науч. конф. «Биотехнология на рубеже веков: проблемы и перспективы». – Киров: НИИМ МО РФ.- 2001. – С. 17 – 18.

15. Девришов Д.А. Изучение динамики титров антител у крупного рогатого скота при колибактериозе /Д.А. Девришов, В.И. Каиси, З.М. Бедоева, Е.В. Зайцева // Сб. докл. междунар. конф. молодых ученых «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов». – Щелково: НИТИБП. –2001. – С. 132–135

16. Девришов Д.А. Экспериментальные данные, полученные при испытании диагностических систем к родам сальмонелл /Д.А. Девришов, В.Х. Каиси, З.М. Бедоева, Е.В. Зайцева //Сб. докл. междунар. конф. молодых ученых «Научные основы производства ветеринарных биологических препаратов». – Щелково: НИТИБП. – 2001. – С. 135 – 139.

17. Девришов Д.А. Сравнительная оценка серологических тестов на иммунизированных животных /Д.А. Девришов, В.И. Каиси, З.М. Бедоева, Е.В. Зайцева //Ветеринарная медицина. – 2002, – №1 – С. 7–8

18. Девришов Д.А. Разработка эритроцитарных диагностикумов для определения антител к бактериям рода *Proteus*: выбор метода извлечения антигенов и получения гипериммунных контрольных сывороток /Д.А. Девришов, З.М. Бедоева, Е.В. Зайцева //Ветеринарная медицина. – 2002. – № 2. – С. 18 – 20.

✓ 19. Воронин Е.С. Штамм бактерий *Proteus vulgaris* № 25, используемый для изготовления иммунных препаратов /Воронин Е.С., Девришов Д.А., Бедоева З.М., Е.В. Пименов, С.М. Кузнецов, В.В. Шведов //Описание изобретения к патенту РФ № 2218395. – 2003.

✓ 20. Воронин Е.С. Штамм бактерий *Proteus mirabilis* № 26, используемый для изготовления иммунных препаратов /Е.С. Воронин, Д.А.

Девришов, З.М. Бедоева, Е.В. Пименов, С.М. Кузнецов, В.В. Шведов //Описание изобретения к патенту РФ № 2217494. - 2003.

- ✓ 21. Воронин Е.С. Штамм бактерий *Salmonella dublin* № 19, используемый для изготовления вакцин и диагностических препаратов /Е.С. Воронин, Д.А. Девришов, З.М. Бедоева, Е.В. Пименов, С.М. Кузнецов, В.В. Шведов //Описание изобретения к патенту РФ № 2218176. – 2003.
- ✓ 22. Воронин Е.С. Штамм бактерий *Salmonella enteritidis* № 22, используемый для изготовления вакцин и диагностических препаратов /Е.С. Воронин, Д.А. Девришов, З.М. Бедоева, Е.В. Пименов, С.М. Кузнецов, В.В. Шведов //Описание изобретения к патенту РФ № 2218177. – 2003.
- ✓ 23. Воронин Е.С. Штамм бактерий *Salmonella typhimurium* № 14, используемый для изготовления вакцин и диагностических препаратов /Е.С. Воронин, Д.А. Девришов, З.М. Бедоева, Е.В. Пименов, С.М. Кузнецов, В.В. Шведов //Описание изобретения к патенту РФ № 2216350. – 2003.
- ✓ 24. Воронин Е.С. Штамм бактерий *E.coli* 09:K99 № 28, используемый для изготовления вакцин и диагностических препаратов /Е.С. Воронин, Д.А. Девришов, З.М. Бедоева, Е.В. Пименов, С.М. Кузнецов, В.В. Шведов //Описание изобретения к патенту РФ № 2222591. – 2004.
- ✓ 25. Воронин Е.С. Штамм бактерий *E.coli* 0138:K88 № 27, используемый для изготовления вакцин и диагностических препаратов /Е.С. Воронин, Д.А. Девришов, З.М. Бедоева, Е.В. Пименов, С.М. Кузнецов, В.В. Шведов //Описание изобретения к патенту РФ № 2222592. – 2004.
- ✓ 26. Воронин Е.С. Штамм бактерий *Klebsiella pneumoniae*, депонированный в ВГНКИ под № 23 МГАВМиБ-Деп, для производства вакцины против клебсиеллеза молодняка сельскохозяйственных животных /Е.С. Воронин, Д.А. Девришов, З.М. Бедоева, Е.В. Пименов, С.М. Кузнецов, В.В. Шведов //Описание изобретения к патенту РФ № 2221864. – 2004.
- ✓ 27. Воронин Е.С. *Klebsiella pneumoniae*, депонированный в ВГНКИ под № 24 МГАВМиБ-Деп, для производства вакцины против клебсиеллеза молодняка сельскохозяйственных животных /Е.С. Воронин, Д.А. Девришов, З.М. Бедоева, Е.В. Пименов, С.М. Кузнецов, В.В. Шведов //Описание изобретения к патенту РФ № 2224019. – 2004.
- ✓ 28. Бедоева З.М. Разработка средств иммунологического мониторинга и прогнозирования острых кишечных инфекций бактериальной этиологии: I. Получение эшерихиозных и сальмонеллезных диагностических антигенов /З.М. Бедоева, Е.С. Воронин, Д.А. Девришов, Е.В. Зайцева //Вестник РАСХН. – 2006. – № 3. – С. 63 – 65.

✓ 29. Бедоева З.М. Роль *Klebsiella pneumoniae* и бактерий рода *Proteus* в кишечной патологии животных и особенности получения чистых антигенов для диагностических целей /З.М. Бедоева, Е.С. Воронин, Д.А. Девришов, Е.В. Зайцева //Вестник РАСХН. – 2006. – № 3. – С. 65 – 67.

✓ 30. Бедоева З.М. Получение контрольных гипериммунных сывороток, для диагностических тест-систем энтеробактерий /З.М. Бедоева, Е.С. Воронин, Д.А. Девришов, Е.В. Зайцева //Вестник РАСХН. – 2006. – № 3. – С. 67 – 69.

✓ 31. Бедоева З.М. Оптимизация параметров сенсibilизации эритроцитов специфическими антигенами /З.М. Бедоева, Е.С. Воронин, Д.А. Девришов, Е.В. Зайцева //Вестник РАСХН. – 2006. – № 3. – С. 69 – 71.

✓ 32. Бедоева З.М. Результаты производственных испытаний антигенных эритроцитарных диагностикумов энтеробактерий /З.М. Бедоева, Е.С. Воронин, Д.А. Девришов, Е.В. Зайцева // Вестник РАСХН. - 2006. - № 3. - С. 72 – 73.

33. Воронин Е.С. Диагностика и иммунологический мониторинг протейной инфекции у сельскохозяйственных животных /Е.С. Воронин, Д.А. Девришов, З.М. Бедоева, Е.В.Зайцева // Методические рекомендации.- М.: РАСХН. - 2006. – 11 с.

34. Воронин Е.С. Диагностика и иммунологический мониторинг эшерихиозов у сельскохозяйственных животных /Е.С. Воронин, Д.А. Девришов, З.М. Бедоева, Е.В.Зайцева // Методические рекомендации.- М.: РАСХН. - 2006. – 12 с.

35. Воронин Е.С. Диагностика и иммунологический мониторинг сальмонеллез у сельскохозяйственных животных /Е.С. Воронин, Д.А. Девришов, З.М. Бедоева, Е.В. Зайцева //Методические рекомендации.- М.: РАСХН. - 2006. – 11 с.

36. Воронин Е.С. Диагностика и иммунологический мониторинг клебсиеллезной инфекции у сельскохозяйственных животных /Е.С. Воронин, Д.А. Девришов, З.М. Бедоева, Е.В. Зайцева //Методические рекомендации.- М.: РАСХН. - 2006. – 11 с.

Отпечатано в ООО «Компания Спутник+»

ПД № 1-00007 от 25.09.2000 г.

Подписано в печать 10.10.06

Тираж 100 экз. Усл. п.л. 2,69

Печать авторефератов (095) 730-47-74, 778-45-60

