

резистентности (с учетом бета-лактамазной активности), связанных с условиями содержания, кормления, возрастом, физиологическим состоянием не выявлено. При этом, чаще всего высокий и повышенный уровень бета-лактамазной активности регистрировался у высокопродуктивных животных основного стада и больных субклиническим маститом коров.

Учитывая, что бета-лактамы являются основными в практической работе ветеринарных специалистов, особенно при лечении маститов, необходимо регулярно проводить профилактические мониторинговые исследования поголовья, результаты исследования регистрировать документально и учитывать при назначении антибактериальных препаратов для получения максимального терапевтического эффекта. Во всех случаях заболевания коров маститами целесообразно проводить исследование сыворотки крови на наличие резистентности для правильного и рационального назначения антибактериальных препаратов.

**Литература.** 1. Антиидиотипические и природные каталитически активные антитела / А.М. Шустер [и др.] // Мол.биол. – 1991. – Том 25, №3. – С. 17. 2. Ашмарин, И.П. Гипотеза об антителах как новейших регуляторах физиологических функций, созданных эволюцией / И.П. Ашмарин, И.С. Фрейдлин // Ж. эволюц. биохимии и физиол. – 1989. – Т. 25, №2. – С. 176-181. 3. Берзофски, Д.А. Взаимодействие антиген-антитело / Д.А. Берзофски, А.Д. Берковер. Под ред. У. Пола. // М.: Мир, 1989. – Том 3. – С. 5-88. 4. Взаимодействие каталитически активных антител с ДНК / А.М. Шустер [и др.] // Докл. АН СССР. – 1991. – Том 319, №6. – С. 1504-1507. 5. ДНК-гидролизующие IgG антитела из крови больных некоторыми инфекционными заболеваниями / Е.С. Одинцова [и др.] // Иммунопатол., аллергол., инфектол. – 2006. – №2. – С. 49-55. 6. ДНК-специфические каталитические антитела в сыворотках крови человека / А.М. Шустер [и др.] // Докл. АН СССР. – 1991. – Том 318, №5. – С. 1262-1264. 7. Кит, Ю.Я. Существуют ли каталитические антитела у здоровых людей? / Ю.Я. Кит, Д.В. Семенов, Г.А. Невинский // Мол.биол. – 1995. – Том 29, №4. – С. 893-905. 8. Конопот, Д.С. Определение антибиотикорезистентности к бета-лактамам антибиотикам / Д.С. Конопот, С.В. Семенов // Инновации в ветеринарной медицине, биологии, зоотехнии: материалы 11-й международной конференции молодых ученых, Витебск, 24-25 мая 2012 г. / Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Витебск, 2012. – С. 57. 9. Руководство по инфекционным болезням / Под общей редакцией В.М. Семенова // М.: ООО «МИА». – 2009. – 752 с.

Статья передана в печать 06.03.2013 г.

УДК: 619:616.98:579.842.11:615.371:632.2

#### ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОПТИМАЛЬНОЙ ДОЗЫ И СООТНОШЕНИЯ МОНОКОМПОНЕНТОВ АССОЦИИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ КОЛИБАКТЕРИОЗА И КЛЕБСИЕЛЛЕЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

**\*\* Ломако Ю.В., \* Красочко П.П., \*\* Амосова Л.А., \* Яромчик Я.П., \*\* Борисовец Д.С.**

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

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

*Сконструирована ассоциированная вакцина для профилактики колибактериоза и клебсиеллеза телят со следующим содержанием антигенов (микробных тел) в см<sup>3</sup>: E. coli A20 – 0,7 млрд., E. coli F41 – 1,0 млрд., E. coli K88 – 1,0 млрд., E. coli K99 – 1,5 млрд., Kl.pneumoniae – 1,0 млрд.*

*The associated vaccine against colibacillosis and klebsiellosis of calves with the following contents antigen (microbial cells) in cm<sup>3</sup>: E. coli Att20 (A20) - 0,7 mlrd., E. coli F41 - 1,0 mlrd., E. coli F4 (K88) - 1,0 mlrd., E. coli F5 (K99) - 1,5 mlrd., Kl.pneumoniae - 1,0 mlrd. constructed.*

**Введение.** Среди инфекционных болезней острые желудочно-кишечные патологии у новорожденных телят имеют наибольшее распространение и наносят огромный экономический ущерб, слагаемый из потерь от гибели животных, затрат на проведение лечебных и ветеринарно-профилактических мероприятий.

Наиболее часто регистрируемыми причинами заболеваемости и падежа телят являются колибактериоз и клебсиеллез, которые зачастую протекают в ассоциации. Указанные болезни характеризуются высоким уровнем заболеваемости, которая в зависимости от условий кормления и содержания животных в первые дни жизни колеблется от 30 до 90%, а летальность составляет 31,5–38,5% [1, 6, 10].

Важное звено в мероприятиях по борьбе с колибактериозом и клебсиеллезом молодняка крупного рогатого скота занимает специфическая профилактика. Надежным и достаточно эффективным методом специфической профилактики при инфекционных энтеритах остается создание защиты слизистой оболочки кишечника телят с помощью материнских антител, содержащихся в молозиве коров. Иммунизация глубоководных коров и своевременная выпойка новорожденным телятам иммунного молозива, которое содержит специфические антитела, позволяет снизить заболеваемость и продолжительность болезни, значительно облегчает течение инфекционного процесса и сокращает падеж и вынужденный убой молодняка при данных болезнях [6, 8, 10]. Для специфической профилактики колибактериоза телят в Республике Беларусь ОАО «ВитУнифарм» выпускается вакцина поливалентная гидроокисьалюминиевая формолтиомерсальная против колибактериоза телят и ягнят, включающая эшерихий 13 O-серогрупп (O8, O9, O15, O20, O26, O41, O55, O78, O86, O101, O115, O117, O119). Вакцины с клебсиеллезным компонентом и адгезивными антигенами E. coli до недавнего времени в Республике Беларусь не выпускались. Высокий уро-

вень заболеваемости, отход телят и выделяемость возбудителей колибактериоза и клебсиеллеза из патологического материала павших телят, полученных от вакцинированных коров, свидетельствуют о недостаточной эффективности специфической профилактики этих болезней [1, 2, 3, 4, 6, 7, 8].

Важным фактором стационарного неблагополучия хозяйств является циркуляция в родильных отделениях и профилакториях полевых штаммов, не входящих в состав вакцины и не перекрывающихся ее антигенным спектром [2, 4, 7, 9]. При этом необходимо отметить, что за период 2010-2012 гг. отмечается стабильный рост процента выделяемости от заболевших и павших новорожденных телят изолятов *E.coli* (24-55%), содержащих адгезивные антигены A20, K88, K99, F41, которые отсутствуют в биофабричной вакцине, включающей только соматические антигены [1, 7, 9]. Все это указывает на необходимость использования адгезивных компонентов при изготовлении иммунизирующего препарата против колибактериоза новорожденных телят. Фимбриальные адгезины, являясь белками, отвечают за прикрепление бактерий к энтероцитам и дальнейшую колонизацию слизистой тонкого кишечника, обладают высокими иммуногенными свойствами, что необходимо учитывать при создании биопрепаратов против колибактериоза. Аналогичную ситуацию отмечают и в отношении клебсиеллеза крупного рогатого скота. Имеются сведения о применении вакцин, сконструированных на основе адгезивных антигенов в зарубежных странах, Российской Федерации, Украине [2, 5]. Трудности создания ассоциированных вакцин заключаются в несовместимости некоторых антигенов, недостаточной стабильности многокомпонентных комбинаций их антигенов, подборе оптимального соотношения антигенных фракций [3, 4, 6, 8, 10]. Учитывая напряженную эпизоотическую ситуацию по желудочно-кишечным заболеваниям новорожденных телят в Республике Беларусь, актуальным являются разработка и внедрение в производство эффективных средств для активной профилактики колибактериоза и клебсиеллеза крупного рогатого скота. В результате научно-исследовательской работы по разработке вакцины для профилактики колибактериоза и клебсиеллеза телят нами определены оптимальные дозы и соотношение монокомпонентов вакцины на лабораторных животных, сконструирован лабораторный образец вакцины, проведены лабораторные испытания биопрепарата.

**Материалы и методы исследований.** Работа проводилась в условиях лаборатории диагностики РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», НИИ ПВМ и Б УО ВГАВМ. Для определения дозы и соотношения монокомпонентов вакцины на лабораторных животных определяли иммуногенность каждого компонента на морских свинках. Штаммы *E. coli* K88, *E. coli* K99, *E. coli* F41, *E. coli* A20, *Kl.pneumoniae* культивировали 24 часа на агаровой питательной среде, бактериальные клетки смывали стерильным 0,85% раствором натрия хлорида и готовили образцы комплексных антигенов со следующей концентрацией бактериальных клеток в см<sup>3</sup>:

- № 1 образец концентрацией каждого антигена 0,5 млрд. в см<sup>3</sup>;
- № 2 образец концентрацией каждого антигена 1,0 млрд. в см<sup>3</sup>;
- № 3 образец концентрацией каждого антигена 2,0 млрд. в см<sup>3</sup>.

Инактивацию бактерий проводили метротропином в концентрации 0,2% в течение 24 часов при 37°C. Каждый образец инъецировали 5 морским свинкам массой 250-300 г в объеме 0,5 см<sup>3</sup>, подкожно. Контрольной группе аналогичным образом применяли физиологический раствор. До вакцинации и на 14 сутки после нее отбирали кровь для получения сыворотки и определения уровня антител путем постановки РА на полистироловых планшетах. Следующая серия опытов была направлена на экспериментальное подтверждение правильности выбора соотношения монокомпонентов, основанное на предыдущих опытах. Для этого были подготовлены 3 образца вакцины, состав которых представлен в таблице 61. В качестве адьюванта использовали *Montanide ISA-206*, производства фирмы *Seppic*, Франция. Полученные образцы исследовали на стабильность эмульсии, стерильность путем посева на среды МПА, МПБ, Сабуро, и Кит-Тароцци под вазелиновым маслом.

**Таблица 61 – Антигенный состав образцов вакцины выбора соотношения монокомпонентов на морских свинках.**

Антиген	Концентрация антигенов в образцах вакцины, млрд. м.т. в 1 см <sup>3</sup>		
	Образец №1	Образец №2	Образец №3
<i>E. coli</i> A20	1,0	0,7	0,7
<i>E. coli</i> F41	1,0	0,7	1,0
<i>E. coli</i> K99	1,0	1,5	1,0
<i>E. coli</i> K88	1,0	1,5	1,0
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1,0	1,0	1,0

**Результаты исследований.** При определении иммуногенности каждого антигенного компонента в зависимости от концентрации антигена получены следующие результаты, представленные в таблицах 62 и 63.

**Таблица 62 – Определение иммуногенности образцов комплексных антигенов с различной концентрацией бактериальных клеток в см<sup>3</sup>**

Антиген		<i>E. coli</i> A20			<i>E. coli</i> F41			<i>E. coli</i> K99		
Концентрация млрд. м.т.		0,5	1,0	2,0	0,5	1,0	2,0	0,5	1,0	2,0
Титр антител, log <sub>2</sub>	До иммунизации	2,0±0,7	1,6±0,8	1,8±0,8	1,2±0,4	2,3±1,0	1,0±0,7	1,0±0,7	2,2±0,8	1,6±1,1
	На 21 сутки	7,8±1,3	9,6±0,9	10,0±1,1	7,6±1,1	8,4±0,9	8,4±1,1	6,2±0,8	7,0±0,7	7,6±0,5

Примечание: p<0,001

**Таблица 63 – Определение иммуногенности комплексных антигенов с различной концентрацией бактериальных клеток в см<sup>3</sup>**

Антиген		<i>E. coli</i> K88			<i>Klebsiella pneumoniae</i>		
Концентрация, млрд. м.т.		0,5	1,0	2,0	0,5	1,0	2,0
Титр антител, log <sub>2</sub>	До иммунизации	1,8±1,3	2,0±0,7	1,0±0,7	2,63±0,48	2,61±0,51	1,94±0,6
	21 сутки	8,0±1,1	9,8±1,3	9,6±1,1	3,38±1,11	8,88±1,03	9,11±1,15

Примечание: p<0,001

Таким образом, наибольшую выработку антител стимулируют образцы комплексных антигенов *E. coli* с концентрацией каждого монокомпонента 1,0 и 2,0 млрд. м.т. в см<sup>3</sup>, и 0,5-1,0 млрд. м.т. в см<sup>3</sup> *Klebsiella pneumoniae*. Образцы вакцины оказались стабильными, стерильными. Морские свинки после иммунизации оставались клинически здоровыми на протяжении всего периода наблюдения. Отмечена местная реакция на введения образцов вакцины, которая характеризовалась образованием незначительной плотной припухлости, рассасывающейся на 7-14 день. Результаты испытания образцов вакцины (n-3) с различным соотношением монокомпонентов с учетом их иммуногенности представлены в таблице 64.

**Таблица 4 – Титры антител в сыворотке крови морских свинок при применении образцов вакцины с различным соотношением антигенных компонентов**

Соотношение антигенов <i>E. coli</i> (A20:F41:K99:K88) и <i>Kl. pneumoniae</i>	Титр антител, log <sub>2</sub>				
	A20	F41	K99	K88	<i>Kl. pneumoniae</i>
До иммунизации	1,8±0,6	1,0±0,4	1,2±0,6	0,2±0,3	0,2±0,4
1:1:1:1:1	10,2±0,6	8,6±0,5	7,4±0,9	9,6±0,9	8,7±0,3
0,7:0,7:1,5:1,5:0,8	9,4±0,6	8,4±0,5	8,8±0,6	10,2±0,6	8,5±0,5
0,7:1,0:1,5:1,0:0,8	9,4±0,5	9,0±0,8	9,0±0,4	9,6±0,7	8,5±0,6

Примечание: p<0,001

На основании полученных данных наиболее иммуногенным является компонент *E. coli* A20, поэтому в вакцине его необходимо меньшее количество – 0,7 млрд./см<sup>3</sup>. Наименее иммуногенный компонент – *E. coli* K99, поэтому его концентрация в вакцине составила 1,5 млрд./см<sup>3</sup>. Оптимальной концентрацией микробных клеток *Kl. pneumoniae* принята 0,8 млрд. м.т. в см<sup>3</sup>.

На основании полученных данных нами сконструирован образец вакцины для профилактики колибактериоза и клебсиеллеза телят со следующим содержанием антигенных компонентов (микробных тел) в см<sup>3</sup>:

*E. coli* A20 – 0,7 млрд.

*E. coli* F41 – 1,0 млрд.

*E. coli* K88 – 1,0 млрд.

*E. coli* K99 – 1,5 млрд.

*Kl. pneumoniae* – 0,8 млрд.

**Закключение.** 1. На основании проведенных экспериментов по определению оптимальной дозы и соотношения монокомпонентов нами сконструирован образец вакцины для профилактики колибактериоза и клебсиеллеза телят со следующим содержанием антигенов (микробных тел) в см<sup>3</sup>: *E. coli* A20 – 0,7 млрд., *E. coli* F41 – 1,0 млрд., *E. coli* K88 – 1,0 млрд., *E. coli* K99 – 1,5 млрд., *Kl. pneumoniae* – 0,8 млрд.

2. При проведении лабораторных испытаний полученного образца ассоциированной вакцины против колибактериоза и клебсиеллеза крупного рогатого скота подтверждена его стерильность, безвредность и низкая реактогенность.

**Литература.** 1. Анализ данных ветеринарной отчетности по колибактериозу телят в Республике Беларусь / В.В. Максимович [и др.] // Ученые записки / УО ВГАВМ. – Витебск, 2007. – Т. 43, вып. 2. – С. 81–83. 2. Антигенный состав и патогенные свойства штаммов *E. coli*, изолированных от телят и поросят в Краснодарском крае / В.И. Терехов [и др.] // Российский ветеринарный журнал. – 2008. – № 4. – С. 6–7. 3. Борисовец, Д. С. Факторы патогенности бактерий рода *Klebsiella* и патогенез клебсиеллеза у сельскохозяйственных животных (обзорная статья) / Д. С. Борисовец // Экология и животный мир : международный научно-практический журнал. - 2009. - № 1. - С. 4-10. 4. Головкин, А.Н. Пути конструирования эффективных вакцин против желудочно-кишечных инфекций животных // А.Н. Головкин, В.А. Ушкалов // Ученые записки / ВГАВМ. – Витебск, 1999. – Т. 35, ч. 1. – С. 29–30. 5. Зайцев, В.В. Получение адгезивных антигенов *E. coli* / В.В. Зайцев, М.О. Билецкий // Ученые записки : [сборник научных трудов] : научно-практический журнал / УО ВГАВМ. – Витебск, 2007. – Т. 43, вып. 2. – С. 38–41. 6. Зелютков, Ю.Г. Инфекционные энтериты новорожденных телят : монография / Ю.Г. Зелютков. – Витебск : УО ВГАВМ, 2006. – 188 с. 7. Определение адгезивных антигенов *Escherichia coli*, выделенных от телят в Республике Беларусь / В.В. Максимович [и др.] // Материалы международной научно-практической конференции «Проблемы повышения эффективности производства животноводческой продукции» Жодино, 12-13 октября, 2007. – С. 353-355. 8. Хитрова, А.Е. Новые препараты для специфической профилактики смешанных инфекционных болезней телят / А.Е. Хитрова, Г.Л. Соболева, Т.И. Алипер // Ветеринарная медицина Беларуси. – 2005. – № 1. – С. 23–24. 9. Comparison of phenotypic and genotypic antimicrobial profiles in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* from the same dairy cattle farms / Scaria J., Warnick L.D., Kaneene J.B., May K., Teng C.H., Chang Y.F. // Molecular And Cellular Probes, 2010. – Dec; Vol. 24 (6), pp. 325-45. 10. Dobilas, J. Epizootic investigations of colibacteriosis on farms and development of vaccine / J. Dobilas, L. Barzelis // Vet. Med. and Zootech. (Lithuania) / Sc. Works. – 1997. – Vol. 4, № 26. – P. 22–24.

Статья передана в печать 07.03.2013 г.