

внутрішніх хвороб собак у м. Житомирі (повідомлення 2) / В.П. Фасоля // Вісник БДАУ. – Біла Церква, 2001. – Вип. 18. – С. 158–163. 14. Жирова гепатодистрофія у собак: діагностика і лікування: автореф. дис. канд. вет. наук: спец. 16.00.01 «Діагностика і терапія тварин» / Т. М. Гудима – Біла Церква, 2017. – 20 с. 15. Rothuizen J.T.S. Hepatitis in dogs; a review / J.T.S. Rothuizen // Tijdschr Diergeneesk. – 1998. – Vol. 123 (8). – P. 246–252. 16. Primary hepatitis in dogs: a retrospective review (2002–2006) / [J.H. Poldervaart, R.P. Favier, L.C. Penning et al.] // J. Vet. Intern. Med. – 2009. – Vol. 23 (1). – P. 72–80. 17. Гудима Т.М. Діагностика жирової гепатодистрофії і лікування собак службових порід у системі диспансеризації (методичні рекомендації) / Т.М. Гудима, Л.Г. Слівінська. – Львів, 2016. – 28 с.

Статья передана в печать 27.04.2017 г.

УДК 619:579.842.11

ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЭПИЗОТИЧЕСКИХ ШТАММОВ *ESCHERICHIA COLI* АДГЕЗИВНОГО СЕРОТИПА A20

Соловьёва А.В., Новикова О.Н., Ломако Ю.В., Дадашко С.В.

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

В статье изложены результаты изучения иммунобиологических особенностей эпизоотических штаммов *E. coli*, принадлежащих к одному серотипу A20. Изучены вирулентные, адгезивные, гемагглютинирующие, токсинообразующие и иммуногенные свойства штаммов. Несмотря на принадлежность эпизоотических штаммов *E. coli* к одному адгезивному серотипу-A20 выявлены существенные отличия в иммунобиологических свойствах. **Ключевые слова:** молодняк крупного рогатого скота, *E. coli*, токсинообразование, факторы патогенности, антиген.

STUDYING OF THE IMMUNOBIOLOGICAL PROPERTIES OF *ESCHERICHIA COLI* EPIZOOTIC STRAINS OF ADHESIVENESS SEROTYPE A20

Solovjova A.V., Novikova O.N., Lomako Y.V., Dadashko S.V.

Institute of experimental veterinary medicine of S.N. Vyshellessky, Minsk, Republic of Belarus

The article describes the results of a studying of immunobiological features of *E. coli* epizootic strains, belonging to the serotype A20. The features of virulent adhesive, gemagglutination, toxin-induction and immunogenic were studied. It was identified that all epizootic strains of *E. coli* belonging to the same serotype A20, differed in their immunobiological properties. **Keywords:** calves, *E. coli*, toxin formation, pathogenicity factors, antigen.

Введение. Колибактериоз (эшерихиоз) – остропротекающая зоонозная болезнь молодняка животных многих видов, которая проявляется общей интоксикацией и обезвоживанием организма, а также энтеритом, септицемией, поражением центральной нервной системы, иногда пневмонией и артритом [1].

Телята болеют эшерихиозом преимущественно в первые 2-7 дней жизни. Кроме того, колибактериоз может развиваться как вторичная инфекция на фоне поражения молодняка вирусами (рота-, корона- и др.), что приводит к более высокой заболеваемости и летальности [2].

Возбудителем колибактериоза являются патогенные штаммы *Escherichia coli*.

К факторам патогенности эшерихий относят: наличие способности к колонизации (адгезии) на поверхности бактериальной клетки, эндотоксинов, выработка экзотоксинов (термолабильного, термостабильного и др.), гемолизина, образование колицинов и др. [3].

Перечисленные факторы патогенности в естественных условиях действуют не изолированно, а комплексно, в совокупности обуславливая инфекционный процесс и вирулентность эпизоотических штаммов *E. coli*.

Фимбриальные факторы патогенности (F-антиген) являются поверхностными рецепторами, которые облегчают адгезию бактериальной клетки к эпителию нижних отделов тонкого кишечника и способствуют колонизации, а также определяют способность к токсинообразованию. Адгезия *E. coli* на специфических рецепторах энтероцитов является пусковым механизмом инфекционного процесса [4].

У энтеротоксигенных изолятов *E. coli* выделены и изучены более 17 типов фимбриальных адгезинов. У телят регистрируются штаммы эшерихий с адгезивными антигенами K88 (F4), K99 (F5), 987P (F6), F41, F18, A20 [5].

Учитывая ведущую роль факторов патогенности *E. coli* в развитии колибактериоза, разработан целый ряд тестов, позволяющих провести их идентификацию.

Одним из первых методов, позволивших идентифицировать у эшерихий специфические фимбрины, была реакция маннозрезистентной гемагглютинации [6].

Энтеротоксигенные *E. coli* в большинстве своем выделяют два основных вида токсинов: термолабильный энтеротоксин (LT) и термостабильный энтеротоксин (ST).

Существует множество токсикологических, иммунологических, генетических тестов для изучения токсинообразующей активности эпизоотических штаммов *E. coli*. К наиболее чувствительным тестам по определению токсинообразующей активности энтеротоксигенных штаммов *E. coli* относят ПЦР и ИФА.

Целью работы являлось изучение иммунобиологических особенностей эпизоотических штаммов *E. coli*, принадлежащих к одному серотипу A20.

Материалы и методы исследований. В работе использовали эпизоотические штаммы *E. coli* адгезивного серотипа A20, выделенные от телят 1,5-2-месячного возраста из разных животноводческих хозяйств Минской области в течение 2015-2016 гг. Изучено три эпизоотических штамма *E. coli*

A20 (1), (2), (3). В качестве сравнения использовали музейный штамм *E. coli* A20 (КМИЭВ-В39А) из коллекции микроорганизмов РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Фенотипическую идентификацию выделенных бактериальных штаммов проводили с помощью набора тест-сывороток для типирования адгезивных *Escherichia coli* F4 (K88), F5 (K99), F6 (987p), F41, A20-Att25 производства РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Изучали вирулентные свойства бактериальных штаммов *E. coli* A20 (1), (2), (3) и музейного штамма на белых мышах (массой 20-22 г) при внутрибрюшинном введении микробной взвеси соответствующей суточной бактериальной культуры в концентрации 5×10^8 микробных тел/мышь. Учитывали гибель мышей через 24 часа после введения бактериальных штаммов.

С целью изучения гемагглютинирующей активности бактериальных штаммов *E. coli* A20 осуществляли постановку реакции гемагглютинации (РГА) взвеси суточной бактериальной культуры *E. coli* A20 (1), (2), (3) и музейного штамма в концентрации $1,0 \times 10^8$ микробных тел/1 мл с 0,5% взвесью эритроцитов крупного рогатого скота в 0,85% растворе хлорида натрия (физиологический раствор). В качестве источника эритроцитов использовали стабилизированную кровь крупного рогатого скота, которую непосредственно перед постановкой РГА отмывали не менее 3 раз физраствором. РГА ставили в планшетах (96х) для иммунологических реакций. В каждую лунку вносили 0,1 мл 0,5% взвеси эритроцитов крупного рогатого скота. Отрицательным контролем служила смесь 0,1 мл 0,5% эритроцитов с 0,1 мл физраствора. РГА учитывали через 3 часа. Положительная РГА проявлялась в виде зонтика на дне лунки. Отрицательная РГА характеризовалась оседанием эритроцитов на дне лунки в виде компактной точки.

Оценку адгезивных свойств бактериальных штаммов в желудочно-кишечном тракте белых мышей определяли опосредованно по количеству специфических антител в крови животных на 14-е сутки после однократного внутрижелудочного введения соответствующего штамма в концентрации $5,0 \times 10^8$ микробных тел/мышь. Сыворотку крови белых мышей перед постановкой РА прогревали при 56°C в течение 30 минут. Постановку РА осуществляли в планшетах (96х) для иммунологических реакций. В 1-е лунки вносили соответствующую сыворотку крови и далее проводили последовательные двукратные разведения (\log_2) с физраствором. Затем в каждую лунку вносили гомологичный внутрижелудочному введению бактериальный штамм *E. coli* A20 (1), (2), (3) и музейный штамм в концентрации $1,0 \times 10^8$ микробных тел/1 мл. Отрицательным контролем служила смесь микробных клеток каждого штамма с физраствором. РА учитывали через 18 часов.

С целью изучения токсинообразующей активности эпизоотических штаммов *E. coli* A20 осуществляли постановку GM₁-ИФА [7].

Каждый используемый в работе бактериальный штамм *E. coli* A20 выращивали на МПА при 37°C в течение 24 часов, затем делали смыв физраствором и с помощью денситометра (Biovat, UE) доводили концентрацию до 1×10^9 микробных клеток/1 мл. 1 мл бактериальной взвеси вносили в 10 мл среды Мюнделя и культивировали при 37°C . За 2 часа до завершения культивирования в бульонную культуру добавляли линкомицин (45 мкг/мл), по завершении культивирования бульонную культуру центрифугировали при 8000 г в течение 12 минут. Полученный супернатант фильтровали через стерилизующие мембраны (0,22 мкм, Millex[®] GP). Бактериальный супернатант использовали для количественного определения ЛТВ с помощью GM₁-ИФА.

Микропланшеты сенсibilизировали моносиаловым ганглиозидом -GM₁ (Sigma) 0,5 мкг/мл в течение 18 часов при 20°C . Далее лунки обрабатывали 0,1%-ным раствором альбумина. Стандарт ЛТВ (Sigma) разводили в фосфатно-буферном растворе до концентрации 10 мкг/мл. Далее стандарт ЛТВ и каждый образец бактериального супернатанта вносили в соответствующие лунки в объеме 0,1 мл. В качестве отрицательного контроля в лунки добавляли среду Мюнделя в разведении 1:1 (0,1 мл/лунку). Инкубировали в течение 60 минут при 37°C . Затем добавляли кроличьи поликлональные анти-ЛТВ сыворотки в разведении 1:64 в объеме 0,1 мл/лунку, инкубировали 60 минут при 37°C . Антитела к IgG кролика (HRP) (Thermoscientific) в разведении 1:5000 вносили в объеме 0,1 мл/лунку на 60 минут при 37°C . После каждого этапа реакции лунки промывали не менее 3 раз фосфатно-буферным раствором с Твином. На заключительном этапе вносили ТМВ-субстрат 0,1 мл/лунку. Реакцию останавливали 2M H₂SO₄ и результаты учитывали на спектрофотометре (Bio-Rad: MarkMicroporeReader) при длине волны 450 нм.

Иммуногенную активность образцов антигена, изготовленных из инактивированных формалином бактериальных штаммов *E. coli* A20 (1) и музейного штамма, определяли на морских свинках массой 250-300 г. Каждый антиген соединяли с адьювантом Montanide ISA-206 (Seppic) в соотношении 1:1 (количество антигена в каждом образце составило $0,5 \times 10^9$ микробных тел/1 мл) и вводили подкожно морским свинкам в объеме 1,0 мл. Через 21 сутки после введения образцов у животных отбирали кровь и в сыворотке крови в РА определяли количество специфических антител к гомологичному и гетерологичному иммунизации штаммам *E. coli* A20.

Статистическую обработку полученных цифровых данных проводили с помощью критерия Стьюдента [8] для независимых выборок.

Результаты исследований. При изучении в сравнительном аспекте степени вирулентности эпизоотических штаммов *E. coli* A20 на белых мышах выявлено, что наибольшей вирулентной активностью обладали бактериальный штамм (1) и музейный штамм (таблица 1).

Таблица 1 – Вирулентные свойства эпизоотических штаммов *E. coli* A20

Штаммы <i>E. coli</i> A20	Значение LD ₁₀₀ для белых мышей
1	< 5×10^8 микробных тел/мышь
2	> 5×10^8 микробных тел/мышь
3	> 5×10^8 микробных тел/мышь
Музейный штамм	< 5×10^8 микробных тел/мышь

Поскольку вирулентные свойства *E. coli* A20 определяют факторы патогенности, представлялось целесообразным изучить гемагглютинирующую активность, токсинообразующие свойства и степень адгезии к клеткам желудочно-кишечного тракта эпизоотических штаммов *E. coli* A20.

В РГА с 0,5% взвесью эритроцитов крупного рогатого скота установлены различия в гемагглютинирующей активности бактериальных штаммов (таблица 2).

Таблица 2 – Гемагглютинирующая активность эпизоотических штаммов *E. coli* A20

Штаммы <i>E. coli</i> A20	Результаты РГА, Log ₂
1	4
2	1
3	0
Музейный штамм	3

По результатам количественной РГА наибольшей гемагглютинирующей активностью обладал штамм *E. coli* A20 (1).

При изучении токсинообразующих свойств эпизоотических штаммов *E. coli* A20 в постановке GM₁-ИФА также выявлены отличия в токсинообразующей активности штаммов (таблица 3).

Таблица 3 – Определение термолабильного токсина В-субъединица в супернатанте бактериальных культур

Штаммы <i>E. coli</i> A20	Результат GM ₁ -ИФА, OD (M±m)
Отрицательный контроль (Среда Мюнделя:ФР, 1:1)	0,08±0,007
Положительный контроль, ЛТВ(1 мкг/лунку)	0,529±0,039
1	0,413±0,089
2	0,155±0,044
3	0,09±0,012
Музейный штамм	0,308±0,039

При внутрижелудочном введении мышам суспензии жизнеспособных бактерий также выявлены отличия в количестве специфического IgG в крови подопытных животных (таблица 4).

В выборке мышей до введения бактериальных клеток не выявлены фоновые антитела к *E. coli* A20.

Следует предположить, что выявленные отличия в специфическом иммунном ответе являются результатом различной степени адгезии бактериальных клеток к энтероцитам желудочно-кишечного тракта мышей.

На завершающем этапе исследовательской работы определены иммуногенные свойства наиболее вирулентных штаммов *E. coli* A20 при их парентеральном введении морским свинкам (таблица 5). По условиям эксперимента в РА определяли титры специфических антител к гомогенному и гетерогенному иммунизации антигенам *E. coli* A20. Наиболее выраженная перекрестная активность специфических антител в отношении к гетерогенному иммунизации антигену наблюдалась в группе животных, иммунизированных музейным штаммом. При этом титры специфических антител к гомогенному иммунизации антигену в обеих группах иммунизированных животных практически не различались.

Таблица 4 – Количество специфического IgG в крови мышей через 14 суток после внутрижелудочного введения бактериальных штаммов (M±m)

Штаммы <i>E. coli</i> A20	Количество специфического IgG в сыворотке крови, (log ₂)
1	6,2±0,2
2	4,4±0,3
3	3,9±0,2
Музейный штамм	5,4±0,5

Примечание. В каждой группе n=5.

Таблица 5 – Значение титров специфических антител в крови иммунизированных морских свинок (M±m)

Образец моновакцины <i>E. coli</i> A20	Результат РА(log ₂)	
	Музейный штамм	<i>E. coli</i> A20 (1)
Музейный штамм	8,3±0,4	7,6±0,3
<i>E. coli</i> A20 (1)	3,2±0,3	8,6±0,5

Примечание. В каждой группе n=3.

В выборке морских свинок перед введением образцов моновакцины не выявлены фоновые антитела к *E. coli* A20.

Заключение. 1. Эпизоотические штаммы *E. coli* A20 характеризовались разной степенью вирулентности для белых мышей. Для штамма *E. coli* A20 (1) и музейного штамма доза LD₁₀₀ составляла менее 5x10⁸ микробных тел/мышь.

2. Степень вирулентности бактериальных штаммов коррелировала с проявлением факторов патогенности; штамм *E. coli* A20 (1) и музейный штамм обладали наиболее выраженной гемагглютинирующей активностью, токсинообразующими свойствами и иммуногенной активностью при внутрижелудочном введении животным.

3. Изучение иммуногенной активности инаktivированных бактериальных штаммов при парентеральном введении выявило наиболее широкий спектр антигенной вариабельности музейного штамма. Выявленные антигенные особенности музейного штамма дают основание для его включения в состав вакцинных препаратов для специфической профилактики колибактериоза.

Литература. 1. Инфекционные болезни животных / Б. Ф. Бессарабов [и др.]; под ред. А. А. Сидорчука. – Москва : КолосС, 2007. – 671 с. 2. Апатенко, В. М. Смешанные инфекции сельскохозяйственных животных / В. М. Апатенко. – 2-е изд. – Киев : Урожай, 1990. – 176 с. 3. Wilshew, G. A. Genetic and molecular studies of plasmids coding for colonization factor antigen I and heat-stable enterotoxin in several *E. coli* serotypes / G. A. Wilshew [et al.] // *J. Inf Immun.* – 1992. – Vol. 37, № 3. – P. 858 – 868. 4. Головки, А. Н. Антигенная вариабельность фимбриальных адгезинов *E. coli* / А. Н. Головки // *Ветеринария.* – 1997. – № 8. – С. 23 – 25. 5. Максимович, В. В. Определение адгезивных антигенов *Escherichia coli*, выделенная от телят, в Республике Беларусь / В. В. Максимович [и др.] // *Проблемы повышения эффективности производства животноводческой продукции: тезисы докладов международной научно-практической конференции.* – Жодино, 2007. – С. 353 – 355. 6. Дворкин, Г. Л. Реакция маннозрезистентной гемагглютинации для диагностики колиэнтерита новорожденных телят / Г. Л. Дворкин // *Вестн АН БССР.* – 1987. – № 3. – С. 112 – 114. 7. Новикова, О. Н. GM1-ИФА для количественного определения термолabileного токсина В субъединицы энтеротоксигенных штаммов *E. Coli*. / О. Н. Новикова, Ю. В. Ломако, А. И. Пукшилиц // *Международная научно-практическая конференция, посвященная 45-летию института : материалы международной научно-практической конференции, 27–28 ноября 2014 г. / «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности».* – Щелково, 2014. – С. 204 – 207. 8. Биометрия / Лакин Г. Ф. // М.: – «Высш. школа». – 1980. – 293 с.

Статья передана в печать 05.05.2017 г.

УДК 619:616.34-008.87:636.2.053:612.1

ДИНАМИКА МОРФОЛОГИЧЕСКИХ И БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ ПРИ КОМПЛЕКСНОМ ЛЕЧЕНИИ ДИСБИОЗОВ ТЕЛЯТ

Сыса С.А.

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

*Изучено влияние на гематологические и биохимические показатели крови молодняка крупного рогатого скота про- и пребиотических препаратов, применяемых при комплексном лечении ассоциативных паразитозов желудочно-кишечного тракта. У больных телят было установлено нарушение обменных процессов, что свидетельствует о развитии патологического процесса в организме животных. В результате применения комплексного лечения наблюдалось восстановление обмена веществ. Наилучший эффект показало применение противопаразитарного препарата в сочетании с растительным пребиотиком и пробиотиком. **Ключевые слова:** ассоциация, паразит, дисбактериоз, молодняк крупного рогатого скота, показатели крови, растительный пребиотик, пробиотик.*

DYNAMICS OF MORPHOLOGICAL AND BIOCHEMICAL INDICES OF THE COMPLEX TREATMENT OF DYSBIOSIS OF CALVES

Sysa S.A.

Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Republic of Belarus

*The effect on haematological and biochemical indicators at young cattle blood of proand prebiotic preparations used in the complex treatment of associative parasitosis of the gastrointestinal tract was studied. In patients-calves a metabolic disorder was found, which indicates the development of a pathological process in the animal body. As a result of the use of complex treatment, metabolism was restored. The best effect was shown by the use of an antiparasitic medicine in combination with a plant prebiotic and a probiotic. **Keywords:** association, parasite, dysbacteriosis, young cattle, blood counts, plant prebiotic, probiotic.*

Введение. За последние десятилетия в Республике Беларусь резко возросла зараженность крупного рогатого скота заболеваниями инвазионной этиологии, которые наносят значительный экономический ущерб, складываясь из снижения живой массы, молочной продуктивности, вынужденного убоя, затрат на содержание, кормление и лечение больных животных [9].

Чаще всего из паразитарных болезней молодняка крупного рогатого скота обнаруживаются инвазии желудочно-кишечного тракта. Желудочно-кишечный тракт животных - это место обитания различных микроорганизмов, таких как бактерии, вирусы, микромицеты, простейшие и др. Часть микроорганизмов не оказывают существенной роли в процессах пищеварения животных, являясь облигатной микрофлорой, однако ряд микроорганизмов играют непосредственную роль в процессах пищеварения (лактобактерии, бифидобактерии и др.). Микробиоценоз кишечника - система очень динамичная и способная к резкому изменению, особенно в сторону снижения уровня нормофлоры и повышению уровня условно-патогенной микрофлоры. Причинами данных изменений чаще являются: нарушение в