

5. Allan Grodon M., Phenix K.V., Todd D., McNulty M.S. Some biological and physico-chemical properties of porcine circovirus // *Journal of Veterinary Medicine. Series B*, 1994. - 41: 1. – C. 17-26.
6. Calsamiglia M. et al. Detection of of porcine circovirus type 1 and 2 in serum and tissue samples of pigs and without Postweaning Multisystemic Wasting Syndrome // *J. of Clinical Microbiology*. 2002.-Vol. 40, №5.-P. 1848-1850.
7. Irshad M, Joshi Y.K., Sharma Y, I Dhar. Transfusion transmitted virus: A review on its molecular characteristics and role in medicine. *World J. Gastroenterology* 2006. 28. -12(32). - 5122-5134.
8. McNeilly F., McNair I., Mackie D.P., Meehan B.M., Kennedy S., Moffet D., Ellis J., Krakowka S., Allan G.M Production, characterization and applications of monoclonal antibodies to porcine circovirus 2// *Arch. Virol.*, 2001. –146. - №5: P.909-922.
9. Meehan B.M. et al. Isolation and characterization of porcine circovirus-2 from cases of sow abortion and porcine dermatitis and nephropathy syndrome // *Arch. Virol.*, 2001.-Vol. 146. - №4.- P. 835-842.
10. Okamoto Hiroaki, Masaharu Takahashi, Tsutomu Nishizawa, Akio Tawara, Katsuhiko Fukai, Umetero Muramatsu, Yoshihisa Naito and Akira Yoshikawa. Genomic characterization of TT viruses (TTVs) in pigs, cats and dogs and their relatedness with species-specific TTVs in primates and tupaias // *Journal of General Virology*, 2002. – 83. – P. 1291–1297.
11. Ticher I., Bode L., Peters D. et al. Distribution of antibodies to porcine circovirus in swine populations of different breeding farms // *Arch. Virol*, 1995.-Vol.140.- P. 737-743.

## **ПОДБОР ШТАММОВ ESCHERICHIA COLI И РОТАВИРУСОВ ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ И ЭШЕРИХИОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

*П.А.Красочко, Ю.В.Ломако, Я. П.Яромчик*

Научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии  
им. С.Н. Вышелесского, Минск, Республика Беларусь;  
Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия  
ветеринарной медицины, Витебск

Успешное развитие животноводческих хозяйств невозможно без создания стойкого благополучия по инфекционным болезням, в частности, по болезням молодняка крупного рогатого скота.

К наиболее распространенным заболеваниям у крупного рогатого скота следует отнести ротавирусную инфекцию и эшерихиоз. Ротавирусная инфекция у новорожденных телят наиболее часто протекает в виде ассоциации с

эшерихиозом. В этих случаях летальность достигает 100%. Эшерихиоз в Республике Беларусь по количеству неблагополучных пунктов заболевших и павших животных занимает первое место [1, 3, 5].

В комплексе мероприятий по профилактике и ликвидации ротавирусной инфекции и эшерихиоза телят важная роль принадлежит специфической профилактике. Сложность специфической профилактики эшерихиоза заключается в значительной антигенной вариабельности возбудителей, что делает маловероятным совпадение антигенных структур вакцинных и эпизоотических штаммов, что снижает эффективность биопрепаратов, сконструированных путем подбора культур по одному или нескольким антигенным комплексам [2, 3, 4, 5].

На основании результатов исследований отечественных и зарубежных ученых установлено, что выделенные эпизоотические штаммы *Escherichia coli* чаще всего обладают адгезивными антигенами [2, 3, 4].

Использование фимбриальных адгезинов в составе вакцин позволяет не допустить проявления инфекционного процесса на самых начальных этапах развития болезни, что способствует повышению профилактической эффективности вакцин [2, 4].

Целью данной работы было провести селекцию и подбор полевых и вакцинных штаммов *E.coli*, содержащих адгезивные антигены, и ротавирусы, изучить их антигенную активность.

**Материалы и методы.** Подбор штаммов *E.coli* и ротавирусов проводили путем выделения возбудителей из патологического материала от телят, взятых в ряде хозяйств Минской и Брестской областей Республики Беларусь, а также сравнения их с референтными штаммами бактерий и вирусов.

Выделение и идентификацию *E.coli* проводили в соответствии с «Методическими указаниями по бактериологической диагностике колибактериоза животных», утвержденных ГУВ МСХ СССР 12 декабря 1991г. Бактериологические исследования по диагностике колибактериоза телят были направ-

лены на выделение чистой культуры возбудителя, изучение ее морфологических, тинкториальных, ферментативных и адгезивных свойств с последующим определением серотиповой принадлежности и патогенности выделенных культур (биопроба на белых мышах). Выделение штаммов *E.coli* проводилось по общепринятым бактериологическим тестам с использованием питательных сред (мясо-пептонный агар, мясо-пептонный бульон, среда Эндо, среда Левина). Для торможения роста протей поверхность среды, разлитой в чашки Петри, орошали 1-2 мл спирта-ректификата, через одну минуту спирт сливали, чашки подсушивали открытыми при 37<sup>0</sup>С в течение 5-15 минут, после чего использовали для посева. Через 18-24 ч инкубирования при 37<sup>0</sup>С посевы просматривали. Дифференциацию бактерий проводили с использованием монорецепторных О-колизывороток, а наличие адгезинов - с использованием моносpezifических антиадгезивных сывороток биофабричного производства в капельной реакции агглютинации.

Ротавирусы выделяли от больных телят с клинически выраженными признаками ротавирусной инфекции. Из патматериала от больных телят готовили вируссодержащую суспензию и заражали культуры клеток, предварительно обработанные раствором трипсина. Выделение ротавирусов телят проводили на культуре клеток СПЭВ (по В.Н. Сюрину, 1986). Идентификацию выделенных штаммов проводили в реакции нейтрализации с моносpezifическими сыворотками.

Адгезивные штаммы кишечной палочки K99 и K88 культивировали в матрасных колбах на агаровой питательной среде, далее смывали стерильным физраствором, доводя до концентрации 10 млрд. микробных клеток в 1 мл.

Для накопления штаммов ротавирусов при проверке антигенной активности использовали культуру клеток СПЭВ.

Для выявления штаммов бактерий и вирусов, обладающих наиболее высокой антигенной активностью, исследования проводили на белых мышах, которым вводили инактивированные 0,3 % формалином возбудитель эшерихиоза подкожно, двукратно, с интервалом 14 дней, в дозах 0,2 мл 5 млрд. взвеси; ротавирусы – в тех же дозах, двукратно, подкожно с таким же интервалом.

На каждый штамм использовали по 5 белых мышей, всего исследовали 3 культуры эшерихий с адгезивным антигеном K88 и 2 культуры с адгезивным антигеном K99; 2 изолята ротавируса крупного рогатого скота, выделенные от павших телят в хозяйствах Республики Беларусь.

Через 21 день после второго введения вирусов и бактерий, животных тотально обескровливали, получали сыворотку крови и определяли уровень противовирусных антител в РНГА, а антибактериальных – в РА на полистироловых планшетах.

**Результаты.** Из головного мозга и паренхиматозных органов павших телят было изолировано 5 культур бактерий, которые по культурально-морфологическим, биохимическим и биологическим свойствам были отнесены к роду *Escherichia*, идентифицированы как *E. coli*, а при серологической идентификации 3 культуры эшерихий были выделены с адгезивным антигеном K88 и 2 культуры с адгезивным антигеном K99.

При изучении морфологических и тинкториальных свойств микроорганизмы *E. coli* являлись грамотрицательными, полиморфными, мелкими, короткими палочками, отличающимися очень активной подвижностью, размеры клеток составили 0,4×3 мкм, спор не образовывали, в мазках располагались одиночно, образовывали индол, ферментировали лактозу и маннит, не разлагали мочевины, не росли на среде Симмонса. Рост на среде Эндо с образованием округлой формы колоний с приподнятым центром, ровными краями и гладкой поверхностью. Колонии имели красный цвет с металлическим

блеском. На среде Левина наблюдали рост колоний черного цвета. На агаровой среде наблюдалось формирование влажных, круглых колоний с ровными краями и гладкой поверхностью серого цвета. На МПБ образовывалось обильное равномерное помутнение с неприятным запахом и появлением легко разбивающегося осадка. Исследуемые культуры эшерихий признавали патогенными, так как гибель белых мышей наступала через 12 ч после заражения смывом с суточных агаровых культур в дозе 500 млн. микробных тел.

Ротавирус при культивировании на культуре клеток СПЭВ вызывал ЦПД через 24 часа после инокуляции и характеризовался округлением клеток, появлением серповидных клеток, зернистостью и лизисом. Титр ротавируса составил  $7,0 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{мл}}$ .

В таблице представлены результаты изучения титров противовирусных и антибактериальных антител у мышей при изучении антигенной активности вирусов и бактерий.

#### Результаты изучения антигенной активности вирусов и бактерий на белых мышах

№№ п/п	Группы животных	Наименование антигена	Количество мышей в группе	Титр антител
1.	Опытная группа № 1	Ротавирус телят, штамм № 1	5	1:8
2.	Опытная группа № 2	Ротавирус телят, штамм № 2	5	1:16
3.	Опытная группа № 5	Эшерихии К88 – штамм № 1	5	1:256
4.	Опытная группа № 6	Эшерихии К88 – штамм № 2	5	1:128
5.	Опытная группа № 7	Эшерихии К88 – штамм № 3	5	1:128
6.	Опытная группа № 8	Эшерихии К99 – штамм № 1	5	1:128
7.	Опытная группа № 8	Эшерихии К99 – штамм № 2	5	1:256
8.	Контрольная группа № 14	Ротавирус телят	5	0
		Эшерихии К88	5	0
		Эшерихии К99	5	0

Из таблицы видно, что введение мышам ротавируса способствовало образованию антител в титрах 1:8 - 1:16, эшерихий - 1:128 - 1:256.

Таким образом, проведенные исследования подтверждают данные отечественных и зарубежных ученых о том, что среди этиологических факторов, вызывающих патологию желудочно-кишечного тракта молодняка крупного рогатого скота, ведущую роль играют ротавирусы и энтеропатогенные

*E. coli*, содержащие адгезивные антигены. Из патматериала от павших телят нами выделено 5 культур бактерий, которые по культурально-морфологическим, биохимическим и тинкториальным свойствам были отнесены к роду *Escherichia*, идентифицированы как *E. coli*. При серологической идентификации установлены 3 культуры эшерихий с адгезивным антигеном K88 и 2 культуры с адгезивным антигеном K99. Выделено 2 изолята ротавируса крупного рогатого скота.

При изучении антигенной активности максимальный уровень антител установлен у белых мышей после 2-х кратного введения ротавируса - штамм №2, эшерихий K88 - штамм №1, K99 - штамм №1, что предопределяет выбор этих штаммов для дальнейшей работы при конструировании вакцины против ротавирусной инфекции и эшерихиоза крупного рогатого скота.

#### Литература

1. Лидросик Н.Н., Курилович Д.В., Ломако Ю.В. Эпизоотическая ситуация по колибактериозу телят в Республике Беларусь: Ученые записки Витебской ордена «Знак Почета» государственной академии ветеринарной медицины, – Витебск: Витебек Энерго, 1997. – Т. 35. - Ч. 1. – С. 8-10.
2. Головки А.Н., Ушкалов В.А. Пути конструирования эффективных вакцин против желудочно-кишечных инфекций животных: Ученые записки «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины». — Витебск, 1997. - Т. 35. - Ч. 1. – С. 29-30.
3. Зелютков Ю.Г. Инфекционные энтериты новорожденных телят: Монография. – Витебск, 2006. – 188с.
4. Ломако Ю.В. Биологические свойства адгезивных штаммов эшерихий: Сб. статей 2-й международной научно-практической конференции «Исследования молодых ученых в решении проблем животноводства». Витебск, УО ВГАВМ, 2002. – С. 158-159.
6. Сидоров, М.А., Федоров Ю.Н., Савич О.М. Иммуный статус и инфекционные болезни новорожденных телят и поросят // Ветеринария, 2006. - № 11.– С. 3-6.