

заболевших и павших животных среди болезней бактериальной этиологии. Показатель летальности при этой болезни составляет от 35 до 44,8%.

Применяемые вакцины для специфической профилактики колибактериоза (эшерихиоза) телят, селекция которых основана на подборе вакцинных штаммов по О-антигену, не обладают достаточной профилактической эффективностью, что подтверждается значительным процентом выделения эшерихий с этиологической структурой, гомологичной соматическим антигенам в составе вакцин.

Необходимость изыскания новых путей повышения качества проводимой специфической профилактики колибактериоза телят подтверждается тем, что 46,83% бактериальных культур, выделенных при эшерихиозе, не типизируются с О-кописыворотками, входящими в диагностический набор, при этом зачастую обладают наличием адгезинов – факторов патогенности возбудителя болезни.

Наличие адгезивных антигенов у энтеропатогенных эшерихий со всеми типами фимбрий, типизируемых антиадгезивными сыворотками, указывает на необходимость их включения в составы конструируемых биопрепаратов, предназначенных для специфической профилактики колибактериоза (эшерихиоза) молодняка крупного рогатого скота.

Литература. 1. Диагностика, лечение, профилактика и меры борьбы с желудочно-кишечными болезнями молодняка крупного рогатого скота инфекционной этиологии : рекомендации / Н. В. Синица [и др.]. – Витебск : УО ВГАВМ, 2019. – 68 с. 2. Жуков, М. С. Причины выбытия молодняка крупного рогатого скота на предприятиях молочного и мясного направления / М. С. Жуков // Актуальные проблемы лечения и профилактики болезней молодняка : материалы Международной научно-практической конференции, 28-31 октября 2018 г., г. Витебск. – Витебск : ВГАВМ, 2018. – С. 17-21. 3. Изучение иммунобиологических свойств эпизоотических штаммов *Escherichia coli* адгезивного серотипа А20 / А. В. Соловьева [и др.] // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал. – Витебск, 2017. – Т. 53, вып. 2. – С. 142–145. 4. Ламан, А. М. Современные аспекты специфической профилактики вирусно-бактериальных пневмоэнтеритов телят крупного рогатого скота / А. М. Ламан, Г. А. Тумилович // Современные технологии сельскохозяйственного производства : сборник научных статей по материалам XXI Международной научно-практической конференции (г. Гродно, 18 мая 2018 г.). – Гродно : ГГАУ, 2018. – С. 52-56. 5. Механизмы функционирования иммунной системы желудочно-кишечного тракта животных / В. В. Малашко [и др.] // Сельское хозяйство – проблемы и перспективы : сборник научных трудов. – Гродно : ГГАУ, 2017. – Т. 36. – С. 91-105. 6. Медведев, А. П. Получение поливалентной ассоциированной сыворотки против колибактериоза (эшерихиоза) и сальмонеллеза крупного рогатого скота / А. П. Медведев, А. А. Вербицкий, Д. Б. Кулешов // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал. – Витебск, 2019. – Т. 55, вып. 5. – С. 57–61. 7. Молодняк крупного рогатого скота : кормление, диагностика, лечение и профилактика болезней : монография / Н. И. Гавериченко [и др.]. – Витебск : ВГАВМ, 2018. – 288 с. 8. Оценка биологических свойств производственных штаммов эшерихий, предназначенных для получения специфического антигена / А. П. Медведев [и др.] // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал. – Витебск, 2018. – Т. 54, вып. 3. – С. 26–29. 9. Оценка эпизоотической ситуации по инфекционным энтеритам телят в хозяйствах Витебской области / П. А. Красочко [и др.] // Ветеринарный журнал Беларуси. – 2018. - № 2 (9). – С. 35-39. 10. Прудников, В. С. Патоморфологическая диагностика болезней телят при моно- и ассоциативном течении / В. С. Прудников // Актуальные проблемы лечения и профилактики болезней молодняка : материалы Международной научно-практической конференции, 28-31 октября 2018 г., г. Витебск. – Витебск : ВГАВМ, 2018. – С. 44-46. 11. Средства специфической профилактики инфекционных болезней крупного рогатого скота и свиней : практическое пособие / П. А. Красочко [и др.]. – Минск : ИВЦ Минфина, 2018. – 368 с. 12. Таранда, Н. И. Чувствительность возбудителей смешанных бактериальных инфекций к антимикробным средствам / Н. И. Таранда, Е. Г. Смолей // Современные технологии сельскохозяйственного производства : материалы XXIII Международной научно-практической конференции, г. Гродно, 15 мая 2020 г. – Гродно : ГГАУ, 2020. – С. 74-76. 13. Яромчик, Я. П. Анализ отчетности ветеринарных диагностических учреждений Республики Беларусь по инфекционным энтеритам телят / Я. П. Яромчик // Молодые ученые – науке и практике АПК : материалы Международной научно-практической конференции молодых ученых, г. Витебск, 5-6 июня 2018 г. – Витебск : ВГАВМ, 2018. – С. 47-49.

Поступила в редакцию 18.09.2020.

УДК 619:615.371

РАЗРАБОТКА ОПТИМАЛЬНЫХ СПОСОБОВ КОНСЕРВИРОВАНИЯ, СЕДИМЕНТАЦИИ И ФИЛЬТРАЦИИ ГИПЕРИММУННОЙ СЫВОРОТКИ

*Максимович В.В., *Дремач Г.Э., **Шашкова Ю.А., *Гайсенюк С.Л., *Гайсенюк Е.Л.

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

**ОАО «БелВитунифарм», г.п. Должа, Витебская обл., Республика Беларусь

В статье приведены оптимальные способы консервирования, седиментации и фильтрации гипериммунной сыворотки. **Ключевые слова:** гипериммунная сыворотка, специфическая профилактика, консервирование, седиментация, фильтрация.

DEVELOPMENT OF THE OPTIMAL SCHEMES OF PRESERVATION, SEDIMENTATION AND FILTRATION OF THE HYPER IMMUNE SERUM

*Maksimovich V.V., *Dremach G.E., **Shashkova Y.A., *Gaisenok S.L., *Gaisenok E.L.

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

**BelVituunifarm, Dolzha, Vitebsk region, Republic of Belarus

In the article the optimal schemes of preservation, sedimentation and filtration of the hyper immune serum have been provided. **Keywords:** hyper immune serum, specific prophylactic, preservation, sedimentation, filtration,.

Введение. В животноводческих хозяйствах Республики Беларусь инфекционные болезни молодняка крупного рогатого скота первых дней жизни, такие как: эшерихиоз, клебсиеллез, протеоз, рота-, коронавирусная инфекции - имеют значительное распространение. На их долю в Республике Беларусь приходится до 80% неблагополучных пунктов, число которых увеличивается с каждым годом [1, 4].

В борьбе с указанными инфекционными болезнями большое значение имеют специфические препараты, предназначенные для профилактики и лечения животных. С этой целью применяют гипериммунные сыворотки. Характерной особенностью сывороточных биопрепаратов является специфичность их действия, направленность против конкретного возбудителя [2, 6].

Лечебно-профилактические гипериммунные сыворотки содержат готовые антитела, поэтому пассивный иммунитет у животных наступает практически мгновенно при их введении [3]. Ценность сывороток заключается еще и в том, что сывороточные белки пополняют организм энергетическими и пластическими веществами, оказывают неспецифическое действие на организм, повышают его тонус, стимулируют иммунные факторы защиты и способствуют более быстрому выздоровлению больного животного в сравнении с традиционно применяемыми схемами лечения, включающими использование antimicrobial препаратов, средств симптоматической и патогенетической терапий [5].

Основные вопросы промышленного производства гипериммунных сывороток заключаются в увеличении выходов сывороток из крови, в применении надежных консервантов, в сокращении срока отстоя препарата, способа извлечения из него балластных белков и липидов [1].

Целью наших исследований явилась разработка оптимальных способов консервирования, седиментации и фильтрации гипериммунной сыворотки для терапии и профилактики инфекционных болезней телят первых дней жизни.

Материалы и методы исследований. Работа выполнялась на базе вивария и отделения контроля качества (ОКК) ОАО «БелВитунифарм». На предварительном этапе работы нами была предложена и испытана схема гипериммунизации, заключающаяся в 4-х внутрибрюшинных инъекциях каждого антигена. Концентрированные антигены (АГ) готовили следующим образом:

- АГ 1 – бактериальная масса *Klebsiella pneumonia* и *Proteus mirabilis*, концентрация микробных тел - 3,5 млрд в 1 см³. Концентрацию микробных тел определяли при помощи денситометра.

- АГ 2 – бактериальная масса *Escherichia coli* Att-25 – A20, K88, K99, 987P, F41, концентрация микробных тел - 3,5 млрд в 1 см³.

- АГ 3 инактивированный сорбированный против рота- и коронавирусной инфекций крупного рогатого скота.

Схема гипериммунизации волов-производителей имела следующий вид: количество инъекций – 4, интервал – 7 суток, доза – 5, 10, 15, 20 см³. Все инъекции внутрибрюшинные. Продолжительность цикла по данной схеме - 21 день.

Забор крови и получение нативной сыворотки осуществляли через 10 дней после окончания цикла гипериммунизации. При взятии крови учитывали реакцию производителей на ее потерю. Кровь брали из яремной вены в градуированные пластмассовые технологические емкости объемом 15-20 л по 7-8 литров с животного. Для предохранения крови от свертывания применяли антикоагулянт – раствор натрия лимоннокислого 10% (на 1 л крови - 34 см³ раствора).

Дальнейшая промышленная обработка гипериммунной сыворотки состояла из фильтрации через марлевый фильтр и сепарации для отделения форменных элементов. В последующем полученную плазму перекачали по трубопроводам в дефибринатор. Для отделения фибрина добавляли раствор кальция хлорида 60%. Процесс дефибрикации длился 25-30 минут. Полноту перевода фибриногена в фибрин контролировали следующим образом. В пробирку наливали 7-8 см³ испытуемой сыворотки и 5-6 см³ насыщенного раствора хлористого кальция, смесь тщательно встряхивали и отстаивали 10-15 минут. Прозрачность смеси являлась свидетельством перехода фибриногена в фибрин.

Дальнейшие исследования нами были направлены на определение оптимальной схемы консервирования, способа седиментации сыворотки и ее фильтрации.

Для разработки оптимальной схемы консервирования нами были использованы 2 части сыворотки объемом по 1 литру.

В качестве консервантов использовали раствор фенола концентрацией 4,8-5,2% и мертиолят натрия.

В одну часть сыворотки раствор фенола добавляли до концентрации его в биопрепарате до 0,5%, т.е. на 1 л сыворотки добавили 115 см³ раствора.

Во вторую часть сыворотки мертиолят натрия добавляли до концентрации 0,03%.

После окончания консервации от каждой партии сыворотки были взяты пробы и подвергнуты контролю в виварии отделения контроля качества ОАО «Белвитунифарм» на белых мышах массой 18-20 г.

Для оценки влияния различных консервантов на качество гипериммунной сыворотки использовали 2 группы лабораторных животных (n=10).

Белым мышам первой группы подкожно вводили гипериммунную сыворотку, подвергнутую консервации раствором фенола, в дозе 0,5 см³.

Лабораторным животным второй группы вводили подкожно сыворотку, консервированную мертиолятом натрия, в дозе 0,5 см³.

За животными обеих групп вели клиническое наблюдение в течение 10 суток. При этом оценивали их подвижность, прием корма и воды, общее состояние, реакцию в месте введения сыворотки.

Следующими этапами в приготовлении гипериммунной сыворотки были седиментация и фильтрация сыворотки.

Для выполнения первой части этапа сыворотку крови помещали в седиментатор. Определяли pH сыворотки и доводили показатель до 7,8-8,5.

В процессе совершенствования технологической схемы производства сыворотки нами изучено 2 варианта седиментации биопрепарата. В первом варианте сыворотка отстаивалась естественным путем в течение 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 и 100 суток при температуре 2, 8, 12 и 15⁰С.

Во втором варианте в сыворотку был добавлен полиэтиленгликоль 4 (ПЭГ-4) из расчета на 1 л сыворотки 0,05 кг вещества для более быстрого осаждения нестойких белков. Для полного растворения порошкообразного ПЭГ-4 сыворотку перекачивали в передвижной реактор, оборудованный мешалкой объемом 100 л. Мешалку оставляли работающей 25-30 минут. Затем сыворотку подвергали отстою в реакторе в течение 3-4 дней.

По истечении срока отстоя испытуемую сыворотку подвергали грубой, осветляющей и стерилизующей фильтрации. Грубая фильтрация проводилась через картон марки КФМ, осветляющая фильтрация – через картон марки КФО-2; стерилизующая фильтрация – через фильтр «Sartobran-P» с размером пор 0,22 мкм.

Испытания сывороток с различной степенью очистки проводили в виварии ОКК ОАО «БелВитунифарм» на лабораторных животных. С этой целью использовали белых мышей массой 18-20 г.

Для проведения исследований было сформировано 3 группы лабораторных животных (n=10).

Белым мышам первой опытной группы вводили подкожно нативную гипериммунную сыворотку в дозе 0,5 см³.

Животным второй группы подкожно вводили сыворотку, прошедшую грубую и осветляющую фильтрацию, в дозе 0,5 см³.

Лабораторным животным третьей группы подкожно вводили сыворотку, прошедшую стерилизующую фильтрацию, в дозе 0,5 см³.

За подопытными животными вели клиническое наблюдение в течение 10 суток с определением общего состояния организма.

Результаты исследований. Результаты исследований, направленных на изучение влияния различных консервантов на качество гипериммунной сыворотки на лабораторных животных, показали, что все белые мыши первой группы (подвергнуты обработке гипериммунной сывороткой, подвергнутой консервации раствором фенола) оставались клинически здоровыми, обладали активной подвижностью, хорошо принимали корм и воду.

У 4 лабораторных животных второй группы, обработанных сывороткой, консервированной мертиолятом натрия, отмечали негативные явления со стороны организма. У них были абсцессы в месте введения, повышена местная температура. Они группировались в кучу, были мало подвижными. Корм и воду принимали неохотно. У остальных мышей данной группы отмечалось незначительное угнетение. Аппетит у них был пониженным. Движение сопровождалось периодами залеживания.

Затем определяли количество общего белка в сыворотке, содержание кальция, концентрацию фенола и водородных ионов (pH). Для фракционирования использовали сыворотку с содержанием белка не менее 6,8%, кальция – 0,29-0,33 мг%, фенола – 0,45-0,5%. Показатель pH сыворотки доводили до 7,8-8,5.

Испытания способов седиментации сывороток показали следующие результаты. Сыворотки, подвергнутые отстаиванию естественным путем в течение 20, 30, 40, 50 и 60 суток при диапазоне температур от 2 до 15⁰С, сохраняли свои свойства.

При отстаивании более продолжительный срок сыворотка теряла свою активность, в ней активно развивались окислительные процессы, что повышает вероятность обсеменения ее различными микроорганизмами.

В реакторе, в котором происходило отстаивание сыворотки, в которую был добавлен ПЭГ-4, в течение 3-4 суток, на дне образовывался плотный белковый осадок. Надосадочная жидкость,

декантированная из реактора с помощью сифона, обладала невысокой активностью. По результатам исследований был сделан вывод, что добавление ПЭГ-4 усложняет процесс изготовления препарата, способствует увеличению его конечной стоимости и от седиментации химическим способом решено было отказаться.

Испытания сывороток, подвергнутых разной фильтрации, на лабораторных животных показали следующие результаты. Белые мыши первой (применяли нативную сыворотку) и второй (применяли сыворотку, прошедшую грубую и осветляющую фильтрацию) групп пали в результате анафилактических изменений на 2-3 и 3-5 сутки наблюдения соответственно. Мыши третьей подопытной группы, которым вводили сыворотку, подвергнутую стерилизующей фильтрации, оставались клинически здоровыми, подвижными, охотно принимали корм и воду, со стороны организма животных не наблюдалось негативных явлений.

Кроме этого, было установлено, что нативная сыворотка и сыворотка, прошедшая грубую и осветляющую фильтрацию, оставались мутными и, несмотря на ряд подготовительных этапов, содержала грубые механические включения.

Проведенная работа позволила нам изготовить конечный продукт со следующими характеристиками:

Сыворотка поливалентная для профилактики и лечения при инфекционных болезнях телят первых дней жизни представляет собой сыворотку крови волов-производителей, полученную после гипериммунизации инактивированными антигенами *Klebsiella pneumonia*, *Proteus mirabilis*, *E. coli* серогрупп K88, K99, 987P, F41, рота- и коронавирусной инфекций крупного рогатого скота.

По внешнему виду сыворотка представляет собой опалесцирующую жидкость от светло-красного до темно-коричневого цвета. В процессе хранения допускается образование жироподобной пленки и незначительного осадка серо-белого цвета, легко разбивающегося при встряхивании.

Сыворотку применяют телятам первых дней жизни для иммунокоррекции и создания пассивного иммунитета против возбудителей эшерихиоза, протеоза, клебсиеллеза, рота- и коронавирусной инфекций крупного рогатого скота.

Сыворотка безвредная и ареактогенная, обладает лечебными и профилактическими свойствами. Пассивный иммунитет после введения сыворотки у животных сохраняется 10-14 суток.

Для профилактики инфекционных болезней телят первых дней жизни сыворотку вводят подкожно или внутримышечно. Возможно применение сыворотки в виде аэрозолей, внутривентриально или выпаивание новорожденным телятам с молозивом.

Для лечения больных телят первых дней жизни сыворотку вводят подкожно или внутримышечно. Допускается применение сыворотки в виде аэрозолей. Суточную лечебную дозу сыворотки следует вводить в 2-3 приема с интервалом 3-4 ч, что обеспечивает лучший терапевтический эффект.

Применение сыворотки сочетают с применением противовирусных, антибактериальных и иммуностимулирующих средств.

Таким образом, получение гипериммунных сывороток – сложный, поэтапный процесс, направленный на антигенное раздражение организма, с целью получения максимальной ответной иммунной реакции. Большое значение, оказывающее влияние на специфическую активность гипериммунных сывороток, имеют схема гипериммунизации, дозы антигенов, способы их введения. Особое внимание следует уделить способам консервации, седиментации и фильтрации.

Заключение. Гипериммунная сыворотка, подвергнутая глубокой степени очистки (стерилизующей фильтрации), не вызывает у лабораторных животных клинических изменений. Для консервирования сыворотки целесообразно применять раствор фенола, а седиментацию проводить естественным путем в течение 20-60 дней при температуре 2-15⁰С.

Литература. 1. Медведев, А. П. Противобактериальные лечебно-профилактические сыворотки / А. П. Медведев. – Витебск : УО ВГАВМ, 2007. – 379 с. 2. Разработка теоретических подходов для получения и применения гипериммунных сывороток животных / В. В. Максимович [и др.] // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал. – Витебск, 2019. – Т. 55, №3. – С. 61–64. 3. Сывороточные и вакцинные препараты для профилактики и терапии инфекционных заболеваний животных / Е. В. Сусский [и др.]. – Армавир, 2013. – 338 с. 4. Эпизоотическая ситуация по инфекционным болезням телят первых дней жизни в Республике Беларусь / В. В. Максимович [и др.] // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства. – 2019. - № 22-2. – С. 195-201. 5. Эпизоотология с микробиологией : учебник / В. В. Максимович [и др.] ; под ред. В. В. Максимовича. – Минск : РИПО, 2017. – 543 с. 6. Питательная среда для производственного выращивания эшерихий / В. В. Зайцев, А. В. Зайцева, Г. Э. Дремач, Р. Б. Корочкин // Ученые записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины» : научно-практический журнал. – Витебск, 2015. – Т. 51, вып. 2. – С. 35–38.

Поступила в редакцию 22.09.2020.