

На правах рукописи

ЧУЛКОВ НИКОЛАЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

**Совершенствование специфической профилактики
колибактериоза телят с использованием бивалентных
вакцины и гипериммунной сыворотки, изготовленных
на основе аттенуированных адгезивных штаммов E.coli**

16.00.03.- ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией и
иммунология



Автореферат
диссертации на соискание ученой
степени кандидата ветеринарных наук

Новосибирск - 2004

Работа выполнена в ГНУ Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО РАСХН

- Научный руководитель:** доктор ветеринарных наук,
старший научный сотрудник
Прудников Степан Ильич
- Научный консультант:** доктор ветеринарных наук, профессор
Бияшев Кадыр Бияшевич
- Официальные оппоненты:** доктор ветеринарных наук, профессор
Димов Сергей Константинович

кандидат ветеринарных наук
Тимофеев Николай Иванович

Ведущая организация: Институт ветеринарной медицины Алтайского государственного аграрного университета

Защита диссертации состоится «12» мая в 12⁰⁰ ч. на заседании диссертационного совета Д.006.045.01. в Государственном научном учреждении Институт экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО РАСХН по адресу:

630501, Новосибирская обл., Новосибирский р-н, п. Краснообск,
ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН.

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНСХБ СО РАСХН

Автореферат разослан «9» апреля 2004г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



СИ. Логинов

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1. Актуальность проблемы

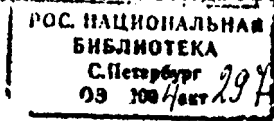
Одной из важнейших задач животноводства является производство высококачественных безопасных в экологическом и санитарном отношении продуктов питания - молока и мяса. Однако на протяжении длительного времени животноводство несет большие потери, обусловленные желудочно-кишечными болезнями новорожденных телят, основным этиологическим фактором которых является условно-патогенная микрофлора и, прежде всего, энтеротоксигенные *E. coli*. Заболеваемость телят желудочно-кишечными болезнями в первые дни жизни на животноводческих фермах и комплексах России достигает 30- 80% (Цион Р. А.; Сидоров М. А. с соавт., 1974,1977,1979 ,1981; Фельдман Й.И. с соавт., 1976 ,1979, 1982 ,1985; Полякова О. А., 1976; Езерская Н. В., 1977; Тришкина ЕЛ\ с соавт. , 1977; Воронин В. Е., 1981; Фоменко Н. В. и др., 1981; Аликаев В. А., 1984; Зароза В. Г., 1991; Соколова Н. А. с соавт.,1991; Шкиль Н. А., 2000; Иноземцев В. П. с соавт., 2001).

Колибактериоз крупного рогатого скота широко распространен во всех развитых странах, причем летальность, даже при оптимальных условиях содержания может достигать 40-75%. Падеж телят в мολозивный период составляет 20 - 50% от общей гибели за период выращивания (Коляков Я. Е., Гительсон С. С, Коврук Л. С, 1970, 1973; Титов Г. И., 1972; Фельдман И. И., Чекишев В. М.;, 1978; Курашвили Т. К.,1987; Иксанов Р. Г.,2001; Терехов В. И., 2002; Моетман А.,1982; Morris J. А., 1985; OkermanL.,1987).

В Западной Сибири в этиологии желудочно-кишечных заболеваний новорожденных телят по массовости поражения, тяжести проявления и гибели животных, одно из ведущих мест занимают энтеропатогенные *E.coli* (Фельдман И. И. с соавт.,1985 ,1992; Самаркин В. А., Бурталкин Б. В.,1985; Шкиль Н. А., Шадрина М. Н., 1997; Заздравных М. И.,2001; Петрова М. И., Козьякина Л. В., 2001; Кашин А. С. с соавт., 2003)

Представление о патогенезе колибактериоза и патогенных свойствах его возбудителя за последние десятилетия существенно изменилось. Если раньше главным фактором в развитии болезни считалось действие продуктов распада возбудителя (энтеротоксина), то в настоящее время признано воздействие также факторов патогенности - энтеротоксикогенности и адгезивности.

Лечение колибактериоза телят сводится, в основном, к использованию гипериммунных сывороток, антибиотиков, сульфаниламидных и нитрофурановых препаратов, энтеросорбентов. Однако это не всегда эффектив-



но, т.к. антибиотики и др. химиопрепараты снижают резистентность организма животных, вызывают у телят дисбактериозы, нарушение обмена веществ, являются причиной аллергических состояний у людей.

Исследования, выполненные за рубежом и в нашей стране показывают, что наиболее перспективными для профилактики и терапии колибактериоза животных являются вакцины из адгезивных штаммов эшерихий и энтеротоксинов и сыворотка, приготовленная на их основе (М. А. Сидоров, 1981; А. Н. Головкин, Г. А. Гнатенко, Г. А. Красников, 1988; Н. А. Соколова с соавт., 1989; Ю. А. Малахов с соавт., 1993).

В связи с этим, разработка вакцин и гипериммунных сывороток из адгезивных штаммов эшерихий является актуальной задачей в специфической профилактике колибактериоза крупного рогатого скота.

1.2. Цель работы

Изучить эффективность бивалентных вакцин и гипериммунной сыворотки против колибактериоза крупного скота, изготовленных в экспериментальных и производственных условиях, на основе аттенуированных адгезивных штаммов *E.coli*.

1.3. Задача исследований:

1. Изучить распространённость адгезивных штаммов *E.coli* у крупного рогатого скота в хозяйствах Алтайского края;

2. Изучить адгезивные, иммуногенные и протективные свойства аттенуированных штаммов *E.coli* в экспериментах и контролируемых опытах;

3. Выяснить механизмы формирования поствакцинального иммунитета, испытать профилактическую эффективность живой аттенуированной вакцины из адгезивных штаммов *E.coli* и гипериммунной сыворотки, полученной на их основе, против колибактериоза крупного рогатого скота в производственных условиях.

1.4. Научная новизна

Установлено распространение у крупного рогатого скота адгезивных штаммов эшерихий в неблагополучных по колибактериозу хозяйствах Алтайского края. Определены иммунологические изменения в организме стельных коров и выраженность колюстрального иммунитета у телят при иммунизации против колибактериоза живой бивалентной вакциной из аттенуированных адгезивных (K99 и F41) штаммов *E. coli*. Впервые установлены показатели формирования поствакцинального иммунитета у животных, привитых аттенуированными адгезивными штаммами *E.coli*.

Проведён подбор штаммов E.coli по биологическим, антигенным свойствам и наиболее иммуногенные штаммы предложены для гипериммунизации животных-продуцентов при изготовлении бивалентной гипериммунной сыворотки. Разработана схема гипериммунизации продуцентов аттенуированными штаммами эшерихий, способ приготовления и применения гипериммунной сыворотки для профилактики и терапии колибактериоза телят.

1.5. Практическая и теоретическая значимость

Эпизоотологически и иммунологически обоснованы рациональные схемы иммунизации стельных коров и нетелей живой бивалентной вакциной из аттенуированных штаммов E. coli и специфической профилактики колибактериоза телят бивалентной гипериммунной сывороткой.

Разработан способ получения бивалентной гипериммунной сыворотки против колибактериоза крупного рогатого скота путём гипериммунизации продуцентов аттенуированными штаммами эшерихий.

1.6. Аprobация полученных результатов

Основные результаты работы доложены и обсуждены на:

- международной научной конференции Алтайского края РФ (г. Барнаул, 1996 г., 14-16 мая);
- научной конференции, посвященной 50-летию Алтайской НИВС «Ассоциативные инфекции сельскохозяйственных животных и новые подходы к их ликвидации и профилактике» (г. Барнаул, 30-31 июля 1997 г.).

Основные положения, выводы и практические предложения, изложенные в диссертации, обсуждены и одобрены на межлабораторном совещании сотрудников ГНУ ИЭВСиДВ СО РАСХН (2004 г.)

1.7. Публикация результатов исследований

По теме диссертации опубликовано 6 научных работ.

1.8. Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 136 страницах компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы, собственных исследований, обсуждения результатов исследований, выводов, практических предложений, списка литературы и приложений.

Диссертация иллюстрирована 29 таблицами и 1 рисунком. Список литературы включает 215 источников, из них 58 зарубежных авторов.

1.9. Основные положения, выносимые на защиту:

- данные по изучению распространения адгезивных штаммов эшерихий

хий коли среди новорожденных телят в хозяйствах Алтайского края;

- результаты изучения иммуногенных и протективных свойств живой бивалентной вакцины из аттенуированных адгезивных штаммов *E. coli* на лабораторных и сельскохозяйственных животных;

- рациональная схема гипериммунизации животных - продуцентов аттенуированными адгезивными штаммами *E. coli*;

- способы получения и применения поливалентной гипериммунной сыворотки против колибактериоза крупного рогатого скота;

- эффективность живой бивалентной вакцины и бивалентной гипериммунной сыворотки против колибактериоза крупного рогатого скота в производственных условиях.

2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.

2.1. Материалы и методы исследований

Работа выполнена в 1994 - 2003 гг. в ГНУ Институте экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СО РАНХН.

В работе использовали аттенуированные штаммы *Escherichia coli* K-18 и *Escherichia coli* K- 20. Штамм *E. coli* K-18 является K99 позитивным, штамм *E. coli* K- 20- F 41 позитивным.

Изучение аттенуированных штаммов проводили в сравнении с вирулентными культурами *Escherichia coli* 09 , 0101,0141 и K12. Штаммы 09, 0101 и K12 являются K99 позитивными, штамм 0141 -F41 позитивным.

При выполнении работы использовали 676 беспородных мышей массой 14-16 гр., 160 морских свинок, 234 новорожденных телят 10-30-дневного возраста, 77 коров за 30-45 дней до отела, а также биоматериал, полученный от больных и павших телят, неблагополучных по колибактериозу хозяйств.

Морфологические и культуральные свойства аттенуированных адгезинпозитивных штаммов изучали при многократных пересевах на твердых, полужидких и жидких питательных средах.

Биохимические свойства изучали путём посева на углеводные среды с индикатором Андрее, на селективно-дифференциальных средах Эндо и Плоскирева.

Антигенные свойства аттенуированных штаммов определяли в сравнении с вирулентными культурами с поли - и монорецепторными сыворотками.

Остаточную вирулентность испытывали на 280 мышах, 16 телятах с учетом их реакции на введение вакцинных штаммов, высеваемости и диссимилиации вакцинных культур при различных дозах и способах заражения.

Иммунизирующую активность вакцинных штаммов изучали на **140** белых мышах и 58 телятах. Оценку иммуногенности штаммов проводили по величине 50%-ной иммунизирующей дозы (ИД), определяемой по методу Кербера в модификации И. П. Ашмарина и А. А. Воробьевой (1962).

В качестве показателей, отражающих гуморальные факторы защиты организма у иммунных животных, определяли уровень специфических противозэшерихиозных антител в РА по общепринятой методике.

Для прижизненной бактериологической диагностики исследовали фекальные массы, а также кровь от больных и здоровых телят, не подвергавшихся лечению антибиотиками и другими антибактериальными препаратами. Для посмертной диагностики - трупы животных или патологический материал: перевязанный участок тощей кишки с брыжеечными лимфатическими узлами, сердце, сосуды которого перевязывали лигатурой, трубчатую кость, селезенку, почку, доли печени с желчным пузырем, кусочки легких (измененные участки с окружающей тканью) и пуповину.

Материалы от больных и павших, а также от здоровых телят высевали на МПА, МПБ, среду Эндо и инкубировали в течение 18-20 часов при температуре 37° С.

Идентификацию бактериальных культур проводили по культуральным и биохимическим свойствам, а также по патогенным факторам.

Все изоляты *E. coli*, выделенные из содержимого тощей и подвздошной кишки, а также из фекалий телят, исследовали на способность к синтезу адгезивных фимбрий. Для выращивания адгезинпозитивных штаммов эшерихий использовали полусинтетическую среду Минка. Все среды для бактериологических исследований готовили по общепринятым методикам в соответствии с приложением к «Методическим указаниям по бактериологической диагностике эшерихиоза животных», утвержденным МСХ СССР 1 декабря 1981 г, «Методическими указаниями по бактериологической диагностике колибактериоза (эшерихиоза) животных», утвержденные МСХ РФ 27 июля 2000 г.

Обнаружение адгезивных антигенов в культурах эшерихий \ С целью определения адгезивных антигенов в культурах эшерихий использовали капельную реакцию агглютинации на стекле с моноклональными антителами. Для этого использовали чистые культуры эшерихий, выделенные из патологического материала. Типичную колонию, выросшую на среде Эндо или МПА пересевали на среду Минка, среду Симмонса и МПБ. Через **12-16** час. колонии эшерихий, выросшие на среде Минка исследовали в РА с моноклональными антителами на обнаружение К 99 и **F41** адгезивных антигенов. Для исследования культур на наличие К 88 антигена использовали колонии, выросшие на МПА.

Состояние поствакцинального иммунитета определяли по нарастанию титров антител в реакции агглютинации в сыворотке крови животных, молозиве и молоке коров.

Для изготовления гипериммунной сыворотки против колибактериоза крупного рогатого скота использовали две схемы гипериммунизации животных. Продуцентами сыворотки являлись клинически здоровые волы в возрасте от 3 до 5 лет живой массой тела не менее 350 кг. В качестве антигенов для гипериммунизации волов использовали по схеме № 1 инактивированные вирулентные культуры *E.coli* K-21 и *E.coli* K- 36, а по схеме №2 - аттенуированные живые вакцинные штаммы *E.coli* K- 18 и *E.coli* K- 20 в возрастающих дозах (по схеме №1 от 10 до 275 мл, а по схеме №2 - от 2 до 16 мл).

В процессе гипериммунизации у продуцентов периодически брали кровь и в сыворотке определяли в РА титры специфических антител.

Кровь от продуцентов брали в стерильные градуированные бутылки ёмкостью 15-20 литров. Сыворотку из крови получали как цитратным методом, для чего кровь сепарировали, а полученную плазму дефибринировали, так и методом отстаивания в специально монтированные для этой цели стеклянные баллоны.

Для предохранения крови от свёртывания использовали 10%-ный стерильный раствор лимоннокислого натрия из расчета 34 мл на 1 л крови. Полученную цитратную кровь сепарировали, затем сыворотку дефибринировали, добавляя к ней 30%-ный раствор хлористого кальция из расчета 1,3 мл на 1 л плазмы.

Дефибринированную сыворотку консервировали 5%-ным раствором фенола до 0,5% его концентрации в сыворотке. В простерилизованном и охлажденном отстойнике сыворотку отстаивали 2 месяца при температуре $+(5 - 8)^{\circ}\text{C}$.

Профильтрованную и проверенную на стерильность сыворотку разливали в стерильные флаконы, тщательно закрывали их резиновой пробкой с металлическим колпачком и этикетировали. Полученную сыворотку проверяли на стерильность, безвредность и активность.

Стерильность сывороток проверяли путём посева её в пробирки с МПА, МПБ и на среду Эндо, Китт-Тороцци (по 10 пробирок на среду). Посевы выдерживали в термостате при температуре $36-37^{\circ}\text{C}$ в течение 10 суток.

Безвредность сыворотки каждой серии проверяли в опытах на белых мышах, морских свинках путём однократного введения сыворотки в возрастающих дозах (0,3-0,4- 0,5-0,6 мл)

Морским свинкам весом 350-400 г. сыворотку вводили подкожно в дозах 5, 7, 10, 12 мл. Наблюдение вели в течение 10 суток. Результаты оценивали по выживаемости животных.

Превентивную активность бивалентной сыворотки проверяли на морских свинках и телятах. Морским свинкам массой тела 250-350 г. сыворотку вводили подкожно и внутрибрюшинно в дозах 0,5; 1,0; 2-3 мл. Телятам 10-20-дневного возраста сыворотку вводили подкожно в дозах 5, 10, и 15 мл, используя на каждую дозу по 5 животных. Животных опытных и контрольных групп через 24 часа после введения сыворотки заражали внутрибрюшинно вирулентными культурами эшерихий К-21 и К-36.

Статистическую обработку полученных в опытах цифровых данных проводили с использованием стандартных программ на персональном компьютере. Уровень значимости вариационных рядов оценивали параметрическим t - критерием Стьюдента.

2.2. Результаты исследований

2.2.1. Изучение распространенности адгезивных штаммов эшерихий

В хозяйствах Алтайского края в структуре желудочно-кишечных заболеваний новорожденных телят ведущее место занимает колибактериоз. По бактериологическим исследованиям биоматериалов от павших телят в краевой ветеринарной лаборатории последние 20 лет в 13,5 - 20% случаев выделены энтеропатогенные культуры *E.coli*.

Пик заболеваемости телят колибактериозом приходится на зимне-весенние месяцы (ноябрь- апрель). Заболеваемость телят в эти месяцы достигает от 51,2 до 77,4% от числа народившихся животных, а летальность - до 48,4%

При бактериологических исследованиях биоматериалов из 6 хозяйств районов Алтайского края (Шелаболихинского, Павловского, Ребрихинского) от новорожденных телят с клиническими признаками диареи нами выделено и изучено 49 культур патогенных *E.coli*. При этом 27 культур выделены из внутренних органов 18 павших телят и 17 культур из проб фекалий от телят с диарейным синдромом.

Результаты исследований биоматериала показали, что от 15 из 18 животных выделены патогенные культуры эшерихий. Адгезинпозитивные штаммы обнаруживали в кишечнике 11 животных (61,1%), в желчном пузыре у 4 (22,2%), в печени у 3 (16,6%), в сердце и селезёнке у 7 (38,8) и легких у 1 (5,5%). В капельной РА с моноклональными антителами К99 позитивные культуры *E.coli* выявлены в 21 пробах патологического материала, F41 - в 3 пробах, продуцирующие как К99 и F41 антигены - в 2 пробах. Полученные данные свидетельствуют, что у большинства животных обнаруживаются *E. coli* с адгезинами К99 и F41. При этом установлено, что на эффективность обнаружения К99 и F41 позитивных штаммов эшерихий значительное влияние оказывает состав питательных сред, в которых накапливается бактериальная масса в процессе выделения чистой

культуры. Выращивание культур *E. coli* на среде Минка позволяет выявлять значительно большее количество адгезинпозитивных культур, нежели на МПА.

Одновременно с изучением адгезинпозитивных свойств эшерихий проводили серологическую типизацию изолированных культур эшерихий по О-антигену при помощи набора типоспецифических агглютинирующих сывороток.

Результаты исследований показывают, что колибактериоз у телят чаще вызывают адгезинпозитивные штаммы эшерихий серогрупп 0101, 08, 0141, реже 020, 086, 0119,09.

При исследовании проб фекалий, от 23 клинически больных телят выделили 17 адгезинпозитивных культур *E. coli*. При этом у телят чаще обнаруживали K99 антиген (в 11 пробах из 17-64,7%), F41 антиген в 4 пробах (23,5%), реже K88 - в 1 пробе (5,9%). Сочетания адгезинов K99 + F41 обнаружили у 1 (5,9%) культуры эшерихий.

В эксперименте на 135 белых мышах массой тела 14 - 16 г. определяли вирулентность 27 адгезинпозитивных культур *E. coli*. Мышей заражали культурой *E. coli* в дозе 500 млн.м.к. По результатам биопробы 12 (44,4%) из 27 адгезинпозитивных культур *E. coli* являются вирулентными.

Результаты проведённых исследований показали, что между вирулентностью и обнаружением адгезивных антигенов существует определенная связь. При этом сочетании вирулентность культур и наличие адгезивных антигенов у телят колеблется на уровне 44,4%. Наиболее патогенными для белых мышей являются серотипы 0101 (K99), 0141 (F41), 020 (K99) и серотипы 0101 и 0141, имеющие сочетания K99 + F41.

Изучение распространённости адгезинпозитивных штаммов среди телят показало, что наиболее часто встречаются K99 и F41 позитивные штаммы. В исследованных культурах *E. coli* адгезины выявлялись как в отдельности, так и в сочетании.

2.2.2. Морфологические, культуральные, биохимические и антигенные свойства аттенуированных адгезивных штаммов эшерихий

Биохимические свойства вакцинных (аттенуированных) штаммов *E.coli* K-18 (0101+K99), *E. coli* K-20 (041 + F41) и вирулентных *E. coli* K-21 (0101 + K99), *E.coli* K-36(0141 + F41), *E. coli* K-16(0149 + K88) изучали в сравнении с вирулентными адгезинпозитивными культурами *E. coli* 0101 K99 + F41, 0149 + K88, O20 K 99 и 0111 K99 + F41- (адгезии негативная) на средах, содержащих сахар и многоатомные спирты. Учёт результатов посевов на средах с углеводами проводили в течение 10 суток.

Установлено, что адгезинпозитивные вакцинные и вирулентные штаммы эшерихий ферментируют с образованием кислоты и газа лактозу,

глюкозу, маннит, непостоянно мальтозу, рамнозу и сахарозу, не изменяет адоний и индий, не разжижают желатин, не разлагают мочевины и выделяют индол. Сероводород адгезинпозитивные вакцинные и вирулентные штаммы не образовывали, однако, штамм 0101 K99 + F41 образовывал его в незначительной степени.

Проведенные исследования морфологических и культурально-биохимических свойств выявили соответствие адгезинпозитивных штаммов эшерихий основным характеристикам *E. coli*.

Для сравнительного исследования антигенных свойств наряду с вакцинными штаммами, нами были изучены вирулентные и адгезиннегативные культуры эшерихий;

Результаты капельной РА с МКА показали, что вакцинные штаммы *E. coli* K-18 и *E. coli* K-20 являются активными продуцентами K99 и F41, а штамм *E. coli* K-16 продуцирует K88 адгезивные антигены. Установлено, что исследуемые вакцинные и соответствующие адгезинпозитивные (*E. coli* 0101, 0149) штаммы в одинаковой степени агглютинируются поливалентными и О-колисыворотками. Таким образом, адгезинпозитивные вакцинные штаммы *E. coli* K-18 (0101 + K99) и *E. coli* K-20 (0141+ F41) по антигенной структуре являются полноценными.

Вирулентные свойства вакцинных штаммов *E. coli* K-18 и *E. coli* K-20 проверяли на белых мышах массой 14-16 г.

Заражающие дозы вирулентных культур при подкожном или внутрибрюшинном введении белым мышам составляли 10^3 , 10^5 , 10^7 , а для аттенуированных штаммов- 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 микробных клеток.

На каждую дозу вакцинных и вирулентных штаммов *E. coli* использовали по 10 мышей. Результаты оценивали по их выживаемости.

В опытах с 2-мя повторностями на 560 белых мышах установлено, что аттенуированные (вакцинные) штаммы *E. coli* K-18 и K-20 обладают слабой вирулентностью. Белые мыши опытных групп в 70-100% случаев оставались живыми, тогда как контрольные, зараженные внутрибрюшинно вирулентными культурами *E. coli* K-21 и *E. coli* K-36 в дозе 10^{-10^9} , все погибли.

С целью изучения диссимилиации и сроков элиминации адгезинпозитивных вакцинных штаммов *E. coli* K-18 и *E. coli* K-20 из организма животных провели иммунизацию белых мышей в дозе 10^5 микробных клеток. Через 3, 7, 14, 21, 25 и 30 суток после вакцинации по 3 опытных мышкы убивали и проводили бактериологические исследования. Было установлено, что K99 позитивный вакцинный штамм *E. coli* K-18 обильно высевали из паренхиматозных органов и костного мозга в течение 14 суток, а через 20 суток - единичные колонии выделяли из печени, селезенки, паховых и брыжеечных лимфатических узлов. К 25-30 суткам наступала полная элиминация вакцинного штамма.

Адгезинпозитивный (F41) аттенуированный штамм *E. coli* К-20 обильно высевался из органов в течение 7 суток, а спустя 14 суток, только единичные колонии высевали из печени, селезенки, паховых и брыжеечных лимфатических узлов. Полная элиминация наступала к 21 суткам.

2.2.3. Иммуногенные свойства адгезивных вакцинных штаммов эшерихий

2.2.3.1. Экспериментальные опыты на лабораторных животных

Иммунизирующую активность адгезинпозитивных аттенуированных штаммов *E. coli* К-18 и *E. coli* К-20 изучали в опытах с повторностями на беспородных мышах весом 14-16 г. Мышей иммунизировали подкожно суточной культурами К-18 и К-20 в дозах 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 , 10^7 микробных клеток. Контролем служили неиммунизированные мыши и иммунизированные поливалентной гидроокисьалюминиевой формол-тиомерсальной вакциной против колибактериоза телят и ягнят (2-вариант).

Через 20 суток после иммунизации мышей опытной группы внутрибрюшинно заражали вирулентными штаммами *E. coli* К-21 и *E. coli* К-36. Результаты опыта приведены в таблице 1.

Таблица 1.

Сравнительная иммунологическая эффективность вакцинных штаммов *E. coli* К-18 и *E. coli* К-20 и формол-тиомерсальной вакцины в опытах на белых мышах.

Наименование штамма или вакцины	Иммунизирующая доза	Штамм для внутрибрюшинного метода заражения	Результаты заражения вирулентными культурами <i>E. coli</i> К-21 и К-36		
			Пало	Выжило	Выжило (%)
<i>E. coli</i> К-18	10^3	К-21	3	7	70
	10^4		2	8	80
	10^5		-	10	100
	10^6		1	9	90
	10^7		-	10	100
<i>E. coli</i> К-20	10^3	К-36	4	6	60
	10^4		2	8	80
	10^5		-	10	100
	10^6		-	10	100
	10^7		1	9	90
Формол-тиомерсальная вакцина	0,2 мл	К-21	6	4	40
		К-36	5	5	50
Контроль (непривитые)	-	К-21	10	-	0
		К-36	10	-	-

Примечание: срок наблюдения 15 суток

Из таблицы видно, что аттенуированные штаммы *E. coli* K-18 и *E. coli* K-20 в дозе $10^5 - 10^7$ м.к. обладают активными иммуногенными свойствами, защищают белых мышей в 90 - 100% случаев от смертельного заражения. Формол-тиомерсальная же вакцина защитила от экспериментального заражения только 40 - 50% белых мышей, а гибель мышей в контроле составила 100%.

Кроме учета выживаемости контроль осуществляли и бактериологическими исследованиями. По 10 мышей из каждого опыта, оставшихся живыми после заражения, через две недели убивали для бактериологических исследований. Результаты исследований показали, что в организме мышей, иммунизированных живой вакциной к 15 суткам происходит полная элиминация заражающей культуры. От мышей, иммунизированных формол-тиомерсальной вакциной, рост заражающей культуры отмечали из печени, селезенки, брыжеечных лимфатических узлов и крови.

2.2.3.2 Опыты на телятах

Для определения оптимальной иммунизирующей дозы вакцин для телят использовали бивалентную вакцину против колибактериоза крупного рогатого скота, изготовленную из двухмаркерных K99 и F41 позитивных штаммов *E. coli* K-18. Телят 25-30- дневного возраста иммунизировали однократно, подкожно в дозах $5 \cdot 10^8, 10^9$; $1,5 \cdot 10^9$ и $2 \cdot 10^9$ микробных клеток. На каждую дозу и в контроле использовали по 5 телят.

Через 21 день после иммунизации все животные были заражены внутрибрюшинно вирулентными культурами эшерихии в дозе 10^{10} микробных клеток (таблица 2)

Как видно из таблицы 2, оптимальной иммунизирующей дозой вакцины из адгезинпозитивного штамма *E.coli* K-18 для телят является 10^9 и $1,5 \cdot 10^9$ микробных клеток, которая защищает 100% животных от заражения вирулентной культурой *E.coli* K- 21.

Аналогичный опыт по определению оптимальной дозы вакцинного штамма K-18 + K-20 проведен на 25 телятах. Результаты опыта приведены в таблице 3, из которой видно, что оптимальной иммунизирующей дозой бивалентной вакцины из штамма K-18 + K-20 для телят является 10^9 , $1,5 \cdot 10^9$ и $2 \cdot 10^9$ микробных клеток. В остром опыте вакцина в указанных дозах защищает 100% животных от гибели после внутрибрюшинного заражения вирулентной культурой.

Таблица 2.

Определение оптимальной иммунизирующей дозы вакцинного штамма *E. coli* К-18 на телятах

Группы	Иммунизирующая доза вакцины (м. к.) при подкожном введении	Результаты: телят из группы		
		Пало	Выжило	Выжило (%)
<i>E. coli</i> К-18	$5 \cdot 10^8$	1	4	80
	10^9	-	5	100
	$1,5 \cdot 10^9$	-	5	100
	$2 \cdot 10^9$	1	4	80
Контроль	-	5	-	0

Примечание: срок наблюдения 15 суток.

В сравнительном опыте по изучению иммуногенности живых вакцин из штамма К-18 и бивалентной из штамма К-18 + К-20 брали дозы 10^9 ; $1,5 \cdot 10^9$ микробных клеток. Формол-тиомерсоловую вакцину телятам вводили двукратно с интервалом 7-10 дней в дозах: первый раз - 1 мл, второй - 2 мл, суммарная доза 12 млрд. микробных клеток. Вакцинальная реакция у телят характеризовалась воспалительными явлениями с образованием ограниченного отёка.

Таблица 3.

Определение оптимальной иммунизирующей дозы вакцинных штаммов *E. coli* К-18 + К-20 в опыте на телятах

Группы	Иммунизирующая доза вакцины (м.к.) при подкожном введении	Результаты: телят из группы		
		Пало	Выжило	Выжило (%)
<i>E. coli</i> К-18 + К-20	$5 \cdot 10^8$	1	4	80
	10^9	-	5	100
	$1,5 \cdot 10^9$	-	5	100
	$2 \cdot 10^9$	1	5	100
контроль	-	5	-	0

Примечание: срок наблюдения 15 суток.

В первые сутки отмечали слабое угнетение, незначительное повышение температуры тела, в среднем до $39,4^\circ \text{C}$, отеки на месте введения вакцины рассасывались в течение 4-7 суток.

Через 20 суток после вакцинации все подопытные и контрольные телята были заражены внутрибрюшинно 20-ти часовыми вирулентными культурами *E.coli* K-21 и *E.coli* K-36 предварительно оттитрованной дозой в специальном опыте на не иммунных телятах и составила $2 \cdot 10^{10}$ м.к.

Напряженность иммунитета у вакцинированных телят после заражения оценивали по выживаемости, температурной реакции, степени проявления диареи. Результаты опыта приведены в таблице 4.

В данном опыте установлено, что телята, иммунизированные вакцинами из штаммов K-18 и K-20, легко перенесли заражение вирулентными культурами.

Таблица 4.

Изучение иммуногенности живой (аттенуированной) и формол-тиомерсальной вакцины в сравнительном опыте на телятах

Наименование групп	Доза иммунизации (м.к.) при подкожном введении	Результат заражения вирулентными культурами <i>E.coli</i> K-21 и K-36		
		Пало	Выжило	Выжило (%)
Вакцина из штамма K-18	10^9	-	5	100
	$1,5 \cdot 10^9$	-	5	100
	$2 \cdot 10^9$	1	4	80
Бивалентная вакцина из K-18+K-20 штаммов	10^9	-	5	100
	$1,5 \cdot 10^9$	-	5	100
	$2 \cdot 10^9$	-	5	100
Формол-тиомерсальная вакцина	4· 10(1мл) 8· 10(2мл)	2	3	60
	4· 10(1мл)	2	3	60
	8· 10(2мл)			
Контроль (неиммунизированные)*	-	3	-	0
		3	-	0

Примечание: срок наблюдения 15суток после заражения.

* в контроле было 3 животных, а в других группах - 5

У телят, иммунизированных двукратно формол-тиомерсальной вакциной, наблюдали повышение температуры тела в течение 4-7 суток, сопровождавшееся угнетением общего состояния, поносами и снижением аппетита. Четыре теленка из 10 вакцинированных пали на 7-9 сутки с признаками острого колибактериоза. При бактериологическом исследовании органов и лимфатических узлов обильно высевали исходную культуру *E. coli*.

Все животные контрольной группы в состоянии истощения и обезвоживания организма погибли на 5-9 сутки после заражения.

Таким образом, результаты изучения иммуногенных свойств аттенуированных адгезинпозитивных штаммов эшерихий показали, что иммунизация белых мышей и телят адгезинпозитивными (K99 и F41) штаммами *E. coli* K-18 и *E. coli* K-20 защищает от экспериментального заражения

вирулентными культурами 90-100% животных, а формол-тиомерсальная вакцина защищает от гибели только 40-60% опытных животных.

Оценку иммунобиологических сдвигов в организме вакцинированных телят изучали при исследовании через разные сроки сыворотки крови в РА в опыте на 25 телятах 20-22 дневного возраста, разделенных на 3 группы.

Телят первой группы (10 животных) в возрасте 20-22 дня иммунизировали бивалентной вакциной из штамма *E. coli* К-18 и К-20 (соотношение 1:1) в дозе 10^9 м.к.

Телят второй группы (10 животных) иммунизировали формол-тиомерсальной вакциной двукратно в возрасте 15 и 20-22 дня в дозах 4×10^9 и 8×10^9 м.к.

Телят третьей группы (5 животных) не вакцинировали и они служили контролем.

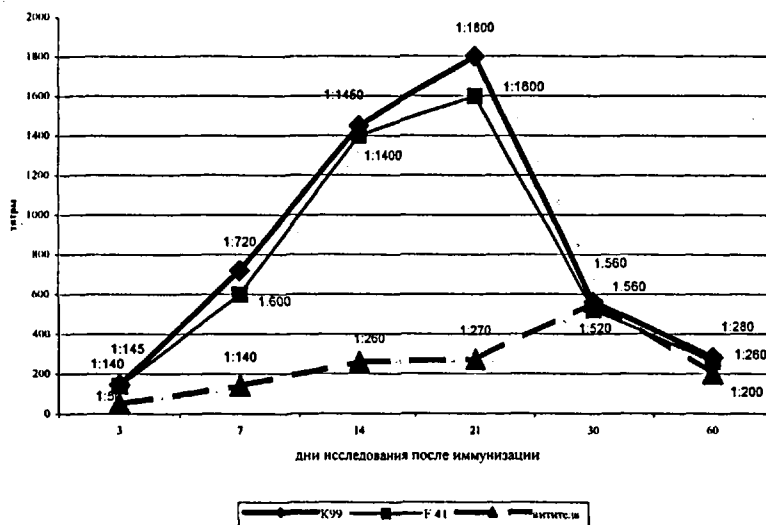
До, а затем через 3, 7, 21, 30, и 60 суток после иммунизации у животных брали кровь для определения в сыворотке титров специфических антител в РА.

После введения вакцины за телятами проводили клинические наблюдения в течение 5-7 дней. Небольшая припухлость на месте введения вакцин исчезала на 3-4 сутки. У телят, иммунизированных адгезивными антигенами К-18 и К-20, отмечали незначительное повышение температуры тела на 2 сутки на 0,5-1,0 °С. В течение 1-2 суток у телят отмечали незначительное ухудшение общего состояния, на 3-4 сутки температура тела приходила в норму, общее состояние улучшалось, и восстанавливался аппетит. Результаты определения титров антител в сыворотке крови телят приведены на рис. 1

Как видно из рисунка перед вакцинацией в сыворотке крови телят обнаруживали антитела в низких титрах. Уже на 3-7 дни в сыворотке крови телят первой группы отмечается резкое нарастание титра антител (1:720-1:600, $P < 0,05$). Максимальное увеличение титра антител в сыворотке крови телят первой группы достигало к 21 дню (1:1800-1:1600, $P < 0,05$), а у телят 2 гр. - к 30 дню (1:520).

Через 60 суток на более высоком уровне титр антиадгезивных антигенов ($1:280 \pm 26,8$, $1:260 \pm 34,2$) был у телят первой группы ($P < 0,05$), а у телят второй группы на уровне $1:260 \pm 23,6$

Рис 1 Динамика накопления антиадгезивных антител в сыворотке крови иммунизированных телят в РА



Примечание: разведение 1:50, 1:100, 1: 200, 1:400, 1:800, 1:1600, 1: 1800

На основании этих результатов исследований можно сделать вывод, что формирование гуморального иммунитета у телят, иммунизированных живыми вакцинами, происходило на более высоком уровне по сравнению с показателями сыворотки крови телят, иммунизированных формолвакциной.

2.2.3.4. Производственные испытания живой бивалентной вакцины против колибактериоза крупного рогатого скота

Для изучения иммуногенной активности вакцинных штаммов было сформировано по принципу аналогов 3 группы из сухостойных коров за 40-45 дней до отела. Животных первой группы (12 коров) вакцинировали за 30-35 дней до отела сухой живой бивалентной вакциной из адгезивных (K99, F41) штаммов эшерихий K-18 и K-20 подкожно в дозе 2,0 мл. Коров второй группы (10 животных) вакцинировали формол-тиомерсальной вакциной двукратно с интервалом 10-15 дней за 45 дней до отела в дозах: первый раз- 10 мл, второй - 15 мл. Третья группа (10 коров) служила контролем, ее не иммунизировали.

Для изучения иммунного ответа на введение вакцины сыворотку крови коров исследовали до вакцинации, а затем на 15 и 30 дни после отела.

У телят для исследования брали кровь до приема молозива, затем на 2, 5, 7 и 10 сутки жизни.

Взятие проб молозива проводили в первый, второй день после отела, молока на пятый, седьмой и десятый дни.

Динамика антиадгезивных антител в сыворотке крови коров приведена в таблице 6, из которой видно, что перед вакцинацией антитела к адгезивным антигенам K99 и F41 содержатся в титрах $1:75 \pm 18,0$ - $1:120 \pm 22,0$

Таблица 5.

Титры антиадгезивных антител в сыворотке крови стельных коров, иммунизированных живой бивалентной вакциной в РА в динамике.

Группы коров	Титры антител ($M \pm m$) в сыворотке крови			
	до иммунизации	после иммунизации (дней)		
		15	30	45 (после отела)
1	$1:75 \pm 18$ $1:120 \pm 36,6$	$1:960 \pm 36,6$ $1:880 \pm 80,4$ $P < 0,05$	$1:1080 \pm 66,6$ $1:820 \pm 80,8$ $P < 0,05$	$1:1060 \pm 60,6$ $1:840 \pm 42,8$ $P < 0,05$
2	$1:100 \pm 22,0$ $1:80 \pm 20,4$	$1:600 \pm 20,0$ $1:480 \pm 30,2$ $P < 0,05$	$1:480 \pm 16,6$ $1:480 \pm 40,2$ $P < 0,05$	$1:400 \pm 20,6$ $1:480 \pm 26,6$ $P < 0,05$
3	$1:120 \pm 22,0$ $1:100 \pm 22,0$	$1:120 \pm 18$ $1:140 \pm 12,0$	$1:140 \pm 26,0$ $1:120 \pm 20,0$	$1:140 \pm 26,0$ $1:140 \pm 24,2$

Примечание: - в числителе средние титры антител против адгезивного антигена K99
- в знаменателе средние титры антител против адгезивного антигена F41.

Обнаружение адгезивных антител в сыворотке крови коров до иммунизации указывает на циркуляцию адгезинпозитивных штаммов эшерихий среди животных в обследованных хозяйствах. Средние титры антител обнаруживаются в небольших титрах у коров третьей группы на протяжении всего сухостойного периода и после отела.

После иммунизации стельных коров титры антител в сыворотке крови достоверно повысились по сравнению с исходным уровнем. В первой группе животных титры антител к антигенам K99 через 15 дней составили от $1:880 \pm 80,4$ до $1:960 \pm 36,8$.

В дальнейшем титры противоадгезивных антител в сыворотке крови у всех иммунизированных животных нарастали и достигали довольно высоких значений к 30 дню.

К моменту рождения телёнка в сыворотке крови у всех вакцинированных коров наблюдали максимальное накопление титра антител. Этот факт является наиболее значимым, так как эти антитела передаются через молозиво новорожденным телятам.

Однако более высокие титры антител отмечаются у коров, привитых живой бивалентной вакциной (группа 1).

В сыворотке крови телят, полученных от коров всех групп, до приема молозива антитела не обнаружены. После 8-10-кратного приёма молозива (на 3-й день после рождения) антитела к адгезивным антигенам, обнаруживали в сыворотке крови у телят, полученных от неиммунизированных и вакцинированных коров. При этом титры антител в сыворотке крови телят, получивших молозиво от иммунизированных адгезивными штаммами матерей были в несколько раз выше, чем у телят контрольной группы.

Результаты исследований показали, что более высокие титры антител обнаружены в сыворотке молозива коров, иммунизированных бивалентной живой вакциной и в сыворотке крови телят, полученных от этих коров. Так, в молозиве коров антитела накапливались в титре $1:1240 \pm 180,6$ к адгезивному антигену K99 и $1:1280 \pm 232,6$ к адгезивному антигену F41. В титре $1:1140 \pm 71,6$ антиадгезивные антитела выявляли в сыворотке крови телят, полученных от этих коров.

Титры антиадгезивных антител в молозиве коров, иммунизированных формол-тиомерсальной вакциной, были значительно ниже, чем у животных, привитых бивалентной живой вакциной. Средний титр антител против K99 антигена $1:860 \pm 42,2$, против антигена F41 - $1:820 \pm 78,0$. Соответственно титры антиадгезивных антител в сыворотке крови телят этой группы также были ниже, чем у телят от коров, привитых бивалентной живой вакциной. Полученные данные указывают, что между содержанием антител в сыворотке крови и молозиве коров-матерей и титром антител в сыворотке крови новорожденных телят прослеживается прямая зависимость.

В сыворотке крови телят, полученных от не иммунизированных коров, антитела к адгезивным антигенам обнаруживали в низких титрах (к адгезивному антигену K99 $1:100 \pm 12,0$; K F 4 1 - $1:120 \pm 22,0$). Дальнейшие наблюдения показали, что такие титры антител в сыворотке крови новорожденных телят не обеспечивают их защиту от колибактериозной инфекции.

Нами проведено сравнительное изучение защитного действия молозива не вакцинированных и вакцинированных формол-тиомерсальной вакциной и адгезинпозитивными штаммами E.coli K-18 и K-20 коров на телятах.

Устойчивость новорожденных телят к колибактериозу изучали на 28 телятах, 18 из которых были получены от иммунизированных формол-тиомерсальной и живыми вакцинами. Всем телятам после рождения выпаивали по 2 л молозива, а одной группе (5 телят от неиммунизированных

коров) за 30 минут до выпаивания молозива внутрь давали 10 мл протективного антигена (колипротектант ВИЭВ) ТУ 40-21-524-80, серия №2, госконтроль №2, изготовленного Алма-атинским биокомбинатом.

Всем опытным и контрольным телятам через 2-3 час. после выпойки молозива вводили перорально суспензию вирулентных культур *E.coli* К-36 и *E.coli*-21.

Анализ заболеваемости новорожденных телят показал, что из 12 телят, которым выпаивали молозиво от коров иммунизированных бивалентной вакциной из штаммов К-18 и К-20, три переболели с симптомами диареи в легкой форме и срок переболевания составил в среднем 3-4 дня. Все телята выздоровели, гибели животных не было.

В группе телят, которым применяли колипротектант ВИЭВ, из 5 голов - 3 (60%) заболели тяжело, 1 теленок пал на 7 сутки после рождения.

У четырех телят, полученных от контрольных (неиммунизированных) коров, наблюдали диарею, у 2 из них заболевание протекало в тяжелой форме. У этих телят отмечался профузный понос, общее угнетение, вялость, обезвоживание и исхудание, температура тела была в пределах нормы. В этой группе в состоянии истощения пало 2 теленка на 7-8 сутки после заражения.

Из 6 телят, получавших молозиво от коров, иммунизированных формол-тиомерсальной вакциной, заболели 4 (66,6%) с симптомами диареи. Срок переболевания телят составил в среднем 5-10 дней.

Таким образом, телята, получавшие молозиво от коров, иммунизированных адгезинпозитивными штаммами эшерихий, заболевали лишь в отдельных случаях, и болезнь у них протекала легко. Нами установлена положительная корреляция ($P < 0,05$) между уровнем антител против адгезинов K99 и F41 в молозиве и состоянием здоровья телят.

С целью испытания эффективности вакцинации стельных коров в профилактике колибактериоза новорожденных телят в производственных условиях был проведен контролируемый опыт в 3-х хозяйствах Заринского района Алтайского края, неблагополучных по колибактериозу крупного рогатого скота. Коров иммунизировали бивалентной вакциной за 35-40 дней до отела. Всего было вакцинировано 2529 коров, и 971 корову не вакцинировали, они были контролем. Результаты опыта приведены в таблице 6.

Таблица б.

Результаты производственных испытаний живой бивалентной вакцины в контролируемом опыте по вакцинации стельных коров.

Вакцинировано не вакцинирова- но	От них получено телят	Не заболело телят	Заболело и пало телят	Сохранность, %
Колхоз им. Фрунзе				
$\frac{843}{264}$	$\frac{700}{220}$	$\frac{655}{155}$	$\frac{45}{65}$	$\frac{93,6}{70,5}$
А.О «Нива»				
$\frac{963}{477}$	$\frac{800}{400}$	$\frac{740}{277}$	$\frac{60}{122}$	$\frac{92,5}{69,5}$
А.О им. Ленина				
$\frac{723}{229}$	$\frac{600}{190}$	$\frac{565}{136}$	$\frac{35}{54}$	$\frac{94,2}{71,6}$
Всего				
$\frac{2529}{971}$	$\frac{2100}{810}$	$\frac{1960}{569}$	$\frac{140}{241}$	$\frac{93,4}{70,2}$

Из таблицы видно, что от вакцинированных коров было получено 2100 нормально развитых телят, а от не вакцинированных - 810.

Из 2100 телят, полученных от коров вакцинированных живой бивалентной вакциной, заболели и погибли от колибактериоза в течение 30 дней 140 (6,6%), тогда как из 810 телят, полученных от не вакцинированных коров, заболели и погибли 241 (29,8) или в 4,5 раза больше. Сохранность телят, полученных от вакцинированных коров, составила 93,4%, а от контрольных - 70,2%

После получения высокой профилактической эффективности живой бивалентной вакцины из адгезинпозитивных (K99 и F41) штаммов *E. coli* K-18 и K-20 производственные испытания её были продолжены в других хозяйствах Алтайского края неблагополучных по колибактериозу крупного рогатого скота. Всего в 12-ти хозяйствах разных районов края было вакцинировано 7136 стельных коров, от которых получили 6234 телёнка. В течение месяца из них пали от колибактериоза 265 или 4,25%. Сохранность телят составила 95,75%.

2.2.5. Разработка гипериммунной сыворотки против колибактериоза крупного рогатого скота

С целью изготовления гипериммунной сыворотки против колибактериоза крупного рогатого скота изучили 2 схемы гипериммунизации животных.

В работе использовали следующие антигены:

1. Вирулентные культуры *E. coli* К-21 и *E. coli* К-36;
2. Вакцинные штаммы *E. coli* К-18 и *E. coli* К-20.

В опытах использовали клинически здоровых волов в возрасте от 3 до 5 лет, весом не менее 350 кг. Отобранные животные исследовали на инфекционные заболевания в соответствии с действующей инструкцией о порядке заготовки и санитарной обработке животных, используемых для производства биопрепаратов.

Животных, взятых в опыт, разделили на 2 группы, по 10 волов в каждой. Их иммунизировали подкожно по двум схемам.

Для гипериммунизации животных готовили два вида антигена.

Для изготовления антигена (гипериммунизация по схеме 1) использовали бульонные культуры двух штаммов - *E. coli* К-21 и *E. coli* К-36: 2^н-суточную - бактериальную и 6 - 8 - суточную - токсическую. Культуры выращивали и смешивали в равных объемах.

После смешивания культур (бактериальной и токсической) содержание •квасцов в антигене было не более 0,1% и 0,2- 0,3% формалина. Затем антиген выдерживали в термостате при температуре 37-38 °С в течение 6 суток при ежедневном встряхивании.

Приготовленные антигены проверяли на стерильность путем посева на МПА, МПБ, на среду Китт - Тароцци и Эндо и на безвредность на белых мышах.

Проверенные на стерильность и безвредность моноантигены *E. coli* смешивали в равных объемах и использовали для гипериммунизации животных, как бивалентный антиген.

С целью перестройки организма, направленную на повышение его специфической реактивности, животные первой и второй группы в подготовленный цикл были подвергнуты иммунизации дважды (с интервалом в 5 суток), приготовленными бивалентным антигеном в дозах 10 и 25 мл, подкожно. Через 21 сутки после последней инъекции антигена всех животных гипериммунизировали нарастающими дозами антигенов.

По первой схеме бивалентный инактивированный антиген животным вводили подкожно в нарастающих дозах от 10 до 275 мл с интервалом 3-5 дней. В течение 93 дней животным было сделано 19 инъекций антигена, и общая доза составила 2607 мл.

По второй схеме гипериммунизации продуцентов использовали биан-

тиген из живых вакцинных штаммов E. coli K-18 и K-20. Нами использован интенсивный метод эксплуатации продуцентов.

Животных предварительно двукратно грундривали антигеном, приготовленным из вакцинных штаммов эшерихий в дозах 1мл (10^9 м.к.) при первой инъекции и 5 мл ($5 \cdot 10^9$ м.к.) при второй инъекции биантигеном с интервалом между ними 5 суток. Интервал между вторым грундриванием и подготовительным циклом гипериммунизации животных был 20 суток.

В подготовительном цикле иммунизацию проводили биантигеном 8-кратно по схеме: 2 - 4 - 6 - 8 - 10 - 12 - 14 - 16 мл (в 1мл - 10^9 м.к.). Интервал между инъекциями 3 дня. При данной схеме срок гипериммунизации животных сократился с 93 суток до 34 дней, почти в 3 раза. Вместо 19-ти инъекций было сделано 8, введено антигена в 36,3 раза меньше, чем по схеме №1.

По мере гипериммунизации у волов отмечалось постоянное увеличение титра эшерихиозных антител.

Максимальный показатель титра антител у животных отмечали на 7 день после иммунизации биантигеном, и составил в 1 группе - $1:3210 \pm 35,1$ до $1:4920 \pm 26,3$, а во 2-й - от $1:5000 \pm 28,1$ до $1:7480 \pm 11,6$.

Результаты опыта позволяют считать, что лучшей схемой гипериммунизации волов в подготовительный период является 2 схема, позволяющая сократить срок гипериммунизации в 2,7 раза и количество затрачиваемого антигена в 37,5 раза.

Животных, прошедших подготовительный период гипериммунизации далее иммунизировали: 1-я группа двукратно по 10 мл инактивированного антигена с интервалом 1-2 суток; животных 2 группы (схема гипериммунизации №2) однократно вводили бивалентный антиген из живых вакцинных штаммов эшерихий в дозе 5 мл. Так продолжали и далее: интервал между очередным взятием крови и порядок иммунизации повторяли каждые 8-10 суток.

В первый раз от продуцентов брали кровь из расчета 800 мл, а в последующем по 1,6 литра на 100 кг веса продуцента.

Сыворотку из крови получали как цитратным методом, для чего кровь сепарировали и полученную плазму дефибринировали, так и методом отстаивания в специально монтированные для этой цели баллоны.

Полученную сыворотку проверяли на стерильность, безвредность и активность на белых мышах, морских свинках и телятах 20-дневного возраста.

При подкожном введении мышам сыворотки в дозах 0,3; 0,4; 0,5; 0,6 мл (по 20 мышей на дозу) 90- 100% мышей оставались живыми в течение 10 дней.

При подкожном введении морским свинкам (масса тела 350-400 г) сыворотки в дозах 5, 7, 10, 12 мл (15 свинок на дозу) 100% выживали в течение 10 дней.

Активность сыворотки проверяли в опытах с повторениями на морских свинках весом 250 - 350 г. Сыворотку морским свинкам вводили подкожно и внутрибрюшинно в дозах - 0,5 - 1 - 2 - 3 мл. Бивалентная сыворотка была активной и защищала подопытных морских свинок в 80 - 100% случаев, при падеже всех контрольных животных. Активной оптимальной дозой сыворотки является 2 мл, которая защищает подопытных животных в 100% случаев от смертельной дозы вирулентных культур эшерихий.

При подкожном введении бивалентной сыворотки, полученной по схеме №1, новорожденным телятам в дозе 5, 10 и 15 мл и последующем внутрибрюшинном заражении смертельной дозой вирулентной культуры *E. coli* К-36, сыворотка защищала от гибели 80-100% телят. В аналогичном опыте по испытанию активности сыворотки, полученной по схеме 2 выживаемость телят, составила 100%.

Эти опыты позволили провести испытания профилактической и лечебной эффективности гипериммунной бивалентной сыворотки против колибактериоза в неблагополучных хозяйствах.

Больным телятам 20-дневного возраста (150 животных) с лечебной целью сыворотку вводили подкожно однократно в дозе 15 мл и двукратно (150 животных) в дозах 15 и 10 мл с интервалом 24 часа.

При однократном введении сыворотки в испытанных дозах терапевтическая эффективность составила 86,6%, при двукратном - 98%. В контроле погибло 48% телят. С профилактической целью новорожденным телятам (150 животных) в первые сутки после рождения сыворотку вводили однократно, подкожно в дозе 5 мл. Однократное введение сыворотки профилактировало заболеваемость телят в 92% случаев, а в контроле заболело 16 (32%) телят из 50.

В 8 хозяйствах Алтайского края, неблагополучных по колибактериозу телят, испытали терапевтическую эффективность гипериммунной сыворотки, приготовленной в условиях ветеринарной лаборатории Шелаболихинского районного объединения ветеринарии. Телятам, с клиническими признаками колибактериоза, гипериммунную сыворотку вводили подкожно в дозе 15 мл, однократно. Всего лечению было подвергнуто 393 теленка, за которыми в течение 10 дней вели клинические наблюдения. Из 393 телят, подвергнутых лечению, выздоровело 371 (93%), а 28 пали. Улучшение клинического состояния телят отмечали уже на 2-3 сутки, а полное выздоровление отмечали на 5-7 сутки после введения им сыворотки.

В 6 хозяйствах, неблагополучных по колибактериозу, 970 телятам с профилактической целью гипериммунную сыворотку вводили также однократно, подкожно в дозе 10 мл на 3 день после рождения. Клинические наблюдения за телятами в течение 30 дней показали, что из опытных животных за это время заболели и пали от колибактериоза 96 телят, 944 теленка в течение срока наблюдения оставались клинически здоровыми.

На основании проведенных испытаний установлено, что профилактическая эффективность гипериммунной сыворотки составила 97,3%, а терапевтическая - 93,0%

Экономическая эффективность препарата складывается от сокращения сроков гипериммунизации животных, сроков эксплуатации продуцентов, затрат на изготовление антигенов, а также от лечебных и профилактических свойств бивалентной сыворотки, изготовленной по разработанной нами схеме гипериммунизации животных по сравнению с ранее применяемыми схемами иммунизации животных - продуцентов.

3. ВЫВОДЫ

1. Энтеротоксигенные *Escherichia coli* с адгезивными антигенами K99 и F41 широко распространены в хозяйствах Алтайского края, неблагополучных по массовым желудочно-кишечным заболеваниям новорожденных телят. Среди энтеротоксигенных изолятов эшерихий, полученных из биоматериалов телят, культуры с адгезивными антигенами K99 и F41 встречаются в 77,4% случаев (в отдельности K99 -57,7%, F41- 10,2% и в ассоциации K99 и F41 -9,5%).

2. Атенуированные штаммы *E. coli* K-18 и *E. coli* K-20 (K99 и F41 позитивные) обладают типичными культурально-биохимическими и антигенными свойствами, присущие этому виду.

3. Иммунизация животных вакцинами *E.coli* к-18 и *E.coli* K-20 вызывает доброкачественную местную и общую реакцию. Штаммы приживляются в организме животных до 14 суток, обеспечивая длительное иммунизаторное раздражение иммунокомпонентных органов, и не сопровождаются хроническим бактерионосительством. Полная элиминация вакцинных культур наступает к 21 суткам.

4. В опыте на белых мышках и телятах установлена высокая иммунизирующая активность живой вакцины из штамма *E. coli* K-18 и *E. coli* K-20 (соотношение 1:1). При подкожном введении белым мышам в дозе $1 \cdot 10^5$ м.к. и телятам в дозе $1,5 \cdot 10^9$ м.к. вакцина защищает 100% животных от заражения летальной дозой вирулентных культур *E.coli*. Для иммунизации коров и нетелей оптимальная доза бивалентной вакцины составляет 2,0 мл при однократном подкожном введении за 30-40 дней до отёла.

5. Формирование гуморального иммунитета у телят, иммунизированных живыми вакцинами, происходит на более высоком уровне ($P < 0,001$), чем у привитых формол-тиомерсальной вакциной. Титры антител в сыворотке крови телят, привитых опытной вакциной, к 14-21 дням в РА составляли 1: 400 - 1:1800, тогда как у телят привитых формол-тиомерсальной вакциной они в эти сроки равнялись 1:260 - 1:270 и 1:520 соответственно.

6. Иммунизация стельных коров ($n = 7136$) бивалентной вакциной из штаммов К-18 и К-20 в хозяйствах неблагополучных по колибактериозу предохраняет от заболевания 95,7% телят, полученных от них.

7. Разработанная схема гипериммунизации и методика получения высокоактивной бивалентной сыворотки против колибактериоза крупного рогатого, с использованием живых вакцинных штаммов эшерихий коли К-18 и К-20 сокращает сроки гипериммунизации животных-продуцентов в 2,7 раза, а количество затрачиваемого антигена в 36,3 раза.

8. Профилактическая эффективность бивалентной сыворотки на телятах в хозяйствах неблагополучных по колибактериозу при однократном подкожном введении в дозе 10 мл составила 96,7-99%, а терапевтическая при однократном введении в дозе 15 мл-86,85, при двукратном в дозе 15 и 10 мл с интервалом 24 час. - 93,0-98,3%.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Материалы диссертационной работы включены в методические рекомендации «Желудочно-кишечные болезни новорождённых телят в условиях Сибири», утверждённые НТС Управления ветеринарии администрации Алтайского края, протокол №3 от 25.02.2004г.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Колибактериоз молодняка сельскохозяйственных животных и совершенствование мер борьбы с данным заболеванием // Актуальные проблемы патологии животных и человека: Материалы научно-практич. конф.- Барнаул, 1996.- С.85-86.

2. Характеристика эшерихий, выделенных от павших телят в хозяйствах Шелаболихинского района Алтайского края // Соавт.: Н.Н Ахметсадыков, Б.Ш. Турсункулов, К.Б. Орынтаев // Ассоциативные инфекции сельскохозяйственных животных и новые подходы к их ликвидации и профилактике: Тезисы докладов науч. конф., посвященной 50-летию Алтайской НИВС- Барнаул, 1997.- С. 57- 58.

3. Обнаружение в изолятах эшерихий коли адгезивного антигена / Соавт.: Н.Н. Ахметсадыков, К.Б.Бияшев // Эпизоотология, диагностика, меры профилактики и борьбы с болезнями животных. Сб. науч.тр. / РАСХН. Сиб. отд-ние. ИЭВСИДВ.- Новосибирск, 1997.- С. 180-182.

4. Безвредность адгезивных вакцинных штаммов эшерихий коли на лабораторных животных / Соавт. Н.Н. Ахметсадыков, К.Б.Бияшев // Эпизоотология, диагностика, меры профилактики и борьбы с болезнями животных: Сб. науч. тр. / РАСХН. Сиб. отд-ние, ИЭВСИДВ.- Новосибирск, 1997.-С. 173-175.

5. Роль колострального иммунитета в специфической профилактике эшерихиоза телят / Соавт. Н.Н. Ахметсадыков // Эпизоотология, диагностика, меры профилактики и борьбы с болезнями животных: Сб. науч.тр. / РАСХН. Сиб. отд-ние. ИЭВСИДВ. - Новосибирск, 1997.- С.183-185.

6. Динамика общего белка у коров иммунизированных адгезивными штаммами эшерихий / Соавт. Н.Н. Ахметсадыков // Эпизоотология, диагностика, меры профилактики и борьбы с болезнями животных: Сб. науч. тр. / РАСХН. Сиб. отд-ние. ИЭВСИДВ.- Новосибирск, 1997.- С. 177-180.

**Подписано в печать 08. 04.2004 г. Формат 60 х 84 /16
Объем 1 п.л. Заказ № 103. Тираж 100 экз.**

**Отпечатано в типографии ИПЦ «Юпитер»
630501, НСО, п. Краснообск**

№ - 7415