

Федеральное государственное бюджетное образовательное
учреждение высшего образования
«Казанская государственная академия ветеринарной медицины
имени Н.Э. Баумана»

На правах рукописи

Тахавиев Ильдус Гумарович

**Биологические свойства стрептококков и изыскание
инактивированной вакцины против стрептококкоза свиней
из местных штаммов**

06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология,
эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

**диссертация
на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук**

Научный руководитель:
Д.в.н., профессор, заслуженный деятель науки РТ,
Лауреат премии правительства РФ
в области науки и техники
Алимов Азат Миргасимович

Казань – 2021

СОДЕРЖАНИЕ

	Введение	4
1	Обзор литературы	11
1.1	Стрептококкозы животных и культурально-морфологические свойства стрептококков	11
1.2	Стрептококковая (диплококковая) инфекция	18
1.3	Клиника и патоморфология стрептококковой (диплококковой) инфекции	23
1.4	Эпизоотический процесс при стрептококковой (диплококковой) инфекции	27
1.5	Диагностика стрептококковой (диплококковой) инфекции	31
1.6	Иммунитет и специфическая профилактика стрептококковой (диплококковой) инфекции	36
2	Собственные исследования	40
2.1	Материалы и методы исследований	40
2.1.1	Материалы	41
2.1.2	Методы исследований	42
2.2	Результаты собственных исследований	46
2.2.1	Анализ эпизоотической обстановки по стрептококкозу сельскохозяйственных животных в хозяйствах Среднего Поволжья и изучение культурально-морфологических свойств стрептококков, выделенных из различных объектов	46
2.3.2	Клиника и патологоанатомические изменения при стрептококкозе свиней	59
2.2.3	Разработка лабораторного регламента изготовления инаktivированной бивалентной формол-гидроокись алюминиевой вакцины против стрептококкоза свиней	62
2.2.3.1	Изыскание питательной среды и подготовка штаммов для изготовления вакцины	62
2.2.3.2	Инаktivация биомассы вакцинных штаммов стрептококков	71
2.2.4	Изучение иммуногенных свойств инаktivированной ИБФГОА вакцины против стрептококкоза в экспериментальных и производственных условиях	75
2.2.4.3	Изучение эффективности инаktivированной бивалентной вакцины против стрептококкоза в производственных условиях на свиньях	84
2.2.4.4	Гематологические, биохимические и иммунологические исследования свиней до и после иммунизации ИБФГОА вакциной	88
2.2.5	Влияние на иммуногенез при вакцинации поросят ИБФГОА вакцины Фераминовита	96

2.2.6	Оценка экономической эффективности ИБФГОА вакцины	96
3	Заключение	97
4	Практические предложения	107
5	Приложение	108
6	Список сокращенных терминов	109
7	Список иллюстрационного материала название рис. и табл.	110
8	Список использованной литературы	112
9	Приложения	132

Введение

Актуальность темы. В обеспечении населения полноценными и высококачественными продуктами важное значение имеет развитие животноводства [128]. Большой удельный вес в обеспечении мясного баланса в мире и нашей стране занимает свиноводство [12, 132, 135, 170]. Однако развитию животноводства определенные трудности создают вирусные и бактериальные инфекции, особенно молодняка сельскохозяйственных животных [5, 36, 48, 94, 139]. Экономический ущерб от них складывается из падежа, снижения продуктивности животных и затрат средств на проведение лечебно-профилактических мероприятий [121, 139, 170, 181]. Несмотря на большие успехи, достигнутые в борьбе с остро заразными и особо опасными инфекционными болезнями животных, за последние годы в животноводстве широкое распространение получили факторные инфекционные болезни. В их этиологии главенствующая роль принадлежит условно-патогенной микрофлоре [11, 24, 48]. К данной группе микроорганизмов относятся и стрептококки [23, 24, 48]. Наличие нозологических единиц, обусловленных стрептококками, частое обнаружение их в органах и тканях у молодняка и взрослых животных, в том числе и не имеющих клинических проявлений, говорит о всеобщем их распространении [49, 53, 54, 56]. Поэтому возникла необходимость всестороннего комплексного изучения стрептококкоза, как с точки зрения отдельных микроорганизмов и их свойств, так и общих эпизоотологических особенностей, характерных для этого заболевания.

Для усиления борьбы с этой инфекционной болезнью необходимо разрабатывать эффективные методы и средства. Требуется целый комплекс мероприятий, направленных на предотвращение возникновения и распространения стрептококкозов.

Ряд авторов обращают внимание на то, что справляться с бактериальными инфекциями желудочно-кишечного тракта и органов дыхательной системы животных ветеринарным врачам помогают антибактериальные препараты [91, 94, 96, 129]. Однако они не полностью

решают проблему, так как появляются резистентные штаммы. Бесконтрольное поголовное применение антибиотиков способствует формированию резистентности и повышению уровня патогенности условно-патогенных микроорганизмов [2, 21, 104, 110, 181]. В ситуации, когда эффективность известных антибактериальных препаратов снижается, а резистентность к новым средствам формируется очень быстро, применение вакцин становится необходимым решением данной проблемы.

Стрептококкоз – инфекционная болезнь разных видов животных, в основном молодняка, которую вызывают патогенные стрептококки [115, 141]. Острое течение характеризуется септициемией, при хроническом течении у новорожденных наблюдаются омфалиты. При подостром и хроническом течении болезни у животных поражаются органы пищеварения, респираторной системы, глаз, суставы и другие органы. У взрослых животных стрептококкоз проявляется абортами, метритами и маститами. Болезнь регистрируется у молодняка, начиная с первых дней от рождения в виде пупочного сепсиса, энтеритов, пневмоний, артритов. Летальность молодняка может достигать 70%. У человека могут возникать различные заболевания (ангина, скарлатина, рожа, целлюлит, гнойные поражения кожи, отиты, менингиты, энцефалиты и т.д.). Поэтому многие авторы [103,127, 131] отмечают о социальной значимости стрептококкоза.

Для защиты животных от инфекционных болезней эффективной является специфическая профилактика. Вакцинация способствует созданию напряженного иммунитета в короткие сроки и снижению потерь [26, 27, 69]. В практике свиноводства применяют живые и инактивированные вакцины [55, 59, 79]. В эпизоотическом и эпидемическом отношении наиболее безопасными являются инактивированные вакцины. Многие исследователи отмечают, что инактивированные вакцины, изготавливаемые из штаммов микроорганизмов, выделяемых в эпизоотическом очаге, обладают высокой специфичностью, иммуногенностью и способствуют созданию напряженного иммунитета [29, 33]. В связи с этим, изучение инфекционных заболеваний и

разработка эффективных средств защиты животных, совершенствование мероприятий борьбы со стрептококками имеет важное значение для ветеринарии.

Цель и задачи исследований. Целью исследований явилось выделение и изучение биологических свойств отдельных изолятов стрептококков, а так же разработка инактивированной вакцины из местных штаммов для профилактики стрептококкоза свиней.

Для достижения данной цели были поставлены следующие **задачи**:

- Провести бактериологические исследования биопроб и патматериала от животных в регионе среднего Поволжья;
- Изучить культурально-морфологические свойства стрептококков, выделенных из различных объектов;
- Отобрать штаммы для изготовления вакцины и оптимизировать условия культивирования стрептококков;
- Определить иммуногенность инактивированных культур стрептококков на лабораторных животных;
- Разработать лабораторный регламент изготовления инактивированной вакцины и определить ее иммуногенность на белых мышах и свиньях.
- Оценить эффективность инактивированной вакцины против стрептококкоза свиней из местных штаммов.

Научная новизна. Впервые проведены бактериологические исследования по выяснению распространённости стрептококкозов животных в регионе среднего Поволжья и изучению биологических свойств выделенных стрептококков.

Определены наиболее оптимальные питательные среды и режим культивирования стрептококков. Разработан лабораторный регламент изготовления и контроля инактивированной бивалентной формол гидроокись алюминиевой (ИБФГОА) вакцины, доказана её иммуногенность и профилактическая эффективность на лабораторных животных и свиньях.

Степень разработанности темы. Стрептококкозы довольно часто регистрируются среди сельскохозяйственных животных, особенно у молодняка. Их вызывают микроорганизмы рода *Streptococcus*, включающего более 24 видов. Современная классификация их основана на антигенной структуре, наиболее патогенными являются серологические группы А, В, С, D и Е, а у свиней, в основном, серогруппы С, D и Е.

Стрептококкозы в зависимости от вида и возраста животных могут вызывать разнообразную клинику: септицемию, менингиты, лимфодениты, артриты, респираторные болезни, маститы, эндометриты и т.д. Разнообразие серогрупп и сопутствующие возникновению болезни факторы создают серьёзные трудности в современной диагностике и надёжной специфической профилактике стрептококкозов. Повсеместная распространённость стрептококкозов и наносимый ими ущерб животноводству выдвигают необходимость усиления внимания к этой инфекции и повышению эффективности средств специфической профилактики.

В связи с этим, возникла насущная необходимость изучения распространённости стрептококкозов, биологических свойств циркулирующих стрептококков, а также изыскание эффективного средства профилактики стрептококкоза свиней. Определены наиболее оптимальные питательные среды и условия культивирования стрептококков. Разработан лабораторный регламент изготовления и контроля ИБФГОА вакцины, доказана её иммуногенность и профилактическая эффективность на лабораторных животных и на свиньях.

Теоретическая и практическая значимость. Установлено, что стрептококкозы имеют широкое распространение в хозяйствах Среднего Поволжья, как среди молодняка, так и взрослых животных, в этиологии которых важную роль играют разные серогруппы стрептококков.

Выявленные клинические и патоморфологические особенности стрептококкозов у свиней и биологические свойства выделенных стрептококков могут быть использованы в диагностике этой инфекции.

Созданная ИБФГОА вакцина из местных штаммов рекомендуется для профилактики стрептококкоза свиней, а разработанный регламент изготовления вакцины может быть использован в конструировании вакцин и для других видов животных.

Методология и методы исследований. При изучении распространенности стрептококкозов среди сельскохозяйственных животных использованы статистические данные, клинические наблюдения, патологоанатомические, бактериологические и микроскопические исследования патологического и биологического материала из различных хозяйств. Используются иммунологические, серологические, гематологические и биохимические методы. Опыты на лабораторных животных и свиньях проведены с соблюдением ветеринарно-санитарных правил и аналогичности подбора животных.

Для изготовления вакцины за основу была взята принятая в ветеринарной микробиологии технология наработки биомассы микроорганизмов, инактивации и сорбирования антигенов.

Основные положения, выносимые на защиту:

- стрептококкозы сельскохозяйственных животных широко распространены среди животных в хозяйствах Среднего Поволжья, вызываются стрептококками различных серогрупп и имеют разнообразную клинику и патолого-морфологическую картину в зависимости от вида и возраста животных, а также антигенных свойств возбудителя;
- культурально-морфологические и антигенные свойства изолятов стрептококков соответствуют известным сероварам и наиболее интенсивный рост стрептококков обеспечивают полусинтетическая питательная среда на основе гидролиза лактоальбумина и бульон Хоттингера с глюкозой и твином – 40.
- разработан лабораторный регламент изготовления ИБФГОА вакцины против стрептококкоза свиней;

–ИБФГОА вакцина против стрептококкоза свиней вызывает иммунную перестройку организма, характерную для вакцинного процесса и создаёт напряженный иммунитет и у лабораторных животных, свиноматок и поросят.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов подтверждается необходимым объёмом экспериментального материала и проведением опытов на большом количестве лабораторных животных и свиней, воспроизводимостью результатов и использованием актуальных методов и методологии, а также статистической обработкой цифрового материала с выводением порога вероятности сравниваемых показателей ($p < 0,05$).

Экспериментальные данные получили отражение в обзоре литературы, результатах исследований и заключении.

Материалы диссертации доложены на ежегодных научных отчетах кафедры за 2017, 2018, 2019 годы.

Основные результаты доложены в виде докладов на:

- Научных конференциях в Казанской ГАВМ (2018, 2019, 2021 гг);
- Международной конференции, посвященной 90-летию со дня рождения В.А. Киршина «Актуальные проблемы ветеринарной медицины». Казань 5 – 6 октября 2018 г;
- Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знания молодых для развития ветеринарной медицины в АПК страны». Санкт-Петербург 19 – 20 ноября 2020 г;
- International Scientific conference (Melbourne, Australia, March 14. 2021 г.

Объём и структура

Диссертация изложена на 138 страницах компьютерного набора и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов исследований, заключения, практических предложений и приложения.

Библиографический список содержит 185 источников, в том числе 42 иностранных авторов, работа иллюстрирована 9 рисунками и 22 таблицами.

1 Обзор литературы

1.1 Стрептококкозы животных и культурально-морфологические свойства стрептококков

Бактерии имеющие шаровидную форму (кокки) в природе, и многие из них являются патогенными для животных и человека, особенно представители, относятся к семействам: *Micrococcaceae*, *Streptococcaceae*. К этим семействам входят патогенные и условно-патогенные кокки, имеющие общие морфологические, генетические и биологические свойства. Кроме этого, их объединяет способность вызывать гнойно-воспалительные процессы [17, 18].

К семейству *Streptococcaceae* отнесено 6 родов: *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus*.

Наибольшее значение в патологии имеет род *Streptococcus* [1, 3, 15, 19, 21, 149, 175].

По полисахаридным антигенам стрептококки подразделяются на 2 серологические группы, обозначенные буквами латинского алфавита [54, 81, 103, 127]. Данные отечественных и зарубежных ученых свидетельствуют о повсеместном распространении стрептококкозов, вызываемых бактериями различных серологических групп (А, В, С, D, Е, Н, L, Р, S, Z). По мнению ученых и практических специалистов, доля стрептококковых инфекций по отношению к другим инфекционным болезням с каждым годом увеличивается. В Российской Федерации на широкую распространённость стрептококкозов среди крупного рогатого скота, овец, свиней, лошадей и других видов животных указывают многие исследователи [41, 46, 49, 127, 141, 167].

Распространённость стрептококковой инфекции вызывает серьёзное беспокойство у ветеринарных и медицинских специалистов, что обусловлено сложностью диагностики, многообразием видов и серогрупп возбудителя, а так же разнообразием клинических проявлений [27, 29, 41, 61, 62, 68].

Стрептококки вызывают многочисленные инфекционные болезни под

общим названием стрептококкоз. Они имеют разнообразные формы проявления: пневмония, энтериты, маститы, метриты, эндометриты, артриты, фарингиты, эндокардиты, ишемию и септицемии и др.

Стрептококки относят к домену *Bacteria*, типу *Fermicutes*, классу *Bacilla*, порядку *Lactobacillates*, семейству *Streptococcaceae*, роду *Streptococcus*, который насчитывает 62 вида. Чаще всего инфекционную патологию у животных вызывают: *Str. eptococous pyogenes* – возбудитель различных нагноительных процессов; *Str. egptococus agalactiae* – возбудитель мастита коров; *Str. equi subsp. equi* – возбудитель мыта лошадей; *Str. pneumoniae* – возбудитель пневмококковой инфекции телят, поросят, ягнят, жеребят, козлят.

Часто стрептококки вызывают осложнения вирусных и бактериальных инфекций [33, 34, 58, 63, 69, 89].

Впервые стрептококки были выделены Л. Пастером в 1879 году. В чистой культуре стрептококки были выделены и описаны А. Розенбах в 1889 году [19].

Болезни, вызываемые стрептококками, распространены повсеместно, наибольший экономический ущерб наносят в свиноводству, скотоводству и овцеводству [22, 23, 31, 73, 134, 181].

Под данным ряда авторов, в последние года часто наблюдаются остропротекающие стрептококкозы, так называемые «инвазивные» формы стрептококковых инфекций, которые зачастую заканчиваются летально [32, 47, 49, 54, 55, 137].

Стрептококкозы у людей чаще всего вызывают бактерии серогрупп А, В, С. У животных возбудителями стрептококкозов являются патогенные стрептококки различных видов. Однако необходимо отметить, что зачастую вызывают болезнь бактерии серогрупп С и А (*Str. zooepidemicus*, *Str. equisimilis*, *Str. disgalactiae*, *Str. pyogenes*), которые относятся к условно-патогенным микроорганизмам [1, 58, 59, 102, 103, 107, 108].

Многие исследователи, к условно-патогенным относят таких

представителей микрофлоры человека и животных, которые появились в процессе эволюционного отбора и приобрели способность к использованию макроорганизма в качестве среды обитания. Они вызывают заболевание при формировании микрoэкологических и иммунных нарушений в организме хозяина и таким образом становятся патогенными [28, 50, 127, 131, 140].

Стрептококки способны вызывать болезни у лошадей, крупного рогатого скота, овец, коз, собак, пушных зверей, многих видов птиц и рыб [23, 24, 116, 117, 118].

Установлено, что у кошек и собак β -гемолитические стрептококки Ланцефельда группы G обитают в верхних дыхательных путях, носоглотке, нижней части полового тракта и кожи [32, 80]. Часто инфицирование происходит при рождении. Инфекция внедряется через пуповину, а затем распространяется по всему телу. Стрептококков группы B, C и G часто выделяют из ран и абсцессов взрослых кошек и собак, так же они могут быть причиной вторичной инфекции при заболеваниях верхних дыхательных путей и других слизистых оболочек. Так, по данным Гаскелла Р. и Беннета М. [32] в носоглотке собак и кошек может находиться скрытая бессимптомная инфекция, вызванная стрептококками группы A. Эта группа стрептококков часто вызывает заболевания людей. Таким образом, домашние животные могут быть для своих хозяев резервуаром и источником рецидивирующих тонзиллитов или фарингитов [32, 56].

Гемолитические стрептококки у сельскохозяйственных животных вызывают инфекционные болезни, сопровождающиеся образованием гноя у телят, ягнят, жеребят пиемии и септицемии, артриты, лимфадениты, фарингиты, флегмоны, эндокардиты, воспаления легких и другие патологии. У поросят гемолитические стрептококки вызывают менинго-энцефалиты, септицемии, энтероколиты, артрозо-артриты, бронхопневмонии, лимфадениты имеющие острое и подострое течение [22, 24, 67, 68, 69].

Болезнь проявляется повышением температуры тела, угнетением, нарушением координации движений, отёками, артритами, иногда диареей.

Летальность при стрептококкозе варьирует в зависимости от действия различных факторов, как внешней среды, так и от резистентности организма животных [23, 90, 103, 111].

Возбудителями стрептококкозов являются микроорганизмы рода *Streptococcus*, включающего больше 24 видов. Они грамположительные круглые или овоидные (ланцетовидные) кокки, спор не образуют. Бактерии рода *Streptococcus* имеют шаровидную или овальную форму, диаметром не менее 2 мкм, размер клеток варьируют у разных видов [118, 127].

Многие виды не имеют капсул, неподвижные, аэробы и факультативные анаэробы, расположенные в мазках из гноя и тканей из внутренних органов попарно или цепочками разной длины [49, 55, 85].

По данным В.И. Терехова с соавт. [126] стрептококки лучше растут на средах, богатых органическими соединениями, иногда только в присутствии 5% углекислого газа. Ферментация углеводов протекает с образованием, главным образом, молочной кислоты, газ не выделяется. Характерной особенностью стрептококков является отсутствие каталазной активности и способность большинства видов лизировать эритроциты. Они растут при 25° – 45° С, оптимум – 37° С. В жидких питательных средах наблюдают придонный и пристеночный рост, помутнение бульона и образование крошковидного осадка. На плотных питательных средах через 24 часа образуются прозрачные колонии диаметром 0,5 – 2 мм. Колонии имеют округлую форму с ровными либо исчерченными краями, с выпуклым или вогнутым центром.

При культивировании на кровяном агаре стрептококки вызывают различные виды гемолиза, чаще α -, а иногда β -гемолиза. При α -гемолизе происходит частичный лизис окружающих колонию стрептококков эритроцитов зеленовато-серым или коричневатым окрашиванием среды, из-за превращения гемоглобина в метгемоглобин. При β -гемолизе происходит полный лизис окружающих колонию эритроцитов, с полным просветлением питательной среды [41, 56, 125, 126, 145].

Патогенные стрептококки проявляют невысокую биохимическую малоактивность за исключением маститного стрептококка. Он расщепляет глюкозу, сахарозу, мальтозу, салицин, свёртывает молоко, некоторые штаммы способны ферментировать раффинозу, трегалозу, инулин и непостоянно салицин [90, 107, 170].

По данным ряда авторов возбудители большинства инфекций относятся к β -гемолитическим стрептококкам [4, 54, 81, 102, 127]. Патогенные виды стрептококков, обнаруживаемые у животных и человека, часто бывают идентичными.

Патогенные стрептококки разнородны по серологическим, болезнетворным и другим свойствам и поэтому обуславливают разнообразие форм проявления болезни у разных животных. Современная классификация стрептококков основана на антигенной структуре, определяемой реакцией преципитации за счёт группового полисахаридного вещества, но в патологии животных и человека используется классификация по серологическим группам A, B, C, D, E [49, 131].

В лабораторной диагностике используется дифференциация стрептококков по антигенной структуре на основании определения серогруппы и культурно-биохимических свойств. В основу серологической идентификации стрептококков положен метод Лансфильд, позволяющий определять специфичность полисахаридных антигенов клеточной стенки бактерий [128]. В настоящее время известно более 2 серологических групп гемолитических стрептококков, которые даже внутри группы различаются между собой (даже в серогруппе A выявлено более 100 типов [49, 56, 70, 127]).

Поверхностные белки у стрептококков обладают антифагоцитарными свойствами, и они подавляют фагоцитирование других патогенных и условно-патогенных бактерий, что ведет к росту их численности [38, 39, 63, 76].

Факторам патогенности у стрептококков относятся токсины (гемолизин, лейкоцидин, некротоксин), ферменты (фибринолизин, гиалуранидаза) и эндотоксин [54].

У некоторых патогенных стрептококков выявлено нефротоксин, дезоксирибонуклеаза, нейроаминидаза, амилаза, лигаза и другие ферменты патогенности [47].

По данным отдельных авторов [49, 59] устойчивость стрептококков во внешней среде невысокая. Высушенные в белках (кровь, мокрота) стрептококки при комнатной температуре могут выживать до 2 мес., на прогревании при 70...80°C погибают за 20 минут, кипячении – моментально. Из дезинфицирующих средств наиболее эффективны 20%-ный раствор свежегашеной извести, 0,5%-ный раствор формалина, хлорсодержащие препараты [85]. В объектах внешней среды (почва, навоз, помещениях) стрептококки погибают в течение 3 – 4 недель, особенно губительно на них действуют солнечные лучи и высушивание [58, 81, 85].

При нагревании до + 85° С погибают за 30 минут, в частности в молоке, а в 1% растворе формалина, 2% растворе NaOH, 10% взвеси свежегашеной извести $[\text{Ca}(\text{OH})_2]$ – за 1 – 2 минуты [54, 55].

Диплококки – возбудители диплококковой инфекции животных (диплококкоза). Относятся к *Streptococcus pneumoniae* [57, 58].

Пневмококки (синоним: *Pneumococcus Talamon* – Frankel, *Streptococcus lanceolatus Pasteur*, *Micrococcus pneumoniae*, *Diplococcus pneumoniae Frankel*, *Streptococcus pneumoniae*) открыты в 1881 г Л. Пастером и независимо от него Штернбергом в США. Пневмококки, выделенные из организма человека или животного представляют овальные или ланцетообразные кокки, располагающиеся парами. В мазках из органов и экссудатов серозных полостей обнаруживают не только парные кокки округлой и ланцетовидной формы, но и короткие цепочки, а также отдельные кокки. Размер клеток варьируется в пределах от 0,5×0,75 до 1×1,5 мк [56, 57,

59].

Стрептококки спор и жгутиков не имеют. Отличительной особенностью пневмококков является образование капсулы, которая бывает хорошо выражена в патологических материалах (мокрота, кровь, мазки-отпечатки из органов и т.д.). Капсула окружает оба кокка. В капсуле содержится термоустойчивое вещество - антифагин (защищающий пневмококк от фагоцитоза и действия антител). При культивировании на питательных средах капсула утрачивается, но сохраняется при культивировании в питательных средах, содержащих сыворотку крови. Пневмококки легко воспринимают анилиновые краски и красятся по Грамму положительно [54, 56, 145].

Пневмококки – факультативные анаэробы, растут при температуре 36° – 37° С и рН среды 7,2 – 7,4, на средах, содержащих животный белок (кровяной или сывороточный агар, асцит - агар). На поверхности агара уже через 2 часа образуются мелкие колонии, напоминающие стрептококковые, но более мелкие и прозрачные. На скошенном агаре при обильном посеве появляется весьма нежный прозрачный налёт, состоящий из мельчайших, наливающих колоний. Пневмококки хорошо растут в бульоне с 0,2% глюкозой и с сывороткой. При культивировании в жидких средах появляются диффузные помутнения и образуется пылевидный осадок на дне. На желатине свежевыделенные штаммы не растут. Старые лабораторные штаммы могут давать мелкие беловатые колонии уже при 18° – 22° С. Желатин они не разжижают. На молоке растут хорошо, створаживая его с образованием кислоты. На кровяном ангаре вокруг колоний образуется зона неполного гемолиза с зеленовато-бурым окрашиванием среды, что является результатом перехода гемоглобина в метгемоглобин [54, 56, 145].

Пневмококки обладают довольно выраженной сахаролитической активностью. Они расщепляют: лактозу, глюкозу, сахарозу, мальтозу, инулин с образованием кислоты. Не ферментируют маннит. Протеолитические свойства у них выражены слабо: молоко они свёртывают, желатин не

разжижают, индол не образуют. Пневмококки растворяются в желчи.

Расщепление инулина и растворение в желчи является важным диагностическим признаком, отличающим *Streptococcus pneumoniae* от *Streptococcus pyogenes* [55, 125, 127].

На искусственных питательных средах пневмококки быстро отмирают (4 – 7 дней). Под слоем вазелинового масла в жидких и полужидких средах, содержащих белок, они сохраняют жизнеспособность в течение 3 – 12 месяцев. Высушивание пневмококки переносят хорошо: в сухой мокроте на рассеянном свете они сохраняются до 2 месяцев. При нагревании до 52° – 55°С погибают через 10 минут, при 60° С – еще быстрее. В растворе карболовой кислоты (3%) пневмококки погибают через 1 – 2 минуты. Особенно чувствительны пневмококки к оптохину. Под воздействием последнего они погибают при концентрации 1:1000000. У пневмококков обнаружен эндотоксин.

К пневмококкам более чувствительны белые мыши и кролики. Парентеральное введение вирулентных пневмококков через 24 – 48 часов вызывает гибель животных при явлениях сепсиса. При вскрытии на месте инъекции обнаруживается фибринозный экссудат; селезенка увеличена и гиперемирована [42, 43, 90, 134].

1.2 Стрептококковая (диплококковая) инфекция

Диплококковая инфекция (диплококкоз) – контагиозное заболевание телят, ягнят, реже поросят и жеребят, проявляющаяся сепсисом, энтеритом, пневмонией и поражением суставов [145, 146, 157].

Для возникновения инфекционного процесса необходимо, чтобы микроорганизм обладал способностью к синтезу веществ, обеспечивающих его сохранение и размножение в организме хозяина, а также подавлять активность иммунной системы и повреждать клетки и ткани микроорганизма

[145, 164]. Бактерии вида *Streptococcus pneumoniae* относят к одним из широко распространённых патогенов [27, 28, 29].

У *Str. pneumoniae* выявлены факторы вирулентности к которым относится полисахаридная капсула, протеаза секреторного иммуноглобулина (sIgA), пневмолизин, тейхоевые кислоты, фрагменты пептидогликана, поверхностный клеточный адгезин и аутолизин. Полисахаридная капсула (кодируется геном *cpsA*) проявляет антифагоцитарную активность, подавляя комплемент-зависимому лизису бактерий, а также индуцирует воспалительный процесс. К факторам патогенности Голтерий относятся так же адгезины, цитотоксины, гелюлизины и гидролитические ферменты, повреждающие клетки хозяина [43, 147, 154].

В настоящее время выявлены более 90 серотипов *Str. pneumoniae* из которых (только около 15 серотипов являются причиной инвазивных заболеваний). Представители различных серотипов отличаются по способности вызывать различные формы инфекции [131]. Пневмолизин, кодируемый геном *ply* относится токсину, способному вызывать лизис клеток бронхиального эпителия, поражающий эндотелий лёгочных артерий, а так же способный активировать систему комплемента по классическому пути. Этот токсин подавляет «дыхательный взрыв» при фагоцитозе и не карелирует с серотипом изолята [60]. Другой фактор - аутолизин (пептидогликангидролаза) представляет собой холин связывающий протеин, нековалентно связанный с фосфорилхолином тейхоевой кислоты клеточной стенки (кодируется геном *LytA*). Основное участие аутолизина в патогенезе пневмококковой инфекции заключается в высвобождении пневмолизина и других агентов, повреждающих клеточную стенку. Значительную роль в патогенезе стрептококкоза играют поверхностные компоненты клетки - пневмококковый адгезин А (*psaA*), поверхностный пневмококковый протеин (*pspA*) – холин, связывающий белок и пневмококковые поверхностные антигены А и С. Наличие генов, кодирующих синтез факторов вирулентности - пневмолизина, аутолизина, капсулы и поверхностного

протеина А (ply, lytA, cpsA и psaA) соответственно, свидетельствует о принадлежности исследуемого изолята к виду *Str. pneumoniae*. Эти гены являются специфическими маркерами видовой принадлежности к стрептококкам [56, 145, 146].

Патогенность микроорганизмов – определяется суммой биохимических механизмов, с помощью которых микробы вызывают болезнь. Термин патогенность при этом определяется как внутри видовая характеристика, ввиду того, что природные популяции бактерий состоят из множества клонов.

Носителями патогенности являются клоны или клоновая линия, содержащие в своей ДНК, так называемые участки патогенности [43]. Эти участки ДНК отвечают за транспорт эффективных молекул из цитоплазмы к бактериальной поверхности, где они взаимодействуют с белками клеток хозяина, вызывая их модификацию [43, 46, 72, 108].

Стрептококки по типоспецифическим антигенам подразделяют на серовары М, R, Т. По М-антигену выявлены более 100 сероваров в группе А, под Т-антигену – еще несколько десятков [102, 103, 127].

Пусковым механизмом инфекционного процесса является адгезия микроорганизмов к эпителию слизистых оболочек, что обеспечивает возможность быстрой их колонизации [31, 44, 145, 180]. Основным адгезином является липотейховая кислота, покрывающая поверхность фимбрии. Фимбриальный белок (или белок М) является основным фактором патогенности и типоспецифическим антигеном. Антитела к нему обеспечивают устойчивость к повторным заражениям. Белок М подавляет фагоцитоз за счёт связывания фибриногена, фибрина и продуктов его деградации, адсорбируя их на своей поверхности, маскируя рецепторы для компонентов комплимента и опсонинов, способствует размножению стрептококков в крови [42, 43, 178].

К факторам патогенности стрептококков относятся и экзотоксины различного действия: гемолизин, лейкоцидин, летальный токсин

(некротоксин). Кроме экзотоксинов патогенные стрептококки продуцируют различные ферменты: гиалуронидазу, фибринолизин, дезоксирибонуклеазу, рибонуклеазу, нейраминидазу, протеиназу, стрептокиназу, амилазу, липазу, а также эндотоксины, которые проявляют высокую термостабильность.

Факторы патогенности в сочетании с ферментами инвазии и агрессии обеспечивают паразитизм стрептококков в макроорганизме. Лейкоцидин вызывает разрушение лейкоцитов, подавляет фагоцитоз, гиалуронидаза обеспечивает проникновение бактерий в соединительную ткань, гемолизин вызывает разрушение эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, макрофагов [103, 127, 179].

Стрептококки могут довольно быстро менять свою патогенность, однако механизм изменчивости их патогенности до конца не расшифрован.

Факторы патогенности с точки зрения их роли в развитии инфекции делят на четыре группы: 1) определяющее взаимодействие бактерий с эпителием слизистых оболочек; 2) взаимодействующие с клеточными и гуморальными защитными механизмами хозяина и обеспечивающие размножение бактерий; 3) индуцирующие синтез цитокинов и медиаторов воспаления; 4) повреждающие органы и ткани (токсины и токсические продукты) [102].

Одним из первоначальных этапов инфекционного процесса является адгезия, то есть взаимодействие стрептококков с чувствительной клеткой эпителия хозяина. Адгезия имеет несколько стадий: приближение, неспецифическое взаимодействие клетки возбудителя с мембраной клетки хозяина, специфическое взаимодействие рецепторов бактериальных адгезинов с рецептором эпителиальной клетки и последующая колонизация слизистой [20, 26, 113, 153, 160].

Во взаимодействии бактерий с эпителиальными клетками основную роль играют гидрофобные явления. У стрептококков гидрофобность обусловлена содержанием липотейховой кислоты и некоторых белков [112].

Колонизацией эпителия патогеном не заканчивается формирование

микробного биоценоза. Продолжением колонизации является инвазия возбудителя в клетки хозяина. Однако процесс внедрения патогена в эпителиальные клетки изучен недостаточно и зависит от активности обоих участников данного процесса [92, 166, 171].

Увеличение частоты инвазивной стрептококковой инфекции за последние годы объясняют распространением клонов стрептококков с повышенной патогенностью [48, 53, 57, 73]. Для развития инфекционного заболевания необходимы координированные процессы, происходящие в клетках возбудителя и одновременный синтез факторов вирулентности [161, 163, 164, 174].

Пневмонийный стрептококк является постоянным обитателем слизистых оболочек респираторных органов, пищеварительного аппарата, иногда молочных желез животных. Однако после тяжёлых родов у коров, свиней, овец он вызывает мастит, эндометрит, а у новорождённого молодняка – септицемию, пневмонию, энтерит. Иногда данный микроорганизм называют диплококком пневмонии. Однако чаще диплококки обуславливают септицемию молодняка, а затем уже энтериты, артриты и реже пневмонию [49, 50, 62, 119].

При внедрении в слизистую оболочку респираторных органов, пищеварительного тракта, матки или вымени вирулентные диплококки продуцируют токсичные вещества, подавляющие фагоцитоз. Кроме того, капсульные диплококки противостоят разрушительному действию фагоцитарных ферментов. После поглощения фагоцитами, диплококки не разрушаются, а наоборот, вызывают гибель поглотивших их клеток. Токсичные вещества повышают проницаемость стенок сосудов, вследствие чего появляется отёчность тканей и кровоизлияния. Они также вызывают перерождение тканей, особенно печени, мышц сердца и почек. Размножение диплококков в крови обуславливает септицемию, что может привести к гибели новорождённых животных. При достаточной сопротивляемости организма или применении лечебных препаратов предупреждаются явления

токсикоза и септицемии, животные выздоравливают, приобретая иммунитет. Переболевшие в молодом возрасте животные могут оставаться длительное время скрытыми носителями диплококков на слизистых оболочках половых органов и вымени, что способствует стационарному неблагополучию. После тяжёлых родов или задержания последа вследствие ослабления устойчивости организма диплококки начинают размножаться и вызывают эндометриты и маститы, а также заражение новорожденного [1, 12, 23, 181]. Стрептококки могут обитать в носоглотке и миндалинах здоровых свиней, что может стать причиной сохранения инфекции в стаде.

1.3 Клиника и патоморфология стрептококковой (диплококковой) инфекции

Патогенные гемолитические стрептококки вызывают инфекционные процессы, сопровождающиеся образованием гноя. У телят, ягнят, жеребят проявляются пиемии и септицемии, артриты, лимфадениты, фарингиты, флегмоны, эндокардиты, воспаления легких и др. У поросят возникают менингоэнцефалиты, септицемии, энтероколиты, артрозоартриты, бронхопневмонии, лимфадениты, протекающие в основном острой и подострой формах [1, 57, 83, 181].

Болезнь обычно проявляется повышением температуры тела, угнетением, нарушением координации движений, отёками, артритами иногда диареей.

Летальность при стрептококкозе варьирует в зависимости от действия ряда различных факторов внешней среды, а также и от резистентности организма животных [49, 103, 126].

При диплококковой инфекции, вызванной *Streptococcus pneumonia*, инкубационный период у телят, поросят и ягнят составляет несколько дней (чаще 2 – 5). Продолжительность инкубационного периода зависит от

вирулентности возбудителя и резистентности макроорганизма [23, 64, 68, 115].

При подостром течении заболевание наблюдается сепсис, высокая температура, сильное угнетение, отказ от корма, осложняется воспалением суставов (чаще скакательных). Суставы становятся болезненными, припухшими горячими и развивается хромота. Для диплококковой инфекции у молодняка характерны перемежающиеся артриты: воспалительный процесс в одном суставе ослабевает, но возникает в другом. Нередко отмечают признаки пневмонии и энтерита. Длительность заболевания обычно продолжается 3 – 5 суток и может заканчиваться летальным исходом, либо переходить в хроническую форму.

Хроническое течение заболевание наблюдается у молодняка старшего возраста и сопровождается поражением органов дыхания: приступы болезненного кашля, обильное (вначале серозно-слизистое, а затем гнойное) носовое истечение. При аускультации лёгких устанавливают хрипы и шумы. Перкуссией обнаруживают очаги притупления. При плеврите устанавливают болезненность в межрёберных промежутках. Лихорадка перемежающегося типа [22, 23, 134].

После заражения у поросят инкубационный период в среднем составляет 3 – 7 суток. Заболевание может протекать сверхостро, остро и хронически. Сверхострое (септико-токсическое) течение бывает у поросят в возрасте до 1 месяца и характеризуется повышением температуры до 41° С, слабостью, учащением пульса и дыхания и быстрой гибелью (через 3 – 10 часов). Острое (септическое) течение чаще наблюдается у 1 – 4 месячных поросят и проявляется, кроме признаков сепсиса, симптомами поражения пищеварительного тракта (диарея, каловые массы жидкие с примесью слизи и крови, болезненность брюшной стенки), нередко – лёгких (носовое истечение, кашель) и суставов. Заболевание продолжается несколько дней, но может принять хроническое течение, при котором клинические признаки у молодняка животных всех видов примерно одинаковы. По данным

Кудряшова А.А., Гричухина А.Н. [68] часто стрептококковая инфекция у новорождённых поросят сопровождается серозно-гнойным дерматитом с образованием струпьевидных, жирных на ощупь наложений на коже в области головы, шеи, спины, реже на других участках тела. Болезнь нередко совпадает по времени и по возбудителю с маститом или метритом у свиноматки. В гнезде поражается от одного до пяти-семи поросят [65, 66, 67, 126, 141].

У ягнят заболевание протекает сверхостро или остро. При остром течении температура повышена незначительно или остаётся в пределах нормы.

У животных внезапно пропадает аппетит, отмечают слюнотечение, истечения из носа, отёк головы, шаткую походку, часто понос, парезы конечностей, потерю зрения. Длительность заболевания составляет 2 – 4 дня [57, 69, 139].

По данным Бессарабова Б.Ф. с соавт. [49] возбудителем энтерококковой (диплококковой) септицемии молодняка животных является стрептококк серогруппы D (энтерококк) – *Diplococcus septicus*. Диплококковая инфекция протекает сверхостро, остро, подостро и хронически и проявляется в виде пневмонии, энтерита, полиартрита и сепсиса у молодняка, у взрослых животных в форме послеродовых эндометритов и маститов [66, 69, 73].

По локализации инфекционного процесса различают септико-токсическую, лёгочную, кишечную, суставную и смешанную формы проявления болезни. Инкубационный период составляет обычно 1 – 2 дня и реже до 1 недели. Для ягнят характерно сверхострое и острое течение болезни; для телят, поросят и жеребят – острое и подострое [68].

При сверхостром течении (септико-токсическая форма) молодняк отказывается от корма, появляется мышечная дрожь, температура тела повышается до 42° С, дыхание учащено, отмечают хрипы, выделения из носовых отверстий пенистой жидкости, фекалии жидкие, с примесью крови.

Животные погибают в течение нескольких часов. При остром и подостром течении у телят и жеребят отмечают повышенную температуру тела, учащённые пульс и дыхание, слабость, пониженный аппетит, нередко артриты. При отсутствии своевременной помощи животные погибают за 2 – 3 дня. Хроническое течение энтерококковой септицемии характерно для телят и жеребят старше 2 – 4 месяцев, для ягнят и поросят старше 1 – 2 месяцев. У больных появляются вялость, серозно-слизистое и гнойное истечение из носа, болезненный кашель и потеря аппетита.

При лёгочной форме устанавливают плеврит, сухие и влажные хрипы. Кишечная форма протекает диарией с выделением слизи и крови. Болезнь иногда продолжается до 2 месяцев. Переболевшие животные отстают в росте и развитии [34, 35, 57, 137].

Патологоанатомическая картина при диплококковой инфекции характеризуется наличием в брюшной полости геморрагического экссудата. По данным ряда авторов [49, 57, 58, 73] на слизистой оболочке желудка (сычуга) регистрируются кровоизлияния, печень и селезёнка отёчны и увеличены. В легких выявляют уплотнения, гнойники, спайки плевры и сердечной сумки. В синовиальной жидкости суставов обнаруживают хлопья фибрина, изъязвления хрящей. Патологические изменения иногда локализуются как в органах дыхания, так и в органах пищеварения, а также в суставах [25, 49, 57, 58, 63].

При вскрытии телят, павших с признаками диплококковой септицемии, выявляли геморрагическую инфильтрацию подкожной клетчатки, гиперплазию лимфатических узлов, гиперемиию и множественные кровоизлияния на серозных и слизистых оболочках и во внутренних органах [47, 57, 73, 96]. При этом селезёнка была резко увеличена в объёме с напряжённой капсулой, закруглёнными краями, с характерной каучукоподобной (резиноподобной) консистенцией. На разрезе она была окрашена в тёмно-коричневый цвет. Микроскопически, формирующиеся лимфатические узелки, обнаруживались в паренхиме селезенки, вокруг

центральных артерий, пикноз ядер гладкомышечных клеток и фибробластов трабекулярного аппарата селезёнки.

Печень у больных животных характеризовалась увеличением объёма и неравномерно серо-глинистой окраской. Желчный пузырь был переполнен густой желчью. Отмечалась белково-жировая дистрофия печени.

Выявлены нарушения структуры почек, лёгких и кишечника [40, 48, 57, 58]. При гистологическом исследовании материала от больных поросят ряд исследователей [24, 126] обнаруживали диффузный гнойный менингит и инфильтрацию мозговых оболочек нейтрофилами, гиперемию сосудов мозговых оболочек и умеренное увеличение количества спинномозговой жидкости. При стрептококковой септицемии у поросят в патологоанатомической картины доминируют застойно-геморрагические явления, геморрагический гастроэнтерит, геморрагический лимфаденит, мелкие очаги некроза в печени, селезёнке и других органах. Отмечаются также фибринозно-гнойный перикардит, геморрагический некротический миокардит, клапанный эндокардит [24]. При вскрытии поросят, павших в результате диплококковой септицемии отмечали признаки гнойно-фибринозного полиартрита, метастатические абсцессы в печени, почках и головном мозге, а также в лимфатических узлах [24].

Таким образом, клиника и патоморфология стрептококковой инфекции у животных может быть разнообразной, что обусловлено биологическими свойствами стрептококков, условиями содержания и кормления животных, их видовыми и половозрелостными особенностями.

1.4 Эпизотический процесс при стрептококковой (диплококковой) инфекции

Стрептококки относятся к повсеместно распространённым микроорганизмами и составляют определённую часть нормальной флоры

кожного покрова и слизистых оболочек животных. За последние годы установлена их роль в этиологии целого ряда патологий, характеризующихся поражением локальных участков (абсцесс), отдельных тканей, органов, систем органов и всего организма [17, 83]. Стрептококковые инфекции поражают многие виды млекопитающих и птиц [1, 34, 35].

Стрептококкозы у молодняка сельскохозяйственных животных характеризуются тяжёлыми септическими явлениями, воспалением органов дыхания, желудочно-кишечного тракта и суставов. У взрослых самок млекопитающих заболевание протекает в виде эндометритов и маститов [47, 50, 61, 84, 93].

Диплококковая инфекция телят, ягнят и поросят часто проявляется в виде энзоотических вспышек повсеместно и наносит хозяйствам значительный экономический ущерб [1, 15, 23, 34, 36, 37, 57].

Стрептококкозу наиболее восприимчивы молодняк первых дней жизни, реже болеют поросята с 2 – 3 месячного возраста [49, 50]. Источниками инфекции являются больные и переболевшие животные, выделяющие диплококки с носовыми истечениями, с мочой, фекалиями, а также взрослые животные – бактерионосители. У них могут быть диплококковые маститы, эндометриты. Они выделяют возбудитель с молоком и истечениями из половых путей. Имеются сообщения о том, что около 20% коров, больных маститом, выделяют с молоком вирулентные диплококки [41].

Первоисточником возбудителя в хозяйствах чаще являются именно взрослые животные, от которых заражается молодняк. Новорождённые животные заражаются при совместном содержании с больным молодняком в основном аэрогенным и реже алиментарным путём. Возможно заражение через слизистые оболочки глаз, кожу, внутриутробно [54, 137].

Ягнята и поросята в основном заражаются через молоко или при сосании вымени, загрязнённого выделениями из половых путей. Возбудитель передаётся так же через посуду для выпойки телят, руки ухаживающего

персонала, подстилку, но первостепенное значение у телят имеет респираторное заражение.

При антисанитарном состоянии ферм вспышки болезни у молодняка могут возникать ежегодно, но преобладают спорадические случаи, которые обычно возникают в период массовых отёлов, окотов и опоросов [100, 118, 134, 137, 139].

Предрасполагающим фактором к заболеванию является ослабление резистентности и нарушения условий содержания кормления [55, 57]. Вспышки диплококковой инфекции возникают, главным образом, в зимние и весенние месяцы. После переболевания формируется иммунитет продолжительностью до 1 года [54, 57].

Многие авторы [12, 35, 84, 105, 120] отмечают значительный уровень распространённости стрептококкоза среди молодняка сельскохозяйственных животных на территории РФ. Так, по данным Болоцкого И.А. с соавт. [23, 24] в Краснодарском крае стрептококкоз поросят чаще регистрируется в зимне-весеннее время в виде энзоотических вспышек. При этом по частоте выделения из патологического материала стрептококки занимали второе место после кишечной палочки. Заболеваемость свиней составляла 0,3%, летальность достигал 30,9%, а количество неблагополучных пунктов – 1,6%. По данным авторов первичным источником инфекции в хозяйствах являлись свиноматки, больные эндометритом и маститом, а также скрытые носители стрептококков. В большинстве случаев стрептококкоз у поросят протекал спорадически, реже он приобретал энзоотический характер. Вспышки стрептококкоза наблюдаются в период опоросов, реже зимой, чаще весной, летом и осенью [23, 24, 84, 115, 120, 124, 126].

А.М. Абловым с соавт. [1] установлено, что на территории Прибайкалья по данным обследований 2004 – 2011 гг частота выделения возбудителей стрептококкоза у птиц составила 84,1%, у млекопитающих – 34,1%. Среди млекопитающих стрептококки чаще всего выделяли от собак, кошек, кроликов, нерпы, реже - у крупного рогатого скота.

Этиологическая структура стрептококкоза довольно разнообразна и представлена бактериями шести видов (*Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Str. pyogenes*, *Str. cremoris*). У свиней и мелкого рогатого скота существенное значение имеют штаммы *Str. Pneumoniae* [1].

В Северном регионе НЗ РФ, в том числе и в Вологодской области, на протяжении многих лет наблюдалась высокая заболеваемость новорождённых телят с картиной поражения желудочно-кишечного тракта. Причем, эта величина довольно постоянная и не имеет тенденции к снижению. Из инфекционных болезней новорождённых телят в области значительную роль играет диплококкоз [35].

По данным Пономарёвой И.С. и Шамовой Е.В. [105] в структуре заболеваемости крупного рогатого скота в Оренбургской области по числу неблагополучных пунктов диплококкоз регистрировался только 0,41%.

Исследования, проведённые рядом авторов на территории Среднего Поволжья, свидетельствуют о значительной распространённости стрептококкоза среди молодняка сельскохозяйственных животных (в среднем 15 – 25% от общего числа выделенных изолятов бактерий приходится на долю микроорганизмов рода *Streptococcus*) [12, 120, 124].

Лабораторными исследованиями Спиридонова А.Г. [120] установлено, что наиболее часто инфекционную диарею новорождённых телят и поросят в регионах Среднего Поволжья вызывали кишечная палочка и стрептококки. Аналогичные данные получены и в регионе Предуралья, где стрептококки (диплококки) составляли 24,4% [62, 63, 64].

Медведевой Л.В. и Густокашиным К.А. [84] в Алтайском крае выявили периодические подъемы и снижения уровня заболеваемости крупного рогатого скота диплококкозом, как во времени, так и в пространстве по территории обследованных районов. При этом авторы отмечают резкое снижение заболеваемости животных в последние десятилетие.

А.В. Молокова с соавт. [88] и Петрова О.Г. и Кольберг Н.А. [57] часто от телят с признаками респираторных инфекций изолировали культуры стрептококков. При этом выявлены различные ассоциации вирусов и бактерий. Часто инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота протекал в ассоциации с диплококкозом [97, 105].

Результаты лабораторных исследований биоматериала от больных телят при массовых вспышках респираторных болезней показывают, что из проб органов респираторного тракта часто выделяются бактерии *Streptococcus pneumoniae* [34].

Результаты исследовательской работы Дарменовой А.Г. и Юсупова С.Р. [40] свидетельствуют о значительной роли диплококков в возникновении послеродовых эндометритов у коров.

1.5 Диагностика стрептококковой (диплококковой) инфекции

Диагноз на стрептококкоз ставят с учётом эпизоотологических данных, клинических признаков, патологоанатомических изменений, но окончательный диагноз устанавливают лабораторными методами - после выделения возбудителя.

В лабораторию направляют кровь из сердца, печень, селезёнку, головной мозг и трубчатую кость. При поражении дыхательной системы отбирают кусочки лёгкого, взятые на границе здоровой и поражённой тканей, средостенные лимфатические узлы, при артритах – синовиальную жидкость. Трупы мелких животных направляют целиком. Для прижизненной диагностики, кроме того, применяют посев из крови животных [13, 17, 19, 70, 71, 85].

Лабораторная диагностика стрептококкоза включает:

1. Микроскопию мазков – отпечатков из патологического материала или биологических жидкостей животных;
2. Выделение культуры возбудителя на питательных средах с

последующей идентификацией с применением стрептококковых групповых диагностических сывороток в серологических реакциях (преципитации, коаггуляции, латекс-агглютинации и др.);

3. Определение патогенности, выделенных изолятов.

Стрептококки – факультативные анаэробы, некоторые разновидности – аэробы, более требовательны к питательным средам, чем стафилококки.

Температурный оптимум роста стрептококков составляет 37 – 38° С, рН среды 7,2 – 7,4. Они хорошо растут в МПБ с добавлением 1% глюкозы и 15 – 20% сыворотки крови лошади, на МПА – с 1% глюкозой и 10% дефибринированной кровью барана или кролика.

В жидких питательных средах наблюдают придонный и пристеночный рост, помутнение бульона, образование рожковидного осадка. На МПА бактерии формируют мелкие (0,5 – 1 мм в диаметре) серовато-белые колонии. На кровяном агаре вокруг колоний образуется зона просветления – β -гемолиз. Стрептококки могут вызывать α -гемолиз, т.е. вокруг колоний наблюдают зеленую зону гемолиза, вследствие превращения гемоглобина в метгемоглобин [1, 54, 57, 70].

Патогенные стрептококки биохимически малоактивно. Наиболее активен маститный стрептококк, который ферментирует глюкозу, сахарозу, мальтозу, салицин, свёртывает молоко, некоторые штаммы способны ферментировать раффинозу, трегалозу, инулин и непостоянно - салицин.

Диагноз на стрептококкоз считается установленным при выделении культуры возбудителя, обладающей патогенностью для белых мышей [14, 18, 56, 62].

По данным Кисленко В.Н., Колычева Н.М., Госманова Р.Г. и др. [55] при диплококковой инфекции наиболее достоверно бактериологическое исследование. У коров, овец, свиней исследуют выделения из половых органов при эндометрите, а также молоко при мастите. При заболевании молодняка в лабораторию посылают трупы или головной мозг, трубчатые кости, суставы, селезёнку, кровь сердца [14, 49, 57].

Из патологического материала готовят мазки – отпечатки и окрашивают по Граму. Обнаружение в препаратах большого количества грамположительных кокков, округлых или ланцетовидных, расположенных по одиночно, по два, цепочками и скоплениями, позволяет предполагать стрептококковую инфекцию. Однако полиморфизм микроорганизмов, иногда наблюдающийся при лечении животных антибиотиками, затрудняет, а часто вообще исключает возможность микроскопической идентификации микробов. Поэтому проводят изучение культурально-биохимических свойств и патогенности изолятов. На глюкозо-кровяном агаре стрептококки растут в виде мелких росинчатых, прозрачных или слегка мутноватых колоний с ровными краями, окружённых, как правило, зоной гемолиза. По характеру гемолиза стрептококки делят на 3 группы:

- α -гемолитические стрептококки – вызывают неполный гемолиз эритроцитов, характеризующийся образованием вокруг колоний зеленоватой зоны гемометаморфоза;
- β -гемолитические стрептококки – вызывают полный гемолиз эритроцитов, характеризующийся образованием вокруг колоний зоны просветления;
- γ -гемолитические стрептококки – не вызывают гемолиза эритроцитов.

Высевы делают на МПА, МПБ, но обязательно на полужидкий и кровяной агар. Для биопробы пульпой селезёнки, разведённой МПБ 1:5, заражают внутрибрюшинно мышей в дозе 0,5 мл. При наличии стрептококков мыши гибнут в течение 1 суток. Культуру признают патогенной при гибели не менее двух белых мышей из трех. Из спинного мозга, крови из сердца, печени и селезёнки каждой павшей мыши делают посевы на глюкозо-кровяной агар и глюкозо-сывороточный бульон для выделения исходной культуры [14, 62, 69, 70].

Из крови сердца проводят высевы на среды, готовят мазки и окрашивают их по Романовскому. Стрептококки окружены нежной розовой

капсулой. На питательных средах вырастают характерные колонии.

Изоляты стрептококков дифференцируют на основании результатов определения их чувствительности к желчи, способности расти на питательных средах с повышенным содержанием хлорида и редуцировать метиленовую синь, а также терморезистентности и ферментативных свойств. При необходимости дифференцировать стрептококки от стафилококков используют каталазную пробу и способность стафилококков расти на средах, содержащих 10% хлорида натрия (стрептококки при указанной концентрации хлорида натрия не растут) [55, 58, 59, 70, 89].

Для прижизненной диагностики стрептококкоза используют метод получения гемокультур. Для этого у больных телят, ягнят стерильным шприцом берут кровь из яремной вены и засевают по 2 – 3 мл в пробирки с полужидким агаром, хорошо смешивают со средой и помещают в термостат. Через 1 – 2 суток из них делают высеv на кровяной агар, выращивают сутки. При положительном диагнозе на кровяном агаре вырастают колонии, окружённые зоной гемолиза, а в мазках обнаруживают стрептококки [46, 49].

По данным Медведева А.П. с соавт. [82] при дифференциации стафилококков от стрептококков достаточной является постановка тестов по ферментации маннита, образованию каталазы и роста на средах с добавлением 10% поваренной соли.

Пневмококки (*Str. pneumoniae*) имеют вытянутую форму, напоминающую пламя свечи. Располагаются они попарно, каждая пара окружена капсулой. Под капсулой расположен М-белок, по свойствам схожий с *Str. pyogenes*, но имеющий свою антигенную (АГ) специфичность [56].

На плотных питательных средах, содержащих сыворотку или кровь, пневмококки растут, образуя мелкие колонии, окружённые зоной позеленения (на кровяном агаре). В жидких средах дают равномерную муть.

Биохимическая активность их выражена умеренно – расщепляют ряд углеводов и образуют гиалуронидазу, мурамидазу, пептиназу.

В характеристике видовой специфичности имеет определённое значение нуклеопротеиновый антиген, который расположен в глубине цитоплазмы пневмококков. Ближе к поверхности клетки находится видоспецифический соматический полисахаридный С-антиген. На поверхности цитоплазмы находится типоспецифический протеиновый М-антиген.

Внутри вида *Str. pneumoniae* различают 84 сыровара, агглютинирующихся только соответствующими типовыми сыворотками.

Антигенная структура пневмококков под влиянием различных физических и химических факторов может быстро изменяться, что сопровождается формированием на агаре переходных, а затем шероховатых колоний, потерей капсул, вирулентности, гемолитических и иммуногенных качеств, а также повышением биохимической активности [62, 127, 145].

Для выделения клеток возбудителя необходимы: оптимальная питательная среда и условия культивирования, правильное взятие исследуемого материала. Выделенные изоляты идентифицируют по ряду признаков и дифференцируют от зеленающего (альфа-гемолитического) стрептококка и энтерококков. Пневмококки, имеющие капсулу, подвергают серологическому типированию и определяют чувствительность микроорганизмов к антимикробным препаратам [56, 89, 90].

Энтерококки (*Str. faecalis*) – фекальные стрептококки, энтерококки – являются обитателями кишечника человека и теплокровных животных и входят в группу D. Морфологически они имеют шаровидную или овальную форму, при делении соединяются в пары или короткие цепочки, полиморфны, некоторые штаммы подвижны, имеют 1 – 4 жгутика.

Ферментативная активность их является непостоянным признаком. Большинство штаммов энтерококков, выделяемых от больных проявляют устойчивость к пенициллину, неомицину, обладают ферментами патогенности – коагулазой, гиалуронидазой, ДНК-азой, фибринолизинном, протеиназой, муромидазой. При пересевах в лаборатории эти ферменты

обычно перестают выделяться [58, 85, 103].

Стрептококковые антигены в крови выявляют в реакции связывания комплемента с иммунными кроличьими сыворотками (по В.И. Иоффе); в моче – в реакции преципитации (по И.М. Лямперт). Определяют наличие антигиалуронидазы и анти-О-стрептолизина в крови для диагностики нефрита [14].

О-стрептолизин обладает способностью лизировать эритроциты кролика. В присутствии антител (анти-О-стрептолизина) в сыворотке лизис эритроцитов не происходит. Кроме того, для типизации диплококков используют реакцию агглютинации и метод иммунофлюоресценции, который позволяет выявить стрептококки в смешанной популяции микробов, если эту популяцию обработать флюоресцирующей антисывороткой к стрептококкам [14, 49, 54, 62, 63, 80].

Следует отметить, что диагностика стрептококковой инфекции является довольно трудоемкой и сложной задачей, требующей разностороннего подхода и тщательной работы по изоляции и типизации возбудителя.

1.6 Иммуниет и специфическая профилактика стрептококковой (диплококковой) инфекции

Стрептококкоз относится к факторным инфекциям. У животных часто отмечают бактериеносительство, тем не менее после переболевания стрептококковой инфекцией животные приобретают иммунитет. Поскольку в патогенезе стрептококкоза играет важную роль токсический фактор, то иммунитет связан с антитоксическими и антибактериальными факторами [49, 107].

Иммунитет при диплококковой инфекции обусловлен наличием главным образом антитоксинов, действующих против токсичных веществ,

выделяемых этими микроорганизмами во внешнюю среду, а также содержащимися в их капсуле и цитоплазме компонентов. После естественного переболевания чаще формируется нестерильный иммунитет, сопровождающийся скрытым носительством диплококков в организме животных [28, 57, 118].

Трудность создания пневмококковых вакцин заключается в большом (не менее 83) количестве серотипов возбудителя. Кроме того, полисахаридные вакцины обладают слабой иммуногенностью у молодняка. Антитела сохраняются 5 – 8 мес. после вакцинации [26, 27]. Местные реакции на введение вакцины сопровождаются покраснением и болезненностью в месте инъекции [86].

Для профилактики стрептококковых заболеваний молодняка применяют диплококковую формол вакцину и для пассивной иммунизации используют гипериммунную сыворотку против диплококковой инфекции [28, 29].

Вакцину, а также антиген для гипериммунизации волов – продуцентов сыворотки готовят из трёх иммуногенных штаммов, выделенных от телят, ягнят и поросят путём выращивания их на питательной среде в реакторах, с последующим обезвреживанием формалином. Сыворотку готовят путём гипериммунизации волов живой диплококковой культурой.

Вакцину против диплококковой септицемии телят, ягнят и поросят готовят из штаммов *S. pneumoniae*, выделенных от указанных видов животных. Культуры выращивают на полужидком агаре, инактивируют 0,4% раствором формалина, проверяют на стерильность, безвредность (на морских свинках), активность (на белых мышах).

Для профилактики заболеваний животных используют инактивированные вакцины, которые чаще всего в качестве адъюванта содержат гидроокись алюминия. Однако по данным ряда авторов [28, 29, 51] такие вакцины не обладают достаточной эффективностью. Связано это в первую очередь с антигенной вариабельностью стрептококков, а также

отсутствием в их составе капсульной субстанции и анотоксинов.

Имеются данные об использовании в качестве адъюванта спиртового раствора прополиса, который обладает антибиотическим, против грибковым действием, стимулирует иммунобиологические процессы, повышая фагоцитарную активность лейкоцитов. В результате авторами данных исследований получены положительные результаты, свидетельствующие о высокой эффективности применения экспериментальной вакцины [16, 51]. После переболевания молодняка стрептококкозом формируется активный иммунитет продолжительностью до 1 года, но животные длительное время остаются бактерионосителями [57, 69]. Для специфической профилактики стрептококкоза (диплококковой септицемии) телят, ягнят, поросят авторы предлагают применять: вакцину против энтерококковой инфекции телят, ягнят и поросят; вакцину против пастереллеза, паратифа и диплококковой септицемии поросят; вакцину, депонированную против стрептококкоза свиней серогрупп С и D, а также формол-гидроокись алюминиевую вакцину против стрептококкоза крупного рогатого скота [23, 24, 26, 29, 51]. Для профилактики стрептококкоза жеребят рекомендуют убитую бета-пропиолактоном ГОА-вакцину из *Str. equi* или концентрированный очищенный экстракт М-протеина *Str. equi* [49].

Предложена и формол гидроокись алюминиевая вакцина против стрептококкоза крупного рогатого скота. По данным авторов активный иммунитет после вакцинации наступает через 7 – 10 дней и длится до 4 месяцев [24]. Кроме того, для профилактики стрептококкоза поросят предложена гипериммунная сыворотка. Однако пассивный иммунитет у привитых сывороткой животных длится только 12 – 14 дней [24].

Обобщая изложенное, следует отметить, что против стрептококкоза рекомендовано несколько поливалентных инактивированных вакцин. Однако имеющиеся данные свидетельствуют о недостаточности иммунитета, так как возникновению болезни оказывают влияние ряд факторов: условия содержания, кормления, бактерионосительство, антигенная вариабельность

возбудителя, а также антитоксический фактор иммунного ответа. Поэтому актуальной задачей остается изыскание более эффективных средств специфической профилактики стрептококкозов у сельскохозяйственных животных. Учитывая выраженную антигенную вариабельность стрептококков и недостаточную эффективность биофабричных препаратов большой интерес представляют вакцины на основе местных штаммов.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследований

Диссертационная работа выполнялась в период с 2014 по 2019 гг на базе кафедры биологической и неорганической химии ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» и в хозяйствах Республики Татарстан среднего Поволжья.

Исследования с заражением лабораторных животных проводились в условиях вивария ФЦТРБ – ВНИВИ (выражаем благодарность руководству центра и зав. лабораторией д.б.н. Г.Н. Спиридонову за предоставленную возможность проведения экспериментов). Эксперименты на поросятах проводили в ООО «Агрокам» Рыбно-Слободского района и в ООО «Берлек» Бавлинского района. Из патматериала, привезенного из различных хозяйств Республики Татарстан и Российской Федерации, были выделены различные виды микроорганизмов, в том числе бактерии рода *Streptococcus*, которые использовались в дальнейшей работе.

В опытах использовали 286 беспородных белых мышей, 12 кроликов, 289 поросят и 20 свиноматок.

Проведены бактериологические исследования 1045 проб патологического и биологического материала из 102-х хозяйств Поволжского региона.

При определении патогенности возбудителей, реактогенности, иммуногенности и безвредности вакцин, использовали белых мышей. В работе использовались животные, подобранные по принципу аналогов, что подразумевает их однотипность по упитанности, физиологическому состоянию, породной принадлежности, возрасту. Кормление животных соответствовало рационам, утвержденным для соответствующих видов и половозрастных групп животных.

Сконструированные опытные серии инактивированных вакцин против

стрептококкоза сельскохозяйственных животных исследовали на лабораторных животных (белые мыши) и свиньях в условиях хозяйства.

2.1.1 Материалы

Питательные среды.

Питательные среды получали из лаборатории питательных сред и культур клеток ФГНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», а также готовили сами согласно соответствующих руководств [70, 106, 107].

Культуры стрептококков поддерживали путем пересева в среде Китта-Тароцци.

При проведении исследований использовали:

- мясо-пептонный бульон (МПБ),
- мясо-пептонный агар (МПА),
- бульон и агар Хоттингера на основе мясного перевара с содержанием аминного азота 220 – 250 мг % и добавлением твин-40 и глюкозы,
- мясо-пептонный полужидкий агар (МППА) с содержанием 0,15 – 0,3% бакто-агара,
- МПБ и МПА с добавлением сыворотки крови,
- среда Китта-Тароцци на основе бульона Хоттингера с кусочками печени и под вазелиновым маслом,
- среды Гисса с углеводами,
- кровяной МПА, содержащий 5% дефибринированную кровь барана,
- полусинтетическая среда на основе гидролизата лактоальбумина.

2.1.2 Методы исследований

Для получения общей картины эпизоотии стрептококкоза сельскохозяйственных животных, особенностей возникновения и распространения заболевания среди животных в хозяйствах Среднего

Поволжья были изучены материалы отчётов обследованных хозяйств, а также бактериологические исследования, которые проводились согласно «Методических указаний по эпизоотологическому исследованию» (утвержденных ГУВ МСХ СССР, 1982), и [Бакулов И.А., Буткин Е.И., Ведерников В.А. и др. Эпизоотология с микробиологией / И.А. Бакулов, Е.И. Буткин, Е.И. Ведерников и др. Под ред. И.А. Бакулова. – 3-е изд. Перераб. и дополн. – М.; Агропромиздат, 1987. – 415 с.].

Экспериментальные исследования на животных проводили в виварии ФГНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» и в условиях хозяйства ООО «Агроком».

Клинические методы исследований. После введения животным инактивированных вакцинных препаратов они подвергались клиническому наблюдению.

В условиях свиноводческих ферм клиническое течение болезни и её исход исследовали у поросят, а также у свиноматок. В ходе наблюдения у животных контролировали изменения температуры тела, частоты дыхания и пульса.

Бактериологические исследования состояли из посева исследуемых объектов и культур микроорганизмов на питательные среды, определение их чистоты и проведение идентификации изолятов; далее культуры высевали на специальные среды для определения их биохимических свойств и проведения биопробы на лабораторных животных [13].

Выделение стрептококков, изучение их культуральных, морфологических, ферментативных, патогенных и антигенных свойств, проводили согласно «Методическим указаниям по лабораторной диагностике стрептококкоза животных», утвержденных 25.09.1990 г. ГУВ СССР, «Методическим указаниям по бактериологической диагностике смешанных кишечных инфекций» (Москва, 2000) и с использованием тест-систем, произведенных STREPTO test 16.

Для исследований использовали патологический материал от больных и павших животных, в частности, селезёнку, сердце перевязанное лигатурой

у аорты, почки, долю печени с желчным пузырем, брыжеечные лимфоузлы, экссудаты грудной и брюшной полости, при необходимости и головной мозг. Для прижизненной диагностики исследовали фекалии, мочу, кровь, слюну, молоко, выделения из носа и влагалища.

Для исследования инаktivированных вакцин против стрептококкоза свиней на безвредность их вводили подкожно белым беспородным мышам массой 18 – 20 г. Серологические исследования проводили согласно общепринятых методов [13, 70].

Определение серотиповой принадлежности отдельных штаммов стрептококков проводили по методу Гриффитса и с типоспецифическими сыворотками ООО «НПП Аквапласт». Для этого типовую сыворотку разводили стерильным физиологическим раствором хлористого натрия 1:10. Каплю разведенной сыворотки наносили на предметное стекло. Затем в нее наносили небольшое количество микробной массы с бактериальной петлей. Смесь тщательно растирали. При положительной реакции через 3-5 мин. Наблюдалось агглютинация с образованием комочков и просветление взвеси. Для постановки пробирочной реакции агглютинации использовали 2 млрд. суспензию в физиологическом растворе хлорида натрия.

Для установления иммуногенности образцов инаktivированных вакцин определяли количество выживших иммунизированных белых мышей после введения им летальной дозы вирулентного штамма возбудителя стрептококкоза, которая была выявлена предварительным титрованием.

В производственных условиях биопрепараты испытывали в свиноводческом хозяйстве Республики Татарстан. Для этого использовали ИБФГОА вакцину против стрептококкоза свиней, разработанную нами.

В качестве предмета научных исследований и производственных испытаний применялись опытные образцы вакцин, изготовленные по разработанному нами лабораторному регламенту и животные.

В процессе проведения научной работы использовались диагностикумы, реактивы, наборы, тест – системы; формалин (ХЧ),

содержание формальдегида в котором соответствует ГОСТ-1625-61 и составляет соответственно не менее 36%; гидроокись алюминия, произведенный в Ставропольской биофабрике. Гематологические, биохимические и иммунологические исследования проводили по методам, представленных в соответствующих руководствах [9, 13, 70, 107].

В процессе работы проводилась статистическая обработка цифровых материалов на персональном компьютере Dell. В качестве рабочих программ использовались приложения пакета «Microsoft», «Microsoft Word» и «Microsoft Excel». При этом руководствовались методикой Р.Х. Тукшаитова [130].

Научные исследования по теме диссертационной работы проводили по схеме (Рис.1).



Рис.1 – Схема проведения исследований

2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1 Анализ эпизоотической обстановки по стрептококкозу сельскохозяйственных животных в хозяйствах Среднего Поволжья и изучение культурально-морфологических свойств стрептококков, выделенных из различных объектов

В процессе мониторинга отдельных хозяйств (ферм) Среднего Поволжья, неблагополучных по респираторным и желудочно-кишечным заболеваниям, проводили эпизоотологические, клинические и патологоанатомические исследования, а также отбор биологического и патологического материала для лабораторных исследований. Основным направлением нашей лабораторной работы являлось выделение из полученных проб и идентификация микроорганизмов, относящихся к роду *Streptococcus*.

Всего в период с 2014 по 2019 годы было исследовано 1045 проб из 102 хозяйств, отобранных нами и доставленных из отдельных хозяйств.

Работу проводили согласно «Методических указаний по лабораторной диагностике стрептококкоза животных», утвержденных 25.09.1990 г. ГУВ МСХ СССР, при использовании «Методических указаний по бактериологической диагностике смешанных кишечных инфекций» (Москва, 2000). Серогрупповую принадлежность выделенных стрептококков определяли с помощью наборов диагностических сывороток для постановки реакции коаггутинации и преципитации («Аквапаст» Санкт-Петербург).

Для бактериологического исследования использовали патологический материал от больных и павших животных, для прижизненной диагностики использовали кровь и выделения (слюна, слизь, фекалии).

В процессе бактериологических исследований патологического и биоматериала выделили и идентифицировали 407 бактериальных изолятов, из которых стрептококки составили 24,3% (99 изолятов). Результаты

бактериологических исследований представлены в табл. 1.

Таблица 1 – Результаты бактериологических исследований

Года	Количество исследованных хозяйств	Количество исследованных проб	Выделено бактериальных изолятов	Из них стрептококки	
				количество	%
2014	36	215	71	24	33,8
2015	20	210	90	25	27,8
2016	23	268	81	12	14,8
2017	12	227	100	23	23,0
2018- 2019	11	125	65	15	23,,0
Всего	102	1045	407	99	24,3

В 2014 году было исследовано 215 проб патологического материала от павших телят и поросят из 36 хозяйств. Выделены и изучены культурально морфологические и вирулентные свойства 24 изолятов стрептококков, что составляет 33,8% от общего числа изолятов бактерий. В патологическом материале из 33 (89,2%) хозяйств были обнаружены бактерии рода *Streptococcus*.

В 2015 году было исследовано 210 проб патологического материала отпавших телят и поросят из 20 хозяйств. При этом на основании изучения культурально-морфологических и вирулентных свойств 25 изолятов отнесены к стрептококкам, что составляет 27,8% от общего числа выделенных культур бактерий. При исследовании проб из 20 хозяйств лишь из материала двух хозяйств бактерии рода *Streptococcus* не были выявлены, что составляет 10% от общего числа исследованных хозяйств, а в остальных хозяйствах (90%) заболеваемость стрептококкозом была высокая.

За 2016 год проведен бактериологический анализ проб из 23 животноводческих хозяйств, исследовано 268 проб биологического и патологического материала от больных и павших телят и поросят. На

основании изучения культурально-морфологических, биохимических и вирулентных свойств 12 культур были отнесены к роду *Streptococcus*, что составляет 14,8% от общего числа выделенных изолятов бактерий. Из патологического материала из 16 (69,6%) хозяйств были выделены бактерии рода *Streptococcus*.

За 2017 год проведено бактериологическое исследование 227 проб из 12 животноводческих хозяйств. На основании изучения культурально-морфологических свойств 23 изолята были отнесены к стрептококкам, что составляет 23% от общего числа выделенных изолятов бактерий. В патологическом материале от всех 12 хозяйств (100%) были обнаружены бактерии рода *Streptococcus*.

За 2018-2019 годы был проведен бактериологический и иммунологический мониторинг 11 животноводческих хозяйств Республики Татарстан, где наблюдались массовые заболевания молодняка с признаками поражения желудочно-кишечного тракта и респираторных органов. Исследовано 125 проб патологического и биоматериала от павших и больных животных. В исследуемом материале от всех 11 (100%) хозяйств были выделены бактерии рода *Streptococcus*, доля которых составляет 23 % от всего количества бактериальных изолятов.

На первом в этапе при бактериологических исследованиях готовили мазки-отпечатки на предметные стёкла. Полученные мазки окрашивали по методам Грама и Романовскому – Гимзе для последующей микроскопии. В процессе микроскопии приготовленных препаратов под иммерсионной системой в поле зрения наблюдали скопление чаще парных, а иногда, расположенных небольшими цепочками, мелких кокковых бактерий, фиолетового цвета (грамположительные), что характерно для бактерий рода *Streptococcus* (рис. 2 и 3).

В мазках-отпечатках и из бульонных культур, выращенных в средах с кровью или сыворотки крови, окрашенных по Романовскому – Гимзе выявлялись, в основном, парные ланцетовидные диплококки.

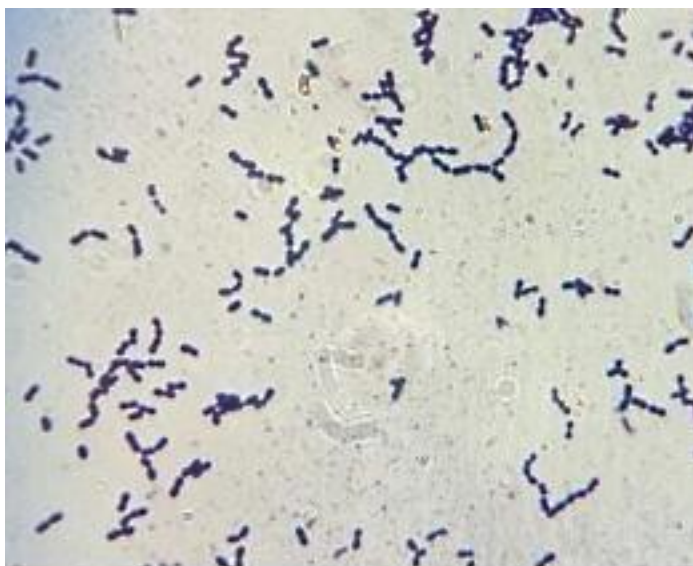


Рисунок 2 –Мазки, окрашенные по Граму x700

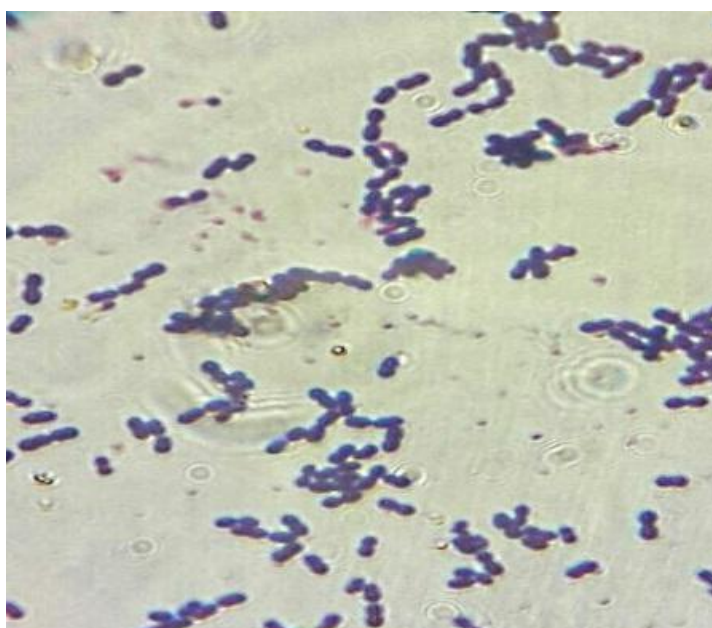


Рисунок 3 Мазки, окрашенные по Граму x 900

Следующим этапом исследований явилось выделение возбудителя. Для выделения культуры возбудителя проводили посевы из патологического материала на жидкие и плотные питательные среды. В качестве плотной питательной среды использовали мясо-пептонный агар с добавлением 0,2% глюкозы и 5% крови барана. Посевы инкубировали при 37° С в течение 1 – 2 суток.

Из полученных культур для определения свойств, характерных для возбудителя стрептококкоза, делали посевы в МПБ обогащенную 10% инактивированной сывороткой лошади и глюкозой до 0,2%, а так же на плотные среды, в чашках Петри. В качестве плотной питательной среды использовали МПА с обогащённой 5% дефибринированной кровью кролика и глюкозой (0,2%). Бактериологические посевы инкубировали в течение 18 – 20 часов при температуре 37° С.

В процессе исследований было отмечено, что в обогащенном МПБ наблюдался рост культуры, характеризующийся диффузным помутнением питательной среды (рис. 4). Такой тип роста на сывороточно-глюкозном МПБ наблюдается у большинства изолятов.

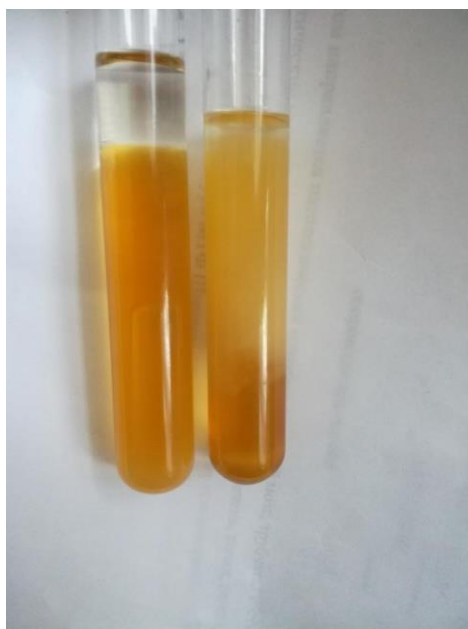


Рисунок 4 – Рост культуры на обогащённом МПБ

На плотных питательных средах (МПА, обогащённый кровью) появлялись гладкие, сферические колонии слизистой консистенции с блестящей поверхностью. При этом регистрировалось наличие α -гемолиза вокруг колоний (рис.5).



Рисунок 5 – Зона гемолиза на МПА, обогащённом кровью

Для уточнения родовой принадлежности выделенных микроорганизмов, проводили дополнительные исследования, с определением биохимических и антигенных свойств. В частности, для дифференциации стрептококков от стафилококков ставили каталазную пробу. Для этого на предметное стекло наносили каплю свежеприготовленного 3%-го раствора перекиси водорода. Далее в раствор перекиси вносили бактериологической петлёй исследуемую колонию и растирали её. Стафилококки, в отличие от стрептококков, образующие каталазу вызывали пенообразование.

С целью дифференциации видов рода *Streptococcus* и *Enterococcus* изучали лизис культур в глюкозо-сывороточном бульоне с 10% желчью. В среды с 10% желчью и без него вносили по 0,5 мл суточную бульонную культуру и инкубировали при 37⁰ С в течении 1 часа, а при необходимости оставляли на ночь.

При учёте результатов отмечали просветление среды, содержащей 10% желчи. Это свидетельствует о лизисе культуры бактерий и указывает о принадлежности их породе стрептококков (рис. 6). В пробирках, содержащих 40% желчи и 6,5% хлорида натрия рост культуры микроорганизмов отсутствовал, что также подтверждает их принадлежность к роду стрептококков.

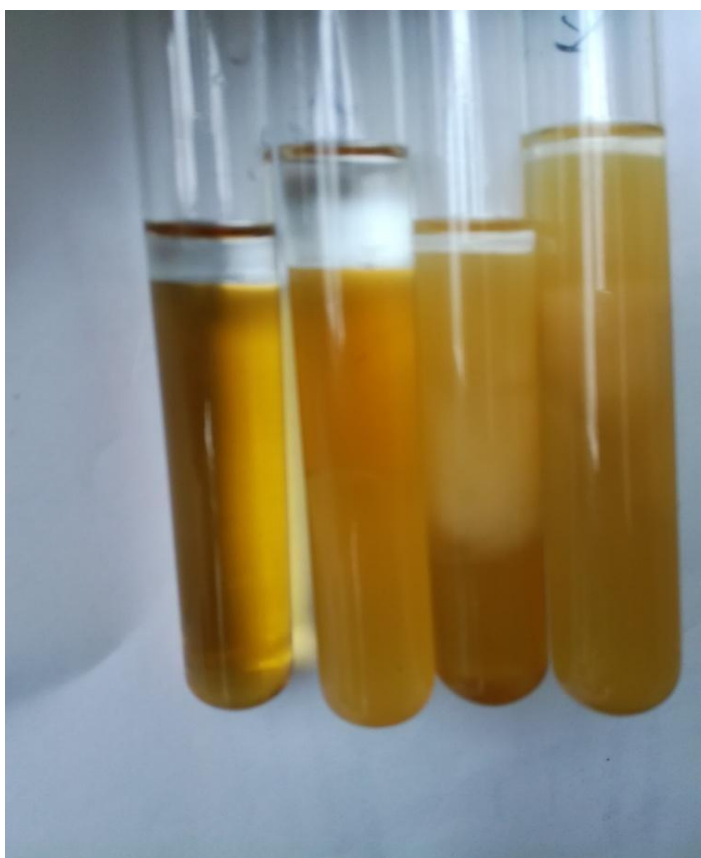


Рисунок 6 – Рост микроорганизмов на МПБ с добавлением 10% и 40% желчи

Дополнительно изучали образование сероводорода, аммиака и индола. Продуцирование сероводорода, аммиака и индола определяли с использованием соответствующих индикаторных бумажек при инкубации микроорганизмов в МПБ с добавлением 0,2% глюкозы [70].

Для определения сахаролитических свойств стрептококков, исследуемые культуры засеяли на специальные питательные среды Гисса, известные в лабораторной практике под названием «цветных» рядов. В своих

исследованиях мы использовали питательные среды с 12 углеводами и спиртами: раффиноза, ксилоза, сахароза, галактоза, мальтоза, декстроза, глюкоза, маннит, дульцит, лактоза, арабиноза, инулин. Посевы производили отмытой суспензией стрептококков по 10 млн. микробных клеток на 1 см³. После инкубации в термостате учитывали результаты ферментации углеводов на 2, 4, 7 и 10-й день, отмечая начало кислото- и газообразования. Образование кислоты или щелочи в пробирках сопровождалось изменением цвета питательной среды.

Для оценки интенсивности ферментации углеводов дополнительно определили рН питательной среды через 2 суток инкубации.

При исследовании на продуцирование стрептококками сероводорода было установлено, что ни одна индикаторная бумага не изменила свой цвет, что свидетельствует об отсутствии продуцирования сероводорода.

Исследования стрептококков на образование индола, так же дали отрицательные результаты.

Аммиак определяли при помощи, увлажненной красной лакмусовой бумажки. Результаты со стрептококками оказались отрицательными.

Детальное изучение ферментативной активности стрептококков было проведено на 4 штаммах микроорганизмов: СЛК – выделен от павшего поросенка; СЛП – выделен от поросенка павшего, с явлениями сепсиса; СУК – выделен в хозяйстве Ульяновской области от теленка из слизи носа, больного бронхопневмонией; СЛКТ – выделен в хозяйстве Республики Татарстан от больной свиноматки, эндометритом и маститом.

Результаты определения ферментативной активности стрептококков приведены в таблице № 2.

Полученные данные свидетельствуют о том, что штамм СЛКТ обладает высокой ферментативной активностью и разлагает почти все углеводы и спирты кроме дульцита и арабинозы. Только два штамма (СЛКТ, СЛК) ферментируют инулин, что характерно для диплококков. При ферментации наблюдалось изменение лишь цвета индикатора Андреде

(темно-малиновый), без газообразования.

Таблица 2 – Ферментативная активность штаммов стрептококков

Субстраты	Ферментативная активность штамма			
	СЛП	СЛК	СУК	СЛКТ
Раффиноза	–	+	–	К+
Ксилоза	–	К+	–	К+
Сахароза	–	К+	–	К+
Галактоза-	К+	К+	К+	К+
Мальтоза	К+	К+	К+	К+
Декстроза	К+	–	К+	К+
Глюкоза	К+	К+	К+	К+
Маннит	К+	К+	К+	К+
Дульцит	–	–	–	–
Лактоза	К+	К+	–	К+
Арабиноза	–	–	–	–
Инулин	–	К+	–	К+
Сорбит	–	+	–	К+

Примечания: К+ положительная реакция с образованием кислоты;

– отрицательная реакция, ферментация не идет.

Результаты измерения pH питательной среды, обобщенные в таблице 3, согласуются с показателями индикаторных сред.

Полученные данные свидетельствуют о том, что стрептококки, расщепляя углеводы и спирты pH среды сдвигают в кислую сторону, что соответствует роду *Streptococcus*. Наиболее интенсивное изменение pH наблюдалось при инкубации стрептококков в присутствии галактозы, мальтозы и маннита. Из 4 штаммов лишь два СЛКТ и СЛК ферментировали инулин, что является важным дифференциальным признаком для

Streptococcus pneumoniae. Раффинозу интенсивно расщеплял штамм СЛКТ.

Определение серогрупповой принадлежности отдельных культур проводили по реакции преципитации в капиллярах (РП) по известной методике [70].

Таблица 3 – Изменение рН при культивировании стрептококков в средах Гисса

Углеводы и спирты	*	рН среды по штаммам			
		СЛП	СЛК	СУК	СЛКТ
Раффиноза	1	7,3	7,0	7,0	7,0
	2	7,0	6,8	7,1	5,8
Ксилоза	1	7,0	7,0	7,0	7,0
	2	6,5	6,2	6,8	5,3
Сахароза	1	7,0	7,0	7,0	7,0
	2	6,9	5,9	7,0	6,2
Галактоза	1	7,0	7,0	7,0	7,0
	2	5,3	5,7	5,3	4,9
Мальтоза	1	7,0	7,0	7,0	7,0
	2	5,4	5,1	5,5	4,9
Декстроза	1	7,0	7,0	7,0	7,0
	2	5,4	6,8	6,0	6,1
Глюкоза	1	7,0	7,0	7,0	7,0
	2	5,2	5,1	5,9	4,8
Манит	1	7,0	7,0	7,0	7,0
	2	5,9	5,7	5,9	5,3
Дульцит	1	7,0	7,0	7,0	7,0
		6,8	6,9	6,9	6,8

	2				
Продолжение таблицы 3					
Лактоза	1	7,0	7,0	7,0	7,0
	2	6,3	6,2	6,9	6,1
Арабиноза	1	7,0	7,0	7,0	7,0
	2	6,8	6,9	6,9	6,9
Инулин	1	7,0	7,0	7,0	7,0
	2	7,1	5,9	6,9	5,9

*Примечания: 1–исходное значение pH, 2 –в конце инкубации pH

В клеточной стенке многих стрептококков присутствует термостабильный полисахаридный антиген «С». В соответствии с его антигенными вариантами по системе Лансфилд стрептококки в РП подразделяют на серологические группы, которые обозначают заглавными буквами латинского алфавита.

Использовали иммунные серогрупповые преципитирующие стрептококковые сыворотки, произведенные ООО «НПП АКВАПАСТ» (Санкт-Петербург, Россия) серогрупп А, В, С, D, F и G в тесте латекс-агглютинации.

В подавляющем большинстве случаев выделенные стрептококки принадлежали к серогруппе D (35%) и G (16%). Стрептококки группы С встречались в 3% случаев. Ещё реже идентифицированные микроорганизмы относились стрептококкам группы В (1,5%).

В процессе лабораторных исследований патологического материала от больных и павших животных и биопроб нам удалось выделить различные виды бактерий рода *Streptococcus* (табл.№ 4) .

Среди выделенных изолятов наибольшее количество приходилось на вид *Str. Suis*, *Str. pneumonia*, *Str. oedematis*, *Str. Bovis*. Это объясняется и тем, что больше патологического и биоматериала исследований от свиноферм.

Следует отметить распространенность разных видов стрептококков среди поголовья животных, что надо учитывать при проведении диагностических, профилактических и оздоровительных мероприятий.

Таблица № 4 – Видовая принадлежность изолятов стрептококков

Наименование видов	Количество (%)
Str. suis	35,0
Str. pneumoniae	18,0
Str. oedematis	16,0
Str. bovis	14,0
Str. vestibularis	6,0
Str. oralis	5,0
Str. zooepidemicus	4,0
Str. salivarius	2,0
Str. mutants	1,0

Это объясняется и тем, что больше патологического и биоматериала исследовали от свиноферм. Следует отметить распространенность разных видов стрептококков среди поголовья животных, что надо учитывать при проведении диагностических, профилактических и оздоровительных мероприятий.

Патогенность изолятов подтверждали биологической пробой на молодых беспородных белых мышах. Для постановки биопробы использовали смыв бактерий, выращенных в течение 18 – 20 часов на сыровоточно-глюкозном МПА или бульонную суточную культуру. Бактериальную суспензию стандартизировали с концентрацией по оптическому стандарту мутности 10 ед. Суспензию или бульонную культуру

вводили внутривенно в дозе 0,5 мл белым мышам массой 16 – 18 г (не позже 30 минут после смыва культур).

После заражения мышей наблюдение за ними вели 5 суток. Чаще всего животные погибали в течение 24 – 72 часов. Культуру признавали вирулентной, в случае гибели инфицированных лабораторных животных и выделения из их органов или из жидкости плевральной полости или крови из сердца культуры со свойствами, характерными для исходной культуры. У павших мышей выявлялись геморрагический гастроэнтерит и экссудат в брюшной и грудной полостях, плеврит, перикардит и перитонит, увеличение селезенки. От павших мышей выделяли культуры и идентифицировали стрептококков, что явилось основанием для постановки диагноза стрептококкоз.

Таким образом, на основании изучения культурально-морфологических, биохимических свойств и вирулентности 407 культур, изолированных от патологического материала и биопроб экскрементов животных из хозяйств в зоне Поволжья 99 отнесены к бактериям рода *Streptococcus*. По результатам изучения их они относились к видам *Streptococcus: acidomininus, bovis, pneumonia, suis, vestibularis, oralis, zooepidemicus, salivarius, mutans*.

Полученные данные свидетельствуют о значительной распространенности стрептококкозов среди инфекционных патологий свиней.

Среди выделенных культур наибольшее количество приходилось на *Streptococcus suis, pneumonia, acidomininus u bovis*. Это объясняется и тем, что больше проб патологического материала исследовали от свиней.

2.2.2 Клиника и патологоанатомические изменения при стрептококкозе свиней

К стрептококкозу оказались восприимчивыми все возрастные группы свиней, но чаще болели поросята, реже – взрослые животные. Клиническое проявление стрептококкоза у животных зависит от патогенности, дозы возбудителя, степени естественной резистентности организма и других факторов. При проведении клинико-эпизоотологического обследования свинофермы ООО «Агрокам» Рыбно-слободского района установили, что респираторные, желудочно-кишечные заболевания регистрируются у свиней во все сезоны года, но проявляется чаще всего в зимне-весенний период со значительным отходом молодняка. У свиней наблюдались дерматиты, абсцессы на теле, поражения конечностей, маститы, эндометриты. Обследование хозяйства показало, что имеет место нарушения в условиях содержания и кормления животных, отсутствие ветеринарных специалистов и ненадлежащее проведение плановых систематических ветеринарно-санитарных мероприятий.

В результате обследования свинофермы и проведения клинических исследований возникло подозрение на то, что хозяйство неблагополучно по стрептококкозу. Затем диагноз был подтвержден лабораторными исследованиями патологического материала, от которого выделены культуры стрептококков.

При наблюдении за больными животными были отмечены определённые клинические признаки, характерные для стрептококкоза.

Инкубационный период оказался коротким и составил 1-2 дня, иногда его продолжительность достигала 7 дней. Болезнь протекала у разных животных по-разному: сверхостро, остро, подостро и хронически.

При сверхостром течении у больных животных в возрасте до 1 мес. Наблюдалось повышение температуры до 41-42. Животные были вялыми, угнетёнными, аппетит отсутствовал, отмечались признаки серозно-катарального конъюнктивита и ринита. Были ярко выражена одышка,

хрипы, аритмия, слизистые оболочки цианотичны. При предагональном состоянии отмечалось выделение из носовой полости кровянистой пенообразной жидкости вследствие отека легких. Животные погибали в течение 2-3 дней, несмотря на лечебные процедуры.

Разнообразное клиническое проявление стрептококкоза наблюдалось у поросят более старшего возраста. При остром течении отмечалась высокая температура, обильные слезотечения, катарально-гнойные истечения из носовых ходов, отсутствие аппетита, менингиты, параличи, парезы и пневмонии, расстройство желудочно-кишечного тракта. У отдельных поросят наблюдалось воспаление пупочного канатика (омфалит). Затем заболевание прогрессировало и наступала гибель в течение 2-3 дней с признаками септицемии.

Для подострого течения было характерно разнообразие клинических признаков, чаще всего поражения органов дыхания, желудочно-кишечного тракта, суставов конечностей.

Хроническое течение болезни отмечалось у поросят 2-3 месячного возраста. Они отставали в росте, страдали артритами и дерматитами (рис. № 7,8).

У животных более старшего возраста заболевание приобретало хронический характер. Они отставали в росте, у них отмечались артриты, дерматиты и бронхиты, истощение.

У свиноматок после опороса отмечались агалактия, эндометриты и маститы, что сопровождалось быстрым заражением поросят. У новорожденных поросят заболевание протекало сверхостро и несмотря на лечебные мероприятия они чаще всего погибали.



Рис.№7-.Поражение кожного покрова у поросенка



Рис. №8-. Поражение тазовых и коленных суставов при стрептококкозе поросят

В ходе исследовательской работы нами проведено вскрытие 25 поросят разных возрастов, которым прижизненно был поставлен диагноз стрептококкоз на основании лабораторных исследований истечений из носовой полости и по клиническим признакам. Вскрытие трупов

проводилось на специально отведенной площадке с последующей утилизацией трупов и дезинфекцией. Полученные данные были нами обобщены и учитывались при диагностике.

При вскрытии павших поросят первых дней жизни наблюдались фибринозно-гнойный плеврит и перикардит, перикард был покрыт фибриновыми отложениями. В грудной полости и перикардиальной сумке геморрагический экссудат, увеличение средостенных лимфатических узлов. В брюшной полости находился геморрагический экссудат и отложения фибрина между петлями кишечника и на брюшине.

У поросят более старшего возраста отмечались кровоизлияния на серозных и слизистых оболочках, спленит, серозно-катаральная и геморрагическая пневмония, гастроэнтериты, увеличение лимфатических узлов, артриты. В брюшной и грудных полостях геморрагический экссудат.

Результаты проведенных клинических, патологоанатомических, морфологических исследований позволяют констатировать о том, что у 1 – 4-месячных поросят при стрептококкозе чаще отмечались сплениты, гепатиты, серозно-катаральные пневмонии и гастроэнтериты, артриты и поражения кожного покрова. У свиноматок стрептококкоз имел хронический характер и обострение наблюдалось после опороса в виде агалактии, эндометрита и мастита. Часто наблюдался сочетанный симптокомплекс, который варьировал в зависимости от возраста свиней.

2.2.3 Разработка лабораторного регламента изготовления инактивированной бивалентной формол гидроокись алюминиевой вакцины против стрептококкоза свиней

2.2.3.1 Изыскание питательной среды и подготовка штаммов для изготовления вакцины

Проведённые исследования свидетельствуют о широком распространении стрептококкоза среди сельскохозяйственных животных на территории Среднего Поволжья. При этом отмечается значительная доля

поражения среди молодняка свиней, приводящая к развитию у поросят клинической формы заболевания. Заболевание имеет интенсивное распространение среди большого поголовья, а также отражается значительными потерями, связанными с затратами на лечение, выбраковкой и гибелью поражённых животных. Проводимые профилактические и лечебные мероприятия, включая и вакцинацию не всегда обеспечивали быстрое купирование энзоотии и оздоровление ферм от стрептококкоза.

На территории нашей страны используют инактивированную вакцину против диплококковой септицемии поросят из штаммов *S. pneumoniae* и ассоциированную (поливалентную) вакцину против сальмонеллеза и, пастереллёза и стрептококкоза свиней, которая также включает в себя бактериальную массу *Str. pneumoniae*. Однако проведённые нами исследования свидетельствуют о том, что значительный удельный вес при стрептококкозах поросят на территории Среднего Поволжья, имеют микроорганизмы, относящиеся не только *Str. pneumoniae*, но и к виду *Str. suis*. Данный возбудитель чаще всего вызывает развитие в организме животных септических явлений.

В связи с вышеизложенным, нами на основании изучения биологических свойств 99 изолированных культур было установлено, что наибольшее распространение имеют сероварианты у свиней, относящиеся к роду *Streptococcus suis*.

Учитывая распространённость в этом хозяйстве стрептококков серогрупп D и C мы решили создать бивалентную вакцину из штаммов СЛП (серотип D) и СЛКТ (серотип C). Штамм СЛП был выделен от новорожденного в ООО «Агрокам» РТ поросенка, павшего от септической формы стрептококкоза. В этом хозяйстве стрептококкоз протекал с массовым охватом свиноматок, новорожденных, подсосных и отъёмных поросят, а также в хронической форме у откормочных. У свиноматок с первых суток после опороса наблюдались маститы, эндометриты и агалактия. У супоросных

свиноматок имели место аборт. Штамм стрептококков СЛКТ был выделен от свиноматки с клиникой эндометрита, мастита и агалактии (ММА).

Инактивированные вакцины обладают рядом положительных характеристик, основными из которых являются их относительная стабильность в отношении температуры окружающей среды, а также сравнительно высокая безопасность применения.

Для культивирования отобранных в качестве потенциальных вакцинных штаммов *Str. suis* были апробированы обогащённые питательные среды: среда Левина, Эндо, кровяной МПА, селенитовой, глюкозо-сывороточный МПБ и др. При этом проводили контроль накопления микробных клеток (м.к./см³). Накопление клеток в жидких питательных средах варьировало в пределах 10-20 млрд.м.к./см³. На плотных питательных средах интенсивность роста так же варьировал. Для создания надлежащего иммунитета против стрептококкоза имеет полисахаридный антиген клеточной стенки, капсульная субстанция и токсины, т.е. иммунитет связан антитоксическим и антибактериальным фактором. Однако капсула и интенсивность токсинообразования и внеклеточных ферментов варьирует от состава питательной среды. Поэтому в процессе работы нами были проведены исследования по изучению особенностей роста микроорганизмов штаммов СЛП и СЛКТ на различных питательных средах для обеспечения максимального накопления биомассы и других антигенных и токсических факторов.

Бактериальную массу для исследований получали на мясо-пептонном агаре с добавлением 0,2% глюкозы и 5% крови. Односуточную культуру, выращенную в стационарных условиях при 37° С, смывали с поверхности агара стерильным физиологическим раствором хлористого натрия. Клетки микроорганизмов отмывали два раза от остатков питательной среды физиологическим раствором путем центрифугирования пр. 1000 g в течение 15 минут. Затем осадок разводили стерильным физиологическим раствором до концентрации 1 млрд./ см³.

После этого исследуемую культуру засеяли на питательные среды различного состава в объёме 0,2 мл (табл. 4). Культуры инкубировали при 37° С. Оценку интенсивности роста микроорганизмов проводили при помощи фотоэлектрического колориметра КФК-2 (определяли оптическую плотность бактериальной взвеси) через 24 и 48 часов после посева.

Длина волны составляла 450 нм. В качестве контроля использовали стерильные питательные среды аналогичного состава.

В ходе работы нами были получены следующие результаты: рост микроорганизмов в жидких питательных средах характеризовался диффузным помутнением. Показатели оптической плотности и роста культур представлены в табл. 5.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в средах, засеянных культурой микроорганизма из штамма СЛП через 24 часа после начала исследования, оптическая плотность значительно выше, чем в аналогичных исходных средах (контроль). При этом наибольшие значения оптической плотности были зарегистрированы во всех опытных образцах спустя 24 часа после посева. Через 48 часов наблюдалось снижение оптической плотности культур микроорганизмов. Сходные показатели были получены и при культивировании штамма СЛКТ (Рис. 9).

Анализируя показатели роста стрептококков на различных питательных средах, следует отметить, что они достаточно интенсивно размножаются во всех исследуемых средах. Максимальные показатели роста достигают к 24 часам культивирования, а к 48 часам происходит некоторое снижение концентрации микробных клеток.

Наиболее высокое накопление бактерий изучаемого штамма наблюдалось при инкубации в полусинтетической питательной среде: к 24 часам оптическая плотность культуры возросла в 10 раз ($p > 0.001$). Через 48 часов инкубации показатель оптической плотности снизился на 5,1% от уровня, достигшего к 24 часам ($p < 0.02$).

Таблица 4 – Состав питательных сред.

№ п/п	Питательная среда	Состав	
		Наименование компонентов	Количество (г\л)
1.	Полусинтетическая среда	Лимонно-кислый натрий Серно-кислый аммоний Серно-кислый магний Цитрат закисного железа Лактоальбумин (гидролизат) Глюкоза Тиамин Биотин Рибофлавин Глицерин Na ₂ HPO ₄ *3H ₂ O K ₂ HPO ₄ твин- 40	0,4 1,0 0,1 0,05 20,0 2,0 0,005 0,025 0,005 10,0 7,0 3,0
2.	Мясо-пептонный бульон с глюкозой 0,2%	Мясо-пептонный бульон Глюкоза	2,0
3.	Тиогликолевая среда	Глюкоза, Гидролизат казеина, Дрожжевой экстракт, Мясной экстракт, L-цистин, Тиогликолят натрия, Резазурин	9,0 20,0 9,0 1,0 0,1 0,1 0,01
4.	Среда Китта-Тароцци	Мясопептонный бульон + экстракт печени, кусочки вываренной печени (в качестве поглотителя свободного) кислорода	900 основа 1 = 0 2,0
5.	Бульон Хоттингера	Мясной гидролизат по Хоттингеру, аминный азот глюкоза	200мг % 2,0
6.	Полусинтетическая среда	Гидролизат лактоальбумина глюкоза (фосфатный буфер и микроэлементы)	20,0 2,0

Таблица 5 – Показатели оптической плотности культур штамма СЛП
(n=5)

Питательная среда	Опт.пл. исх.	Через 24 час		Через 48 час	
		опт.пл.	кратность	опт.пл.	кратность
Полусинтетическая	0,2±0,03	*2,0±0,0 2	10,0	*1,9±0,1 1	9,5
МПБ+глюкоза 0,2%	0,2±0,04	0,8±0,09	4,0	0,7±0,06	3,5
Тиогликолевая	0,4±0,08	*2,5±0,1 5	6,3	*2,1±0,1 2	5,3
Китта-Тароцци	0,3±0,04	0,6±0,09	2,0	0,6±0,04	2,0
Бульон Хоттингера + глюкоза	0,3±0,03	2,2±0,13	7,3	*2,0±0,1 2	6,6

- Достоверная разница между МПБ (($p > 0.001$)).

Интенсивный рост стрептококков происходил в бульоне Хоттингера: оптическая плотность к 24 часам, увеличилось в 7,3 раза от исходного уровня ($p > 0.001$). Однако дальнейшее культивирование в этой питательной среде так же привело к снижению концентрации бактерий на 9,1% ($p < 0.05$).

Достаточно высокие показатели роста стрептококков отмечались в тиогликолевой питательной среде. Через 24 часа после посева оптическая плотность возросла в 6,3 раза по сравнению с исходным уровнем ($p > 0.001$), а спустя 48 часов – снизилась на 15,8% ($p > 0.001$). Оптическая плотность культуры в мясопептонном бульоне с глюкозой к 24 часам превышала исходный уровень в 4 раза, через 48 часов – в 3,5 раза. При длительной инкубации стрептококков в МПБ их концентрация снизилось на 12,5% от уровня достигнутого к 24 часам.

Незначительный рост бактериальной культуры был зарегистрирован в питательной среде Китта-Тароцци. Оптическая плотность культуры к 24 часам увеличилась лишь в 2 раза, а к 48 часам осталась на том же уровне. В среде Китта-Тароцци анаэробные условия, а стрептококки – факультативные

анаэробны. Отсутствие снижения концентрации бактерий в этой среде при длительном культивировании важно для использования ее при хранении микроорганизмов.

Результаты исследований свидетельствуют о том, что в питательных средах, содержащих глюкозу, происходит более интенсивный рост стрептококков и более раннее отмирание. Это обусловлено тем что в питательной среде происходит накопление продуктов расщепления глюкозы и других компонентов с образованием кислых продуктов, что приводит к снижению рН среды. Полусинтетическая питательная среда является буферной системой (фосфатный буфер), поэтому обеспечивает относительно длительное равновесие рН. При этом нами было отмечено, что максимальные значения оптической плотности культур стрептококков регистрируются спустя 24 часа после посева, затем этот показатель начинает снижаться. Это свидетельствует о том, что наиболее интенсивное деление бактериальных клеток происходит впервые 24 часа после посева в питательную среду. Затем концентрация микробных клеток достигает порогового значениями начинается конкурентная борьба за жизнеобеспечивающие ресурсы среды, что приводит в свою очередь к гибели отдельных бактериальных клеток, а следовательно, к просветлению питательной среды и снижению её оптической плотности.

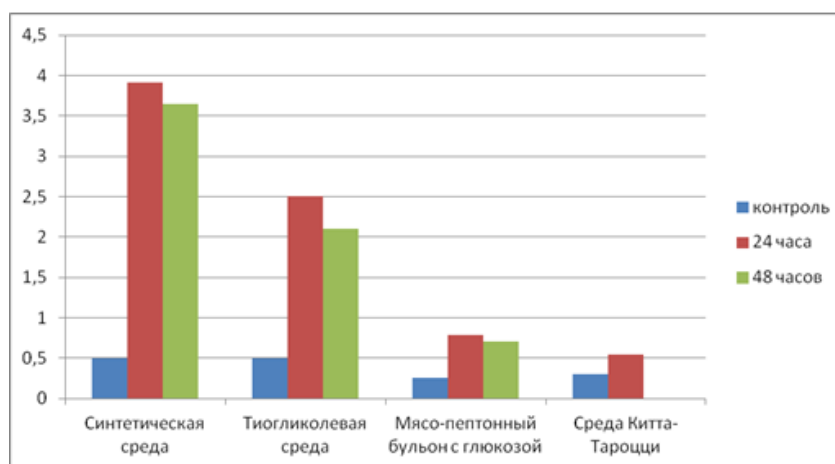


Рисунок 9 – Интенсивность роста стрептококков штамма СЛКТ в питательных средах (кратность по отношению к контролю)

Полученные результаты свидетельствуют о том, что более интенсивный рост стрептококков обеспечивает составленная нами полусинтетическая питательная среда. Достаточно интенсивный рост стрептококков наблюдался и в бульоне Хоттингера и тиогликолиевой питательной среде, которые более богаты по составу. Поэтому они могут быть использованы для наработки биомассы отобранных нами штаммов *Streptococcus suis* СЛП и СЛКТ. Среда Китта-Тароцци целесообразно применять для хранения культур и штаммов стрептококков.

После проведённых исследований в качестве питательной среды для наработки биомассы стрептококков нами был выбран обогащённый глюкозой и твином-40 бульон Хоттингера, который хотя и уступает незначительно полусинтетической питательной среде, но его себестоимость значительно ниже. Данная питательная среда позволяет получать относительно максимальную концентрацию клеток возбудителя, а включение твина-40 способствует формированию капсульной субстанции, даже без включения сыворотки крови.

Подготовка штаммов для наработки вакцины в качестве исходных штаммов для изготовления инактивированной вакцины отобрали штаммы СЛП (*S. Suis*, серотип D) и СЛКТ (серотип C), изолированные соответственно от новорожденного поросенка, павшего от септической формы стрептококкоза и от свиноматки с выраженной клиникой эндометрита и мастита (паспорта штаммов прилагаются).

Первым этапом исследований явилось освежение музейных культур этих штаммов. Для этого проводили последовательное трехкратное пассажирование их через организм белых мышей.

В опытах использовали белых беспородных мышей, масса которых составляла от 16 до 18 г. Лабораторных животных заражали соответствующей культурой микроорганизма, выращенной в пробирках с бульоном Хоттингера. Бульонные 18 – 20 – часовые культуры вводили 3-м лабораторным мышам внутрибрюшинно в дозе 0,5 мл. Наблюдение за

животными вели до их гибели. Они погибали в течение первых 24- 72 часов. После этого проводили выделение из гомогенатов их органов и из жидкости плевральной полости или крови из сердца культуры со свойствами, характерными для исходной культуры. Культуры, полученные после первого пассажа, сохраняли. Для последующего пассажа делали гомогенат из тканей селезенки и лимфоузлов мышей, с которыми вновь заражали новых животных. Были проведены 3 последовательных пассажа.

После первого заражения штаммом СЛК пали 2 мыши из трех. Во втором и третьем пассаже все инфицированные мыши погибали от септицемии в течение до 48 часов. После первой инъекции штамма СЛКТ пали все 3 мыши, последующих пассажах так же погибали все зараженные животные.

Выделенные от белых мышей культуры стрептококков вакцинных штаммов пересекали в среды Китта-Тароцци и хранили в холодильнике при + 2...4° С. Эти культуры использовали в качестве исходных штаммов для наработки биомассы стрептококков.

Первая расплодка культуры стрептококков. Из исходной культуры штаммов стрептококков делали посеvy в бульон Хоттингера с 0,4% глюкозой и твин-40 – 0,1% (БХГТВ-40) в пробирках и инкубировали при 37° С в течение 18 – 24 часов.

Вторая расплодка из культур первой расплодки делали посеvy в ту же питательную среду во флаконах емкостью 200 см³, заполненных питательной средой до 150 см³ рН питательных составила 7,2 – 7,4. В каждый флакон с питательной средой вносили по 5 – 10 см³ одно суточной культуры стрептококков первой расплодки. На каждом этапе пересева делали мазки и контрольные посеvy для оценки чистоты культуры исходного штамма.

Определяли чистоту выращенных культур путем посева на МПБ, МПА, агаре и среду Сабуро, Китта-Тароцци, Плоскирёва и Эндо. Дополнительно чистоту культур оценивали микроскопией мазков, окрашенных по методу Грама.

Культивирование проводили в условиях термостата при температурном режиме равном 37 – 38° С. Период инкубации составлял 18 – 20 часов. Затем для определения чистоты выращенных микроорганизмов проводили высев на МПБ, МПА, агаре Сабура, среды Китта-Тароцци и Плоскирёва, Эндо. Проводили микроскопию окрашенных мазков по Граму.

Культуры второй расплодки использовали для наработки биомассы стрептококков при изготовлении вакцины. Выращивание микроорганизмов проводили в бутылках ёмкостью 5 литров. Для этих целей в каждую бутылку вносили питательную среду – БХГТВ-40 (рН 7,2 – 7,4) в количестве 4 литра. Питательную среду стерилизовали автоклавированием при 1 атм. в течение 30 мин. Посев производили культурой второй расплодки в количестве 10% от общего объема питательной среды. После посева культуры оставляли в покое в течение 3 часов при температуре 37 – 38° С. Затем на 5 – 6 часов ставили на качалку со скоростью 10 – 15 колебаний в минуту при температуре 37 – 38° С. После этого вновь оставляли в покое в течение 10 – 12 часов при 37 – 38° С. Конечная концентрация стрептококков достигала 3,5 – 4,5 млрд.м.к./см³.

Для контроля чистоты роста культур использовали посевы в обогащённый 5% дефибринированной кровью кролика мясо-пептонный агар и бульон, полусинтетическую питательную среду, агар и бульон Сабура. Кроме того, микроскопировали окрашенные мазки по Граму и по методу Бурри [70]. При окраске по методу Бури на предметное стекло наносили каплю туши и вносили в нее петлю культуры, тщательно перемешивали петлей и делали мазок с покровным стеклом. Мазки высушивали и просматривали под иммерсионной системой. На темно-дымчатом фоне микробные клетки и капсулы просматривались в виде бесцветных парных клеток.

2.2.3.2 Инактивация биомассы вакцинных штаммов стрептококков

При создании инактивированной вакцины полученную культуру

возбудителя стрептококкоза необходимо обезвредить (инактивировать). При этом выбранный способ инаktivации должен быть на 100% эффективным и не нарушать антигенность и иммуногенность получаемого препарата [123].

Одним из методов обезвреживания вакцинных штаммов является химическая инаktivация. Установлено, что одним из наиболее предпочтительных химических средств, используемых для обезвреживания микроорганизмов, при изготовлении вакцин является формалин. Это обусловлено тем, что данное вещество способно не только убить бактериальную клетку, но и инаktivировать микробные токсины, переводя их в анатоксины. Исходя из этих данных, мы использовали в своей работе именно этот препарат.

На данном этапе нашей работы возникла необходимость в разработке оптимальной методики инаktivации культуры возбудителя, выступающей в качестве вакцинного штамма.

Для оценки основных параметров инаktivации, мы проводили внесение в исследуемые культуры штаммов *S. suis* раствора формалина с содержанием формальдегида 36%. При этом конечная концентрация формалина варьировала в интервале от 0,1% до 0,4%.

Затем, исследуемые культуры возбудителя с инаktivатором выдерживали в условиях термостата ($22 \pm 2^\circ \text{C}$; $37 \pm 2^\circ \text{C}$) в течение 10 суток. Ежедневно отбирали пробы и производили посевы на питательные среды.

Оценку уровня инаktivации осуществляли путём просмотра посева исследуемой партии на питательные среды – полусинтетическую питательную среду, мясо-пептонный агар и мясо-пептонный бульон. Помимо этого производили изготовление мазков бактериальных препаратов, которые окрашивали по методике Грама. В неоднозначных случаях проводили заражение лабораторных животных (белые мыши) исследуемыми образцами препарата. Наблюдение за инфицированными мышами осуществляли на протяжении 10 суток. Полученные данные об инаktivации стрептококков представлены в табл. 6.

Таблица 6 – Инактивация культур *Str. suis* формалином

Температурный режим, °C	Концентрация формалина, %	Время инактивации (сутки)										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
22±2	0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0,15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0,2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±
	0,3	+	+	±	±	±	-	-	-	-	-	-
37±2	0,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	0,2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	±
	0,3	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,4	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-

«+» – наличие роста стрептококка на питательных средах;

«±» – сомнительные случаи;

«-» – отсутствие роста стрептококка на питательных средах.

Полученные данные свидетельствуют о высокой чувствительности стрептококков к формалину. При температуре 22° С стрептококки при конечной концентрации формалина 0,1% и 0,2% сохраняли жизнеспособность более 11 суток. При 0,3%-ном содержании формалина наблюдалась полная инактивация стрептококков через 6 - 7 суток.

При температуре 37° С инактивация стрептококков ускорялась: в 0,1% и 0,2% содержании формалина они не погибали до 11 суток. При концентрации формалина 0,3% гибель стрептококков происходила на 2 сутки, в 0,4%-ной концентрации полная инактивация наступала уже на вторые сутки. Полученные данные позволили подобрать оптимальный

температурный режим, концентрацию химического инактиватора и сроки инаktivации микробов *Str. Suis*, используемых для изготовления инаktivированной вакцины. Поэтому для инаktivации стрептококков использовали формалин в конечной концентрации 0,4 %.

Для получения вакцины из двух штаммов стрептококков инаktivированную биомассу объединяли в соотношении 1:1.

Далее бактериальную массу депонировали. Для этого применяли адъювант – гидрат окиси алюминия (ГОА), содержанием сухого остатка 6%. ГОА вносили к инаktivированной биомассе стрептококков в количестве 10% от объема бактериальной суспензии. Смесь тщательно перемешивали и выдерживали при 20 – 25° С в течение 12 – 20 часов. Затем вакцинный препарат расфасовывали во флаконы по 100 см³.

Каждую партию вакцинного препарата проверяли на качество по следующим показателям: внешний вид, герметичность укупорки, стерильность, безвредность, иммуногенность.

Полученные результаты обобщены в табл. №7. Оценка качества препарата свидетельствует о том, что полученный вакцинный препарат соответствует определенным требованиям и стандарту.

При оценке основных показателей образцов вакцин установили их соответствие указанным параметрам. Упаковка обеспечивала герметичность препарата. Вакцина представляла собой желтоватую мутную жидкость, при стоянии, которой выпадал белый осадок, легко разбивающийся при встряхивании. После посева на питательные среды роста микроорганизмов не наблюдалось. После инъекции белым мышам в дозе 0,5 мл клиническое состояние не изменялось, все животные оставались активными, принимали корм и адекватно реагировали на изменение окружающей среды.

Таблица 7 – Основные характеристики лабораторных образцов
ИБФГОА – вакцины

№	Показатели	Описание
1.	Упаковка	Флакон с объемом 100 см ³ , закатан колпачком из алюминиевой фольги
2.	Внешний вид	Содержимое – непрозрачная желтоватая жидкость с белым осадком. Осадок легко разбивается при встряхивании с образованием беловатой однородной суспензии
3.	Стерильность	При посеве на питательных средах рост микроорганизмов отсутствует
4.	Безвредность	При наблюдении в течение 10 суток после подкожной инфекции белым мышам в дозе 0,5 мл клинических отклонений не установлено, все 5 мышей живы

2.2.4 Изучение иммуногенных свойств инаktivированной ФГОА вакцины против стрептококкоза в экспериментальных и производственных условиях

2.2.4.1 Изучение иммуногенных свойств инаktivированных вакцинных препаратов против стрептококкоза на белых мышах

Используя выше описанный лабораторный регламент изготовления вакцины, было произведено несколько опытных партий вакцин на основе штаммов *Str. suis*, выделенных и изученных нами. В начале приготовили гидроокись алюминиевую (ГОА) формолвакцину и формовакцину, не содержащую адъювант.

Для определения иммуногенной активности и дозы ФБГОА проводили опыты на лабораторных белых мышах. В опыте на каждую дозу

вакцины было взято по 10 белых мышей, масса которых составляла 16 – 18 г. Животных иммунизировали однократно. Вакцину вводили подкожно в области спины. Позднее, через 14 дней после иммунизации вакцинированных, и не иммунизированных мышей заражали внутрибрюшинно вирулентной культурой штамма *Str. suis* в дозе 1 Dlm. По результатам предварительной титрации заражением мышей 1 Dlm составляла 100 млн.м.к.

Результаты предварительного определения иммунизирующей дозы образца вакцины приведены в табл. 8.

После вакцинации в клиническом статусе белых мышей 2, 3 и 4 групп существенных отклонений не наблюдалось. У мышей первой группы отмечалось некоторое угнетенное состояние и снижение аппетита в течение первых суток. У всех мышей на месте инъекции появлялась небольшая припухлость, которая исчезала через 3 – 4 суток.

После контрольного заражения вирулентной культурой все не вакцинированные белые мыши заболели стрептококкозом и погибли, в основном, на 2 – 4 сутки, а часть из них (20%) пали на 5 – 6 сутки. Среди белых мышей, вакцинированных в дозах 1,0 и 0,5 мл после заражения заболели соответственно 4 и 5 животных, у остальных клинического проявления стрептококкоза не отмечалось.

В этих группах выжили 60% мышей. Мыши, вакцинированные в дозах 0,25 и 0,125 мл, после заражения выжили соответственно 40% и 20%.

Таким образом, результаты исследований свидетельствуют о выработке после вакцинации определённого иммунитета против стрептококкоза, но недостаточного для полной защиты мышей от минимальной смертельной дозы. Тем не менее, полученные данные позволяют констатировать о том, что инактивированный антиген при однократной вакцинации создает определённый иммунитет. Доза 1 мл

оказалась достаточно реактогенной, хотя и защищала 60 мышей от контрольного заражения.

Таблица 8 – Определение иммунизирующей дозы ИБФГОА вакцины против стрептококкоза на белых мышах

Группы мышей	Доза (см3)	Количество мышей				Иммуногенность, %
		Всего	После заражения			
			Заболели	Пали	Выжило	
1	1,0	10	4	4	6	60
2	0,5	10	5	4	6	60
3	0,25	10	7	6	4	40
4	0,125	10	9	8	2	20
5	0	10	10	10	0	0

Далее проводили исследования иммуногенности и эффективности трех образцов вакцин : 1) ИБФГОА вакцина, 2) фармол вакцина на основе масляного адъюванта без ГОА, 3) фармол вакцина без адъюванта и ГОА. Данные испытания так же проводили на белых мышах. В каждой опытной группе было по 10 лабораторных животных, масса которых составляла 16 – 18 г. Животных вакцинировали соответствующими образцами вакцин внутримышечно дозой, равной 0,5 см³ однократно.

Через 14 дней после вакцинации всех мышей заражали культурой вирулентного штамма двукратной летальной дозой в объеме 0,5 см³ (200 млн.м.к.). За ними наблюдение продолжили до 30 суток.

Результаты определения безвредности и иммуногенной активности приведены в табл. 9.

Таблица 9 – Показатели безвредности и иммуногенности опытных серий вакцин

Серия, №	Вакцина	Доза вакцины, см ³	Безвредность	Результаты заражения через 14 суток штамм <i>S. suis</i>				
				Количество животных	Пало		Выжило	
					Количество животных	%	Количество животных	%
1	ИБФГОА вакцина против стрептококкоза	0,5	безвредна	10	3	30	7	70
2	Формолвакцина с масляным адьювантом	0,5	хромота в течение 2–3 дней	10	4	40	6	60
3	Формолвакцина без адьюванта	0,5	безвредна	10	5	50	5	50
4	Контроль (невакцинированные)	–	–	10	10	100	0	0

В трёх группах из четырёх были применены разные образцы вакцин, а четвёртая группа – контроль (животные не подвергались иммунизации). ИБФГОА вакцина (1 группа) и формолвакцина без адьюванта (3 группа) не вызывали видимые изменения в состоянии животных. Формолвакцина с масляным адьювантом (2 группа) оказалась реактогенной. На месте введения вакцины появлялась местная реакция и наблюдалась хромота, которая исчезала через 2 – 3 суток. Иммуногенность ИБФГОА вакцины составляла 70%. Формолвакцина с масляным адьювантом и формолвакцина без адьюванта предотвращали гибель 60 и 50% соответственно иммунизированных животных.

Таким образом, результаты проведенных опытов свидетельствуют о безвредности и выраженной иммуногенной активности ИБФГОА вакцины против стрептококкоза.

Учитывая полученные данные после однократной иммунизации представлял интерес определение эффективности двукратной вакцинации. В связи с этим проводили опыты на белых мышах, которых вакцинировали подкожно двукратно в дозах 0,25 и 0,5 см³ с интервалом 10 суток и через 14 суток их заражали внутрибрюшинно двойной летальной дозой штамма *Streptococcus suis* «СЛП». Полученные в эксперименте данные обобщены в табл. 10.

Таблица 10 – Иммуногенность и безвредность двукратной вакцинации белых мышей против стрептококкоза

Серия, №	Вакцина	Доза вакцины, см ³	Безвредность	Результаты заражения через 14 суток штамм <i>S. suis</i>				
				Количество животных	Пало		Выжило	
					Количество животных	%	Количество животных	%
1	ИБФГОА вакцина против стрептококкоза	Первая доза 0,25 вторая через 10 суток 0,5	безвредна	10	0	0	10	100
2	Контроль (невакцинированные)	—	—	10	10	100	0	0

Исходя из полученных данных, представленных в табл. 10, следует, что у белых мышей, двукратно привитых ИБФГОА вакциной против стрептококкоза в дозах 0,25 и 0,5 см³, формировалась прочная иммунная защита, обеспечивающая выживаемость 100% животных после заражения двукратной летальной дозой. В контрольной группе была 100% гибель мышей.

На основании полученных результатов разработали лабораторный

регламент изготовления и контроля инактивированной бивалентной гидроокись алюминиевой формолвакцины против стрептококкоза свиней. В общих чертах регламент изготовления вакцины представлен в табл. 11.

Таблица 11 – Схема лабораторного регламента изготовления вакцины

Производственные штаммы <i>S. suis</i>	Освежение (пересевы и заражение б.мышей)
Питательная среда для культивирования производственных штаммов	Приготовление и стерилизация
Определение чистоты исходных культур	Посевы на питательные среды, микроскопирование мазков
Получение матровой разплотки культуры в МПБ	Температура культивирования $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 12 – 24 часа
Получение биомассы в 3 – 5 – литровых бутылках	Бульон Хоттингера, pH 7,2 – 7,4, $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$
Определение концентрации и стандартизация	По стандартам мутности
Инактивация биомассы	Раствором формалина, $t\ 37 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 48 – 96 часов
Адсорбирование антигена	Раствор адьюванта (ГОА 6%), 12 – 24 часа, $t\ 20 - 25^{\circ}\text{C}$
Контроль чистоты, безвредности и активности	Посевы на питательные среды и биопроба на б.мышях.

Для изготовления вакцины в начале необходимо: – освежить музейные штаммы стрептококков путем пересева в питательные среды и заражением белых мышей; – приготовление питательной среды; контроль чистоты культур вакцинированных штаммов; наработка биомассы стрептококков, инактивация; адсорбирование; контроль чистоты, безвредность и иммуногенность.

2.2.4.2 Разработка параметров контроля вакцины против стрептококкоза

Все производимые вакцины должны соответствовать национальным и международным стандартам. Применяться могут только безопасные вакцины, признанные стерильными, безвредными и иммуногенными. Защита прививаемых вакциной животных должна быть не менее 80%. Поэтому при производстве вакцины должны проходить контроль по качеству.

Для оценки ИБФГОА вакцины применяли следующие параметры контроля: внешний вид препарата, определение стерильности, безвредности, иммуногенности, а так же полноты инаktivации. При контроле внешнего вида следили за целостностью тары, цветом, консистенцией, наличием нехарактерных включений, нарушением целостности и герметичности упаковки флаконов. Данные параметры определяли визуально. Внешний вид вакцины представляет собой светло-желтоватого цвета жидкость с белым осадком, который легко разбивается при встряхивании, образуя однородную суспензию. Препарат не имеет посторонних включений.

Вакцина должна быть свободной от посторонних микроорганизмов и не должна содержать живых клеток стрептококков. В процессе изготовления ИБФГОА вакцины для исключения контаминации бактериями и грибами, осуществляли контроль в соответствии с ГОСТ 28085-89, а именно путём высева образцов вакцины на различные питательные среды: Китта-Тароцци, агар и бульон Сабуро, МПА, МПБ. Далее посеы культивировали при температуре 37° С в термостате 10 суток. Результаты обобщены в таблице 12.

На питательных средах роста стрептококков и микрофлоры не выявлялось.

Контроль безвредности проводили на белых мышах, масса которых была 16 – 18 г. Для этого 5-ти особям вакцину инъецировали подкожно в дозе 0,5 см³. В течение 10 дней за животными проводили наблюдение. Таким образом были проверены 3 серии вакцин, которые соответствовали

вышеуказанным требованиям.

В течение всего периода наблюдения белые мыши оставались активными, у них не проявлялись признаки болезни, был сохранён аппетит. На месте введения вакцины в первые дни отмечалась небольшая припухлость, которая исчезала через 5 – 7 дней.

Таблица 12 – Показатели качества и безвредности образцов ИБФГОА вакцин.

Показатели	Номера серий вакцин		
	1	2	3
Упаковка	Герметичные флаконы по 100 мл		
Внешний вид	Желтоватая жидкость с белым осадком, который легко разбивается при встряхивании с образование однородной суспензии.		
Стерильность	Рост микроорганизмов после посева на питательные среды отсутствует.		
Безвредность	В клиническом статусе белых мышей после инъекции вакцины изменения не наблюдаются. Все опытные животные живы.		

Для оценки иммуногенности 3 серий ИБФГОА вакцины, использовали лабораторных мышей, массой 16 – 18 г. Животным опытных групп, в количестве 10-ти особей, для каждой серии инъецировали вакцинные препараты подкожно двукратно. Первичная вакцинация в дозе – 0,25 см³, вторичная – 0,5 см³ интервалами между инъекциями вакцины – 10 суток. Животных из контрольной группы, которых так же было 10 особей, не иммунизировали. Спустя 14 суток после ревакцинации, вакцинированных и интактных белых мышей заражали культурой штамма *S. suis* путём внутрибрюшинного введения в дозе 2 Dlm (200 млн.м.к.).

Результаты исследований иммуногенной активности трех образцов

ИБФГОА вакцины приведены в табл. 13. После двукратной вакцинации первой серии вакцины устойчивыми контрольными заражениями оказались 90% вакцинированных мышей. После иммунизации второй и третьей сериями вакцинных препаратов устойчивыми к контрольному заражению вирулентной культуры оказались 100% животных при 100% гибели контрольных (не вакцинированных) животных.

Согласно современных требований, принято считать, что если выживаемость составляет 8 из 10 иммунизированных, а гибели в контроле – не менее 8 из 10 животных, за которыми наблюдают 10 суток, то вакцина признается иммуногенной. Исследование трех серий вакцин показало, что защищенность лабораторных животных варьировала от 90 до 100%, в среднем $\pm 91,7 \pm 2,1\%$. Следовательно, ИБФГОА вакцина против стрептококкоза, изготавливаемая по разработанному нами лабораторному регламенту является безвредной и создает напряженный иммунитет у белых мышей.

Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о том, что двукратная вакцинация ИБФГОА вакцины создает напряженный иммунитет белых мышей.

Полученные данные явились основанием для проведения испытаний ИБФГОА вакцины против стрептококкоза на свиньях.

Следующая серия опытов была проведена на свиньях.

Таблица 13 – Результаты контроля иммуногенности ИБФГОА вакцины против стрептококкоза

Номера образцов вакцин	Вакцина	Доза вакцины, см ³	Безвредность	Результаты заражения через 14 суток штамм <i>S. suis</i>				
				Количество животных	Пало		Выжило	
					Количество животных	%	Количество животных	%
1.	Против стрептококкоза	Первая доза 0,25, вторая через 10 сут. 0,5	безвредна	10	2	20	8	80,0
2.			Безвредна	10	1	10	0	90,0
3.			Безвредна	10	0	0	10	100,0
4.	Контроль (невакцинированные)	—	—	10	10	100	0	0

2.2.4.3 Изучение эффективности инактивированной бивалентной вакцины против стрептококкоза в производственных условиях на свиньях

Испытания в производственных условиях разработанной ИБФГОА вакцины против стрептококкоза свиней проводились в хозяйстве ООО «Агрокам» Пестречинского района Республики Татарстан. С этой целью было изготовлено 3 серии инактивированной бивалентной формол гидроокись алюминиевой вакцины против стрептококкоза по разработанному лабораторному регламенту, которые прошли контроль по

иммуногенным свойствам и безвредности на лабораторных животных и соответствовали разработанным выше описанным критериям (при испытании на белых мышах иммуногенность составляла 100%).

В первом опыте иммунизировали ИБФГОА вакциной 3-х поросят в возрасте 14 дней. Вакцину вводили внутримышечно в области внутренней поверхности бедра в дозах 2 см^3 и 3 см^3 двукратно с интервалом 10 суток. Поствакцинальных осложнений не наблюдалось, за исключением появления на месте инъекции небольшой припухлости диаметром 5 – 8 мм, которая исчезла полностью через 3 – 5 суток.

Через 1 месяц после вторичной вакцинации трех поросят заражали культурой стрептококков штамма СЛП в дозе 1 млрд. м.к. внутривбрюшинно. Одновременно заражали двух интактных аналогичных поросят (контрольная группа) на 2-3 сутки после заражения у вакцинированных поросят наблюдалось повышение температуры на $0,5 - 0,6^\circ \text{C}$. Все вакцинированные поросята после заражения оставались без видимых клинических признаков болезни в течение всего срока наблюдения (1,5 месяца), тогда как оба невакцинированные поросята заболели и пали на 3 и 8 сутки после заражения. Бактериологическими исследованиями патологического материала от них были выделены стрептококки.

В связи с тем, что СТФ была неблагополучной по стрептококкозу и с учетом результатов экспериментов на поросятах, было принято решение провести вакцинацию поросят 14 – 18 суточного возраста в количестве 70 голов и 20 свиноматок за 1,5 месяца до срока опороса. Поросят иммунизировали двукратно в дозах $2,0$ и $3,0 \text{ см}^3$, свиноматок в дозах 4 и 5 см^3 . Вакцину вводили внутримышечно в области шеи. За вакцинированным поголовьем свиней наблюдения продолжались до 6 месяцев. В качестве контроля вторую группу аналогичных поросят иммунизировали биофабричной вакциной АСПС (ассоциированная поливалентная против сальмонеллеза, пастереллеза и стрептококкоза свиней) двукратно в дозах по 5 см^3 (согласно наставления по применению).

Для определения иммунной перестройки у привитых животных, проводили оценку наличия специфических антител против возбудителя стрептококкоза в сыворотках крови. Исследования проводили спустя 2 и 6 месяца после ревакцинации у 10 животных первой группы и 5 – второй группы, которых отбирали выборочно. Титр антител выявляли в реакции преципитации (РП) в капиллярах в отношении антигена штамма *Str. suis* по общепринятой методике.

Полученные показатели обобщены в табл. 14.

Таблица 14 – Показатели активности вакцины

№ группы и вакцина	Кол-во поросят	Доза в см ³	Заболело гол.	Сохранность % %	Титр антител (lg)	
					Через 30 суток	Через 180 суток
1. ИБФГОА вакцина	70	Первая – 2 Вторая – 3	2	97,1	2,0 ± 0,36*	1,3 ± 0,31
2. Вакцина АСПС	10	Первая – 5 Вторая – 5	3	70	1,2 ± 0,31*	0,5 ± 0,21

*p<0,01

Исходя из полученных данных, приведенных в таблице 13, можно говорить о том, что у поросят, привитых ИБФГОА вакциной, отмечалось формирование прочной специфической иммунной защиты с образованием специфических антител. Сохранность поросят через 6 месяцев составлял 97,1%. Титр специфических антител к антигену штамма *Str. suis*, через 2 месяца составил 1,8 – 2,1 lg(2,0 ± 0,36) и к 6 месяцам оставался на уровне 1,2 – 1,5 lg (1,3 ± 0,31). Клинически больных стрептококковой инфекцией среди вакцинированных ИБФГОА вакциной поросят не наблюдалось, что свидетельствует об эффективной защите. Во второй группе поросят, привитых ассоциированной поливалентной вакциной против сальмонеллеза, пастереллеза и стрептококковых инфекций, 30% поросят заболели. Титр

антител к стрептококкозу у этой группы поросят был $1,2 \pm 0,31$, что в 1,7 раза ниже по сравнению с ИБФГОА вакциной ($p > 0,01$). Недостаточная напряженность иммунитета у этой вакцины против стрептококкоза, по-видимому, обусловлена неполным соответствием антигенной структуры вакцинного штамма с эпизоотическим штаммом и отсутствием в составе вакцины токсиногенного компонента. Титры специфических антител у вакцинированных поросят сохранялись на значительном уровне спустя 6 месяцев после вакцинации. При этом уровень антител у первой группы животных был 2 раза выше по сравнению со 2 группой. На основании полученных данных, можно сделать вывод о высокой профилактической эффективности разработанной ИБФГОА вакцины.

В связи с тем, что у свиноматок первые дни после опороса часто возникали маститы, эндометриты и агалактия из-за поражения их стрептококками, а новорожденные поросята впервые же дни заболевали стрептококкозом, возникла необходимость специфической профилактики. Поэтому оценивали эффективность ИБФГОА вакцины для профилактики мастита, эндометрита и агалактии, а также для создания колострального иммунитета у новорожденных поросят (схема опыта и режим иммунизации и результаты обобщены в табл. 15).

После проведения иммунизации у животных не наблюдалось каких-либо отклонений от физиологической нормы. При определении уровня специфических антител в сыворотках крови свиноматок было установлено, что спустя 30 суток титры составляли $2,1 \pm 0,21$ lg, а через 2 месяца на уровне $1,4 \pm 0,31$ lg. Таким образом, вакцинация вызвала создание напряженного иммунитета у свиноматок, который сохранялся на высоком уровне и через 2 месяца. Специфические антитела у вакцинированных свиноматок регистрировались спустя 6 месяцев после вакцинации. У привитых свиноматок клинически маститы, эндометриты и агалактии не наблюдалось.

Все свиноматки опоросились и послеродовой период у них проходил

без осложнений. В пометах от вакцинированных свиноматок были от 8 до 10 жизнеспособных поросят. От вакцинированных 19 свиноматок получена 204 поросенка. Одна свиноматка выбыла из опыта – оказалась бесплодной.

В результате проведенных исследований было установлено, что разработанная против стрептококкоза ИБФГОА вакцина является безвредной, создает напряженный иммунитет у свиноматок. В результате её применения у животных формируется активная иммунная защита, спустя 14 суток после ревакцинации. Применение вакцины способствовало прекращению энзоотии и повышению сохранности поросят.

Таблица 15 – Схема иммунизации и антителогенез у свиноматок, иммунизированных ИБФГОА вакциной

№ п/п	Кол-во свиноматок в опыте	Доза в см ³	Иммуногенность (титр антител), Ig	
			Через 30 суток	Через 60 суток
1.	19	Первая и вторая 5,0	$2,1 \pm 0,21$	$1,8 \pm 0,31$

Среди поросят, полученных от вакцинированных свиноматок, случаев возникновения стрептококкоза не регистрировалось в течение срока наблюдений. В сыворотках крови поросят, взятых через 7 дней после рождения, содержание специфических антител составил $0,7 \pm 0,21$, что свидетельствует о передаче им специфических антител молозивом.

2.2.4.4 Гематологические, биохимические и иммунологические исследования свиней до и после иммунизации ИБФГОА вакциной

После двукратной вакцинации свиноматок и поросят, от отдельных

особей брали пробы крови для биохимических, гематологических и иммунологических исследований. Общий анализ крови проводили на гематологическом анализаторе BC-2800 Vet (Mindray, Kitai), фагоцитарную активность лейкоцитов определяли по соотношению активных лейкоцитов (фагоцитов) к общему числу подсчитанных нейтрофилов. Фагоцитарный индекс вычисляли по числу фагоцитированных микробов *E. coli* одной клеткой [70]. Активность нейтрофилов рассчитывали в НСТ – тесте в модификации А.М. Алимова [8].

Результаты определения основных гематологических показателей иммунизированных ИБФГОА вакцины поросят и свиноматок приведены в табл. 16 и 17.

Таблица 16 – Гематологические показатели поросят (n=5)

Показатели	До вакцинации	Через 14 дней после двухкратной вакцинации
Эритроциты, 10^{12} /л	$7,2 \pm 0,22$	$7,7 \pm 0,21$
Гемоглобин, г/л	$104,6 \pm 2,32$	$108,8 \pm 2,51$
Лейкоциты, 10^9 /л	$27,1 \pm 1,41$	$28,6 \pm 1,13$
Общий белок, г/л	$55,1 \pm 0,31$	$56,1 \pm 0,25$
Альбумины, г/л	$23,3 \pm 1,34^*$	$20,8 \pm 1,41^*$
Глобулины, г/л	$76,7 \pm 1,23^*$	$79,2 \pm 1,12^*$
Соотношение глобулинов/альбуминов	3,3	3,8

* $p < 0,05$

Содержание эритроцитов, гемоглобина и общего белка до и после вакцинации поросят существенно не изменилось, отмечался небольшой лейкоцитоз (увеличение на 5%). После вакцинации количество альбуминов снизилось на 11% ($p > 0,05$), а содержание глобулинов возросло на 3,3%

($p>0,05$). Аналогичная картина наблюдалась и у свиноматок (табл. 17). После вакцинации основные параметры клеток крови существенных изменений не претерпевали.

Таблица 17 – Гематологические показатели свиноматок (n=3)

Показатели	До вакцинации	Через 14 дней после двукратной вакцинации
Эритроциты, 10^{12} /л	$7,8 \pm 0,27$	$7,9 \pm 0,18$
Гемоглобин, г/л	$116,3 \pm 1,51$	$113,4 \pm 1,32$
Лейкоциты, 10^9 /л	$28,6 \pm 1,37$	$29,8 \pm 1,28$
Общий белок, г/л	$56,1 \pm 1,42$	$57,1 \pm 1,52$
Альбумины, г/л	$24,1 \pm 1,12$	$21,7 \pm 1,21$
Глобулины, г/л	$75,9 \pm 0,71^*$	$78,3 \pm 0,67^*$

* $P<0,05$

Через 14 дней после двукратной вакцинации у поросят в лейкоформуле наблюдались определенные изменения, характерные для вакцинного процесса (табл. 18). В частности, после вакцинации в 1,4 возросло количество палочкоядерных нейтрофилов ($p<0,05$) на фоне снижения сегментоядерных нейтрофилов и моноцитов. После вакцинации у поросят наблюдалось небольшое увеличение (на 6,5%) содержания лимфоцитов. Эта картина характерна для вакцинного процесса и свидетельствует об активации биосинтеза лейкоцитов.

Определенные изменения отмечались у поросят в показателях естественной резистентности, характерные для иммунного ответа (табл. 19). В частности, после вакцинации произошло возрастание лизоцимной активности сыворотки крови на 18%, ФА и ФИ – на 17% и 24% соответственно. Наблюдалось усиление функциональной активности

нейтрофилов крови в спонтанном на 30% и стимулированном вариантах реакции на 10%.

Таблица 18 – Лейкоцитарная формула крови поросят до и после вакцинации ИБФГОА (n=3)

Показатели	Ед. изм.	До вакцинации	После вакцинации
Нейтрофилы:			
Палочкоядерные	%	$3,4 \pm 1,12 *$	$4,8 \pm 1,12 *$
Сегментоядерные	%	$8,1 \pm 0,72$	$5,3 \pm 0,66 *$
Эозинофилы	%	$6,3 \pm 0,81$	$5,1 \pm 1,08$
Базофилы	%	$0,1 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,01$
Моноциты	%	$7,1 \pm 0,81$	$4,6 \pm 0,07 *$
Лимфоциты	%	$75,1 \pm 1,13$	$80,2 \pm 3,15$

* $p < 0,05$

Таблица 19 – Показатели естественной резистентности поросят до и после двукратной вакцинации ИБФГОА вакциной (n=5)

Показатели	Ед. изм.	До вакцинации	После вакцинации
Лизоцимная активность	%	$12,3 \pm 0,67$	$14,6 \pm 0,78$
Фагоцитарная активность	%	$47,3 \pm 1,65$	$55,3 \pm 1,83$
Фагоцитарное число	%	$4,1 \pm 0,3$	$5,1 \pm 0,3$
НСТ – тест (СВ)	%	$7,8 \pm 0,4$	$10,2 \pm 0,6 *$
НСТ – тест (АВ)	%	$60,8 \pm 2,36$	$66,8 \pm 2,13 *$

Примечание: СВ – спонтанный тест, АВ – стимулированный вариант.

Обобщая полученные результаты, следует отметить, что гематологические, биохимические и иммунологические исследования

свиноматок и поросят до и после вакцинации свидетельствуют о том, что ИБФГОА вакцина вызывает иммунную перестройку организма, характерную для вакцинного процесса. После вакцинации наблюдался биосинтез специфических антител, возрастание показателей естественной резистентности (ФА, ФИ, функциональной активности нейтрофилов) и определенные изменения в лейкоформуле. Эти данные свидетельствуют о высокой антигенной и иммунной активности вакцины и о приобретении устойчивого иммунитета у вакцинированных животных к стрептококкозу.

2.2.5 Влияние на иммуногенез при вакцинации поросят ИБФГОА вакцины Фераминовита

Несмотря на то что, в этиологии возникновения стрептококкоза животных являются патогенные стрептококки, важное значение имеют состояние обмена веществ, полноценность питания, условия содержания кормления, дисбаланс которых способствует снижению резистентности животных. Поэтому коррекция состояния обмена веществ и дефицита отдельных незаменимых элементов играет важную роль в иммуногенезе. В связи с этим, в следующей серии опытов использовали комплексный препарат – Фераминовит, разработанный сотрудниками кафедры биологической и неорганической химии Казанской ГАВМ. В опытах использовали 204 поросят, полученных от вакцинированных ИБФГОА вакцины свиноматок. Сформировали две группы поросят по 102 голов с каждой. По достижении 15 – 18 суточного возраста всех поросят иммунизировали внутримышечной инъекцией ИБФГОА вакциной двукратных дозах 2-3 мл с интервалом 10 дней. Первой группе поросят для коррекции обмена веществ и повышения резистентности одновременно с вакцинацией вводили внутримышечно по 2 мл Фераминовита, согласно временных ветеринарных правил по его применению, утвержденных начальником ГУВ КМ по Республике Татарстан (12.09.2016 г.). Вторая

группа получала только вакцину. Отъем поросят проводился в 35 суточном возрасте. Уровень специфических антител и роста весовые показатели поросят обобщены в таблице 20.

Средние - суточный прирост поросят первой группы к отъему составил 353,1 г., а у второй группы только 268,7 г. Титры специфических антител у поросят первой группы оказались на уровне $2,1 \pm 0,07 * \lg$, тогда как у второй группы они были на 17 % ниже. Следовательно, одновременное ведение с вакциной Фераминовита способствовало более интенсивному росту поросят и усилению иммунного ответа.

Таблица 20 – Титры специфических антител и масса поросят (n=10)

Группы	Масса тела в возрасте		Средний суточный прирост, г	Титры АТ, lg
	2 сут., г	35 сут., кг		
Первая	1223,0	$10,2 \pm 0,15 *$	353,1	$2,1 \pm 0,07 *$
	75,0			
Вторая	1230,0	$9,9 \pm 0,17 *$	268,7	$1,8 \pm 0,16 *$
	62,0			

* $p < 0,01$

Результаты определения морфологического состава крови и функциональной активности нейтрофилов обобщены в таблице 21.

Анализируя полученные данные, следует отметить, что применение Фераминовита способствовало усилению гемопоэза, о чем свидетельствует относительно высокое содержание у поросят первой группы эритроцитов (на 13%), лейкоцитов (на 14,9 %), лимфоцитов, особенно Т – и В – клеток ($p <$

0,05). Функциональная активность нейтрофилов в НСТ – тесте также оказалась относительно более высоким уровне у поросят первой группы.

Биохимические исследование крови также свидетельствует о положительном влиянии на организм поросят инъекций Фераминовита (Табл. 22).

У этих поросят содержание гемоглобина, гамма – глобулина и железа значительно более выше по сравнению с аналогичной второй группой. Следует отметить, что насыщение крови железом у поросят первой группы оказалось на 21,7 % выше по сравнению с контрольным уровнем ($p < 0,01$).

Табл. 21 – Морфо – функциональный состав крови поросят двухмесячного возраста ($n = 10$)

Показатели	Ед. изм.	1 группа	2 группа
Эритроциты	10^{12} /л.	$6,7 \pm 0,21^*$	$5,9 \pm 0,31$
Лейкоциты	10^9 / л.	$14,6 \pm 0,34^*$	$13,7 \pm 0,35$
Лимфоциты	%	$46,8 \pm 0,63$	$49,6 \pm 0,51$
Т – лимфоциты	%	$55,7 \pm 2,71^*$	$51,3 \pm 1,72$
В - лимфоциты	%	$8,7 \pm 0,61^*$	$6,5 \pm 0,52$
Нейтрофилы:			
- юные	%	$2,7 \pm 0,06$	$1,9 \pm 0,05$
- п /ядерные	%	$6,2 \pm 0,81$	$9,8 \pm 0,86$
- с/ядерные	%	$43,1 \pm 0,71$	$32,4 \pm 0,73$
Эозинофилы	%	$2,1 \pm 0,06$	$3,2 \pm 0,23$
Базофилы	%	0,1	0,1
Моноциты	%	$2,0 \pm 0,01$	$3,0 \pm 0,01$
НСТ – тест спонт.	%	$7,8 \pm 0,81$	$5,9 \pm 0,63$

НСТ – тест стимул.	%	$13,7 \pm 0,34$	$10,6 \pm 0,41$
--------------------	---	-----------------	-----------------

Активность ферментов АЛТ и АСТ указывают о положительном влиянии Фераминовита на функцию печени. Полученные данные позволяют констатировать об эффективности применения Фераминовита для повышения резистентности организма поросят и усиления иммунного ответа на вакцину.

Табл. 22 – Биохимические показатели крови поросят двухмесячного возраста (n = 10)

Показатели	Ед. изм.	1 группа	2 группа
Гемоглобин	г/л	$118,6 \pm 1,31^*$	$108,1 \pm 1,22$
Общий белок	г/л	$78,7 \pm 4,71$	$70,3 \pm 3,82$
Альбумины	%	$32,8 \pm 2,61$	$37,6 \pm 3,17$
Глобулины	%	$67,2 \pm 2,31$	$62,4 \pm 2,72$
Гамма – глобулины	%	$26,3 \pm 1,53^*$	$20,1 \pm 1,63$
Щёлочн. рез.	% CO ₂	$48,7 \pm 3,27$	$45,6 \pm 2,71$
Глюкоза	м моль / л	$4,9 \pm 0,33$	$4,1 \pm 0,21$
Железо	мк моль/ л	$31,3 \pm 2,17^*$	$25,7 \pm 1,72$
АЛТ	н кат / л	$1617,2 \pm 101,3^*$	$1783,2 \pm 98,31$
АСТ	н кат/ л	$525,0 \pm 42,7^*$	$686,9 \pm 37,8$

2.2.6 Оценка экономической эффективности ИБФГОА вакцины

Экономическая эффективность ИБФГОА вакцины оценивали в сравнении с биофабричной вакциной – ассоциированная поливалентная против сальмонеллёза, пастереллёза и стрептококкоза свиней. Расчёт предотвращённого экономического ущерба проводили по методике Никитина И. Н. [91]. Предотвращённый ущерб оценивали по результатам опыта, проведённого на 80 поросятах, из них 70 – вакцинированы ИБФГОА и 10 – ассоциированы поливалентной вакциной против сальмонеллёза, пастереллёза и стрептококкоза свиней.

Формула расчета следующий:

$P_y = (M_0 K_1 * K_n * Ц)$, где

P_y – предотвращенный ущерб, руб.;

M_0 – количество поросят в группе;

K_1 – коэффициент заболеваемости свиней стрептококкозом;

K_n – удельная величина потерь продукции в расчете на одно животное;

$Ц$ – цена 1 кг. Живой массы свиней после откорма, руб.;

$У$ – ущерб от падежа поросят.

Расчёт:

$$P_y = (70 * 0,26 * 100 * 130) - 26\,000 = 210\,600 \text{ руб.}$$

Таким образом, предотвращенный экономический ущерб от применения ИБФГОА вакцины против стрептококкоза свиней составил 210 600 руб. В пересчёте на одну голову животного предотвращенный экономический ущерб составляет 3008,6 руб. Кроме того, за счёт более высокого среднесуточного прироста при применении Фераминовита дополнительный экономический эффект составляет 48 рублей на одну голову.

3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Свиноводство во многих регионах РФ и за рубежом остается одной из основных отраслей животноводства [118, 132]. Эффективность свиноводства во многом зависит от эпизоотического благополучия хозяйств, так как значительный экономический ущерб этой отрасли наносят респираторные и желудочно-кишечные болезни молодняка, а так же метрит-мастит-агалактия свиноматок [33, 48, 69, 94, 116]. В этиологии бактериальных заболеваний свиней значительный удельный вес занимают возбудители кокковых инфекций [2, 23, 34, 116].

Специфическая профилактика инфекционных заболеваний животных является одной из основных реально осуществляемых мер контроля эпизоотических процессов в практике. Однако специфическая профилактика стрептококкоза имеет ряд недостатков. Имеющиеся вакцины, в основном, содержат штаммы одного серотипа, тогда как стрептококки, вызывающие патологии животных представлены многими сероварами [45, 57]. Кроме того, в патогенезе стрептококкоза высокую роль играют не только бактериальные клетки, но и в значительной степени экзотоксины и капсульные субстанции стрептококков [22, 137]. Поэтому они должны присутствовать в составе вакцины в качестве иммуногена. Однако последние не всегда присутствуют в составе известных вакцин.

С учетом изложенного, целью наших исследований явилась оценка эпизоотической ситуации по стрептококкозу в хозяйствах Среднего Поволжья, изучение биологических свойств выделенных изолятов стрептококков и разработка инаktivированной вакцины для профилактики стрептококкоза свиней.

При изучении эпизоотической обстановки и в ретроспективном анализе инфекционной патологии сельскохозяйственных животных учитывали статистические данные, результаты собственных исследований и обследований хозяйств за период с 2014 по 2018 годы.

Проведенный анализ свидетельствует о том, что среди сельскохозяйственных животных наблюдается заболеваемость разными бактериальными инфекционными болезнями. Часто регистрировались стрептококкоз, колибактериоз, псевдомоноз, стафилококкоз, реже сальмонеллез, пастереллез, инфекционная энтеротоксемия и другие.

Результаты проведенных исследований показывают, что основными причинами возникновения и распространения инфекционных болезней в отдельных хозяйствах Среднего Поволжья являются: нарушения нормативных требований по кормлению, содержанию животных и технологии ведения животноводства, несанкционированная реализация продуктов животноводства без должного контроля. Поэтому для снижения эпизоотической напряженности по экономически значимым инфекционным болезням необходимо разрабатывать и строго выполнять противоэпизоотические мероприятия с учетом конкретных ситуаций. Главное значение имеют специальные меры, направленные на своевременную диагностику и вакцинацию восприимчивых животных. Полученные нами данные согласуются с результатами исследований других авторов [33, 34, 35, 39, 41, 50, 75] и подтверждают сведения о широком распространении стрептококкоза среди сельскохозяйственных животных.

В своих исследованиях при диагностике стрептококкоза учитывали эпизоотологические, клинические данные, патоморфологические изменения в органах и тканях животных и руководствовались «Методическими указаниями по лабораторной диагностике стрептококкоза животных», утвержденных ГУВ МСХ СССР (25.09.1980) и «Методических указаний по бактериологической диагностике смешанных кишечных инфекций» (Москва – 2000).

При изучении клинического проявления стрептококкоза у сельскохозяйственных животных установили, что болезнь протекает сверхостро, остро, подостро и хронически. Заболевали стрептококкозом

животные всех возрастов, начиная со 2 – 3-го дня после рождения и до 120-дневного возраста, а также взрослое поголовье. Болезнь проявлялась септициемией, конъюнктивитами, пневмонией, артритами, энтеритами. У новорожденных наблюдалось воспаление пупочного канатика-омфалит. Заболевание регистрировалось в течение всего года, чаще всего в период с декабря по апрель.

У взрослых животных, особенно у коров, наблюдались поражения венчика копыт, воспаление межкопытной щели, пододерматиты, дерматиты, абсцессы, маститы, эндометриты. У свиноматок после родов часто возникали эндометриты, маститы, агалактия и другие.

При стрептококкозе у 1 – 2 - месячных поросят наиболее часто отмечали миненгиты, серозно-катаральную и геморрагическую пневмонии, серозно-катаральный и геморрагический гастроэнтериты, фибриновые перитониты и плевриты, гепатиты. У 2 – 4 месячных поросят находили серозно-катаральную пневмонию, геморрагическую пневмонию, серозно-катаральный и геморрагический гастроэнтериты, дерматиты, абсцессы. У свиноматок регистрировались агалактия, маститы, индометриты, поражение суставов. Эти признаки обусловлены тем, что в патогенезе стрептококкоза, так же как и при ряде других инфекций важное значение имеет состояние иммунной системы слизистых оболочек и организма, что согласуется данными ряда исследователей [22, 24, 45, 46, 79, 101].

Отмечено большое количество экссудата, содержащего эритроциты и нейтрофилы, заполняющие просветы мелких бронхов и альвеол. Выявлялась выраженная десквамация, а так же дистрофия клеток альвеолярного эпителия легочной ткани.

От павших и больных животных, в ходе проведения лабораторно-диагностических и бактериологических исследований, было выделено 95 разных видов микроорганизмов рода *Streptococcus*, в том числе: *Str. pneumoniae* , *Str. septicum* , *Str. pyogenes* , *Str. uberis*, *Str. bovis* , *Str. vestibularis*, *Str. zooepidemicus*, *Str. Salivarius*, *Str. mutans*, *Str. Galolyticus*.

Общие ветеринарно-санитарные мероприятия, проводимые в отдельных хозяйствах не обеспечивали благополучие животных от стрептококкоза. В связи с этим, дальнейшие наши исследования были ориентированы на создание и изучение противострептококковой вакцины.

Для конструирования вакцины, была необходимость в разработке технологии изготовления, оптимизация в условиях культивирования и контроля вакцинного препарата, а так же оценка его эффективности. В первую очередь была необходимость подбора питательной среды для культивирования стрептококков и отработка режима их культивирования.

Для культивирования стрептококков применяют различные питательные среды [70, 107]. Важным аспектом для приготовления вакцины является наработка биомассы вакцинного штамма с сохранением его биологических свойств. Поэтому мы изучали рост отдельных штаммов *Streptococcus* на разных питательных средах. При этом установили, что полусинтетическая среда на основе гидролизата лактоальбумина обеспечивает максимальное накопление биомассы стрептококков. Выраженная интенсивность роста стрептококков происходила и в бульоне Хоттингера с глюкозой и твином-40. Об эффективности питательных сред на основе гидролизата белка сообщали ряд исследователей [70, 106, 173, 182]. Поэтому для наработки биомассы стрептококков использовали бульон Хоттингера с добавлением глюкозы и полусинтетическую среду с гидролизатом лактоальбумина, которых обогащали твин-40. В присутствии последнего стрептококки при культивировании образовывали капсулу, так же как и в сывороточных средах.

Одним из ключевых вопросов при изготовлении инактивированных вакцин является выбор инактиватора. Он должен обеспечивать полную инактивацию микроорганизма и сохранность его специфических антигенных свойств и токсигенных компонентов. В этом аспекте наиболее эффективным для бактерий является формалин, который часто применяется в качестве инактиватора и консерванта [26, 27, 29]. Режим инактивации стрептококков

отрабатывали путем внесения растворов формалина различной концентрации (0,1 – 0,4%) в выращенные культуры бактерий и выдержке их при температуре 22 и 37° С.

Концентрация клеток микроорганизмов вакцинных штаммов *Streptococcus suis* в суспензии, выращенной для приготовления вакцины, должна составлять не менее 4 млрд. в 1 см³ по бактериальному стандарту. Опытным путем было установлено, что полная инаktivация стрептококков достигается при конечной концентрации формалина 0,3% в основном за 1 – 2 сутки при 37° С. Поэтому в качестве инаktivатора при изготовлении вакцины применяли формалин в конечной концентрации 0,3% и выдержке при 37° С до 6 – 7 суток. Подобные результаты были получены рядом исследователей для инаktivации сальмонелл и пастерелл при изготовлении вакцин [28, 29].

Для подтверждения полноты проведения инаktivации возбудителя производили высевы на стерильные питательные среды: мясо-пептонный бульон и мясо-пептонный агар, бульон и агар Хоттингера с глюкозой. Проводили микроскопию окрашенных по методу Грама мазков. При необходимости использовали заражение лабораторных животных, за которыми вели наблюдение в течение 10 суток. В результате проведенной работы нами создана технология изготовления инаktivированной противострептококковой вакцины.

Отработана техника инаktivации культуры возбудителя штаммов *Sreptococcus suis*, которая основана на бактериостическом и консервирующем действии формалина с сохранением антигенных свойств стрептококков и их токсинов. Методика совместного действия температуры и химического вещества позволила снизить количество используемого формалина для добавления к культуре возбудителя. Сократилось и время, затрачиваемое на проведение инаktivации по сравнению с ранее используемой методикой. Подобные результаты были получены и другими исследователями на различных микроорганизмах [26, 27, 28, 29].

Для инаktivированных вакцин важным компонентом является иммуномодулятор (адьювант) [30, 97, 98, 140, 114]. В качестве адьюванта при создании инаktivированных вакцин широко применяется гидрат окиси алюминия [16, 30, 123, 137]. Поэтому мы свой выбор остановили на гидрате окиси алюминия. Инаktivированную биомассу стрептококков адсорбировали на гидрате окиси алюминия.

Таким образом, в результате проведённой работы нами создана методика приготовления инаktivированной бивалентной формол-гидроокись алюминиевой вакцины против стрептококкоза (лабораторный регламент).

Используя разработанный лабораторный регламент изготовления противострептококковой вакцины были приготовлены несколько опытных серий инаktivированной бивалентной формол-гидроокись алюминиевой вакцины на основе двух штаммов *Streptococcus suis*.

Предварительно отработали прививочную дозу в опытах на белых мышках. Безвредность и иммуногенность препарата оценивали на белых мышках путем инъекций вакцины в дозах 0,125...1,0 мл, которые не вызывали существенных отклонений в клиническом статусе привитых животных, хотя при введении в дозе 1 мл у мышеч наблюдалось некоторое угнетенное состояние в первые дни после инъекции вакцин. Результаты данного опыта показали, что вакцинный препарат создаёт определённую защиту от стрептококкоза (табл. 8). После однократной иммунизации белых мышеч в дозах 0,5 и 1,0 мл. устойчивыми к контрольному заражению оказались только 50 - 60% дозах 0,25 и 0,125 мл. соответственно 40% и 20% животных. Доза 1 мл. для белых мышеч оказалась реактогенной из за объёма препарата. В связи с относительно низкой устойчивостью белых мышеч после однократной вакцинации проводили двукратную вакцинацию, которая обеспечивала 100% защиту вакцинированных мышеч от внутрибрюшинного заражения двумя смертельными дозами (2 D_{lm}) вирулентного штамма стрептококков (табл. 10).

По разработанному лабораторному регламенту было изготовлено несколько партий ИБФГОА вакцины. Для определения иммуногенности этих образцов вакцин были проведены опыты на белых мышах, которых иммунизировали двукратно в дозах 0,25 и 0,5 мл. с интервалом 10 дней. Все серии образцов вакцин оказались безвредными и их иммуногенность составляла 80 – 100%, при гибели всех невакцинированных животных после контрольного заражения вирулентным штаммом в дозе 2 Dlm.

Полученные данные явились основанием для испытания ИБФГОА вакцины на свиньях. Вначале иммунизировали ИБФГОА вакциной трех поросят 14 дневного возраста двукратно с интервалом 10 дней в дозах 2 и 3 мл соответственно. У них поствакцинальных осложнений и отклонений от клинического статуса не наблюдалось. Через 1 мес. после второй вакцинации их и двух аналогичных невакцинированных поросят заражали культурой вирулентного штамма стрептококков внутрибрюшинно в дозе 1 млрд.м.к. Вакцинированные поросята оказались устойчивыми к контрольному заражению и нормально развивались при гибели обоих невакцинированных поросят.

Следующую серию опытов проводили в условиях хозяйства. В условиях свинофермы вакцинировали 80 поросят в возрасте 14 – 18 дней (70 поросят – первая группа иммунизировали ИБФГОА вакциной, вторая группа – 10 голов привиты с ассоциированной поливалентной вакциной против сальмонеллеза, пастереллеза и стрептококкоза свиней). Кроме того, 20 супоросных свиноматок за 1,5 месяца до опороса иммунизировали ИБФГОА вакциной. Хозяйственные опыты показали высокую эффективность вакцинации и испытуемого препарата. Сохранность вакцинированных поросят за 6 месячный период наблюдения составила 97,5%. До конца срока наблюдения (6 мес.) у вакцинированных поросят титры специфических антител составляли 1:16 – 1:32. Случаи клинического проявления стрептококкоза у этой группы не наблюдалось. У поросят, привитых коммерческой вакциной, отход от стрептококкоза составил 20%.

У свиноматок после двухкратной вакцинации ИБФГОА вакциной осложнений не наблюдалось. До опороса одна свиноматка выбыла по хозяйственным причинам (оказалась бесплодной). От 19 свиноматок получено 204 поросят и их сохранность к отъему составила 97,5%. У свиноматок явлений эндометритов, маститов и агалактии не было. У семисуточных поросят после приема молозива выявлялись специфические антитела в РА против стрептококков в титрах 1:8 – 1:16, что свидетельствует о колостральном иммунитете.

Гематологическими, биохимическими и иммунологическими исследованиями установили, что после двукратной иммунизации поросят и свиноматок ИБФГОА вакциной наблюдалась иммунологическая перестройка организма, характерная для вакцинного процесса. При этом содержание эритроцитов, гемоглобина и общего белка существенно не отличалось от исходных показателей. После вакцинации у поросят наблюдалось небольшое нарастание глобулинов в сыворотке крови, палочко-ядерных нейтрофилов и лимфоцитов, а также активация показателей естественной резистентности (ФА, ФИ и НСТ-тест), что характерно для иммунного ответа и согласуется данными других авторов [80, 97, 98, 99]. У вакцинированных поросят повышались показатели естественной резистентности, лизоцимная и фагоцитарная активность и функциональная активность нейтрофилов, а также происходил синтез специфических антител.

Одновременное применение Ферраминовита при вакцинации поросят ИБФГОА вакцины способствовал улучшению обмена веществ в организме, активизация клеточно – гуморальных показателей, повышению резистентности и иммунного ответа на вакцину, а также оказывал положительное влияние на рост поросят.

По результатам опыта рассчитали предотвращенный экономический ущерб, который составил 210 600 рублей и в пересчёте на одно животное 3008,6 руб.,

Таким образом, результаты проведенных исследований показали, что разработанная нами инактивированная бивалентная формол гидроокись алюминиевая вакцина создает напряженный иммунитет у свиней и может быть использована для профилактики стрептококковой инфекции. Созданная нами инактивированная бивалентная формол гидроокись алюминиевая вакцина может быть использована для иммунизации свиноматок и поросят в системе мероприятий, проводимых против стрептококкоза в неблагополучных хозяйствах.

Результаты проведенных исследований позволяют сделать следующие **выводы:**

1. На основании обследований отдельных хозяйств хозяйств в зоне Среднего Поволжья и бактериологических исследований 1145 проб биоматериала за 2014 – 2019 годы выделено 407 изолятов бактерий, среди которых 99 изолята идентифицированы как стрептококки (24,3%), что свидетельствует о достаточно широком распространении стрептококкозов в патологии сельскохозяйственных животных, в частности у свиней.

2. Изучением культурально-морфологических, биохимических и антигенных свойств выделенных изолятов стрептококков установлено, что 35% из них относятся к серогруппе D, 16% – к G, 3% – к C и 1,5% – к B. При этом от телят и поросят с признаками поражения респираторных органов и системы пищеварения выделялись следующие виды *Streptococcus*: *acidomininus*, *bovis*, *pneumonia*, *suis*, *vestibularis*, *oralis*, *zooepidemicus*, *salivarius*, *mutans*. Наиболее часто регистрировались виды *Streptococcus*: *suis* (35%), *pneumoniae* (18%), *acidomininus* (16%), *bovis* (14%), *vestibularis* (6%), *oralis* (5%), *zooepidemicus* (4%), *salivarius* (2%), *mutants* (1%).

3. Клинически стрептококкозы у свиней проявлялись в острой, подострой и хронических формах, протекающих с поражением респираторных органов, пищеварительной системы и сепсиса в зависимости от вида и возраста животных, а также от серотипа стрептококков. У молодняка наблюдалось поражение респираторных органов и системы

пищеварения, явления септицемии, а у взрослых особей – маститы, эндометриты, поражения конечностей и кожи.

4. Разработан лабораторный регламент изготовления инактивированной бивалентной формол гидроокись алюминиевой вакцины против стрептококкоза свиней, содержащая не только бактериальную массу двух штаммов стрептококков (серотипы С и D), но и токсины и капсульную субстанцию, которая достигалась культивированием вакцинных штаммов в жидких питательных средах (бульон Хоттингера содержащий 0,4% глюкозы и 0,1% твина-40).

5. Полученная инактивированная бивалентная формол гидроокись алюминиевая вакцина против стрептококкоза свиней создает напряженной иммунитет у лабораторных животных (белые мыши) и свиней. Иммуногенность при экспериментальном заражении двукратно вакцинированных белых мышей составляла 90 – 100%, а поросят – 100%.

6. Иммунный ответ на вакцинацию у поросят и свиноматок сопровождается синтезом специфических антител и клеточно-гуморальной перестройкой организма. Одновременное применение Фераминовита при вакцинации поросят способствует усилению иммунного ответа, повышению резистентности организма и оказывает положительное влияние на рост поросят.

7. Двукратная иммунизация супоросных свиноматок за 1,5 месяца до опороса разработанной вакциной обеспечивает профилактику у них маститов, эндометритов и агалактии, а также создает колостральную защиту новорожденных поросят от стрептококкоза.

8. Предотвращённый экономический ущерб от применения ИБФГОА вакцины по результатам опытов составил 210 600 руб. и в пересчёте на одно животное 3008,6 руб. При использовании Фераминовита для повышения иммуногенеза дополнительный экономический эффект составляет 48 рублей на одну голову.

4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. Для профилактики стрептококкоза свиней в неблагополучных хозяйствах рекомендуется применять инаktivированную бивалентную формол гидроокись алюминиевую вакцину, изготавливаемую в соответствии с лабораторным регламентом «Изготовления и контроля инаktivированной бивалентной формол гидроокись алюминиевой вакцины против стрептококкоза свиней», утвержденного ректором ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» 11 марта 2021 году согласно «Временных ветеринарных правил по применению инаktivированной бивалентной формол гидроокись алюминиевой вакцины против стрептококкоза свиней», утверждённых Начальником главного управления ветеринарии кабинета министров Республики Татарстан (17 марта 2021 года).

5 ПРИЛОЖЕНИЯ

1. Лабораторный регламент «По изготовлению и контролю инаktivированной бивалентной формол-гидроокись алюминиевой вакцины против стрептококкоза свиней».

2. Временные ветеринарные правила по применению инаktivированной бивалентной формол-гидроокись алюминиевой вакцины против стрептококкоза свиней.

3. Акт о производственных испытаниях вакцины.

6 СПИСОК СОКРАЩЕННЫХ ТЕРМИНОВ

АГ – антиген

АТ – антитело

БХ – бульон по Хоттингеру

БХГТВ – Бульон по Хоттингеру с добавлением глюкозы и твина -40

ГОА – гидрат окиси алюминия

ИБФГОА – инактивированная бивалентная формол-гидроокись
алюминиевая

м.к. – микробная клетка

МПА – мясо-пептонный агар

МПБ – мясо-пептонный бульон

НСТ – нитросиний тетразолиевый

ООО – общество ограниченной ответственности

РП – реакция преципитации

СТФ – свино-товарная ферма

ФА – фагоцитарная активность

ФИ – фагоцитарный индекс

ЦНС – центральная нервная система.

7 Список иллюстрационного материала

Рисунок 1 – Схема проведения исследований

Рисунок 2 – Мазки, окрашенные по Граму х700

Рисунок 3 – Мазки, окрашенные по Граму х 900

Рисунок 4 – Рост культуры на обогащённом МПБ

Рисунок 5 – Зона гемолиза на МПА, обогащённом кровью

Рисунок 6 – Рост микроорганизмов на МПБ с добавлением 10% и 40% желчи

Рисунок 7 – Поражение кожного покрова у поросенка

Рисунок 8 – Поражение тазовых и коленных суставов при стрептококкозе поросят

Рисунок 9 – Интенсивность роста стрептококков штамма СЛКТ в питательных средах (кратность по отношению к контролю)

Таблица 1 – Результаты бактериологических исследований

Таблица 2 – Ферментативная активность штаммов стрептококков

Таблица 3 – Изменение pH при культивировании стрептококков в средах Гисса

Таблица 4 – Видовая принадлежность изолятов стрептококков

Таблица 5 – Показатели оптической плотности культур штамма СЛП (n=5)

Таблица 6 – Инактивация культур *Str. suis* формалином

Таблица 7 – Основные характеристики лабораторных образцов ИБФГОА – вакцины

Таблица 8 – Определение иммунизирующей дозы ИБФГОА вакцины против стрептококкоза на белых мышах

Таблица 9 – Показатели безвредности и иммуногенности опытных серий вакцин

Таблица 10 – Иммуногенность и безвредность двухкратной вакцинации белых мышей против стрептококкоза

Таблица 11 – Схема лабораторного регламента изготовления вакцины

Таблица 12 – Показатели качества и безвредности образцов ИБФГОА вакцин

Таблица 13 –Результаты контроля иммуногенности ИБФГОА вакцины против стрептококкоза

Таблица 14 –Показатели активности вакцины

Таблица 15 – Схема иммунизации и антителогенез у свиноматок иммунизированных ИБФГОА вакцины

Таблица 16 – Гематологические показатели поросят (n=5)

Таблица 17 – Гематологические показатели свиноматок (n=3)

Таблица 18 – Лейкоцитарная формула крови поросят до и после вакцинации ИБФГОА (n=3)

Таблица 19 – Показатели естественной резистентности поросят до и после двукратной вакцинации ИБФГОА вакциной (n=5)

Таблица 20 – Титры специфических антител и масса поросят (n=10)

Таблица 21 – Морфо - функциональный состав крови поросят двухмесячного возраста (n=10)

Таблица 22 – Биохимические показатели крови поросят двухмесячного возраста (n=10)

8 Список использованной литературы

1. Аблов, А.М. Стрептококкозы млекопитающих и птиц и видовая характеристика возбудителей на территории Прибайкалья / А.М. Аблов, Е.В. Анганов, А.С. Батомункуев // Известия Иркутского государственного университета. Серия: биология, экология. – 2015. – Т. 11. – С. 105–110
2. Абрамов, С.В. Решение проблемы стрептококкоза – маймокси 10 микрогранулят / С.В. Абрамов // Свиноводство. – 2016. №7. – С. 26–30.
3. Акбашев, И.Р. Серологический и иммунологический мониторинг респираторных и желудочно-кишечных заболеваний крупного рогатого скота в хозяйства Приволжского федерального округа / И.Р. Акбашев. // Ученые записки Казанской ГАВМ. – 2016. – Т. 226. – №2. – С. 13–16.
4. Алексеев, И.А. Естественная резистентность телят при использовании пробиотического препарата споробактерина в условиях молочной фермы / И.А. Алексеев, А.М. Волков, И.Р. Кадиков // Ветеринарный врач. – 2015. №3. – С. 44–47.
5. Алехин, Ю.Н. Актуальные вопросы получения жизнеспособного приплода крупного рогатого скота и пути повышения его сохранности / Ю.Н. Алехин, А.И. Золотарев // Мат. Межд. Науч. – практ. Конф. «Современные проблемы ветеринарного акушерства и биотехнологии воспроизведения животных». – Воронеж. – 2012. – С. 48–56.
6. Алимов, А.М. Анемия поросят: профилактика и лечение / А.М. Алимов // Ветеринарный врач. – 2005. – №1. – С. 68–69.
7. Алимов, А.М. Нанобиология в ветеринарной медицине / А.М. Алимов // Ученые записки Казанской ГАВМ. – 2010. – Т. 201. – С. 151–155.
8. Алимов, А.М. Использование НСТ-теста для определения иммунологической перестройки организма при вакцинации и бруцеллезной инфекции / А.М. Алимов // Мат. Всероссийской научно-практической конф.,

посвященной 45-летию ФГНУ НИВИ «Проблемы микотоксикологического, радиационного и эпизоотического мониторинга». Казань. – 2005. – С. 233–236.

9. Алимов, А.М. Практикум по биохимии с основами физколлоидной химии / А.М. Алимов, Н.З. Хазипов, Т.Р. Якупов, Т.Г. Логинов. Под ред. А.М. Алимова. Казань – ООО «Печатный двор». – 2012. – 2036 с.

10. Алимов, А.М. Достижения биотехнологии в борьбе с инфекционными болезнями животных / А.М. Алимов // Ветеринарный врач. – 2005. – №1. – С. 71–75.

11. Алимов, А.М. Инфекционные болезни животных, наиболее часто встречающиеся в хозяйствах. В Кн.: Фермерские хозяйства и крестьянские подворья: Вопросы методологии и практического развития. – Казань. – 2005. – С. 350–352.

12. Анищенко, А.М. Актуальные проблемы и перспективы развития отрасли свиноводства / А.Н. Анищенко // Проблемы развития территории. – 2017. – №4 (30) – С. 146–160.

13. Антонов, Б.И. Лабораторные исследования в ветеринарии. Бактериальные инфекции. / Б.И. Антонов // – М.: Агропромиздат. 1986. – 352с.

14. Арзиев, К.А. Энтерококковая инфекция у телёнка / К.А. Арзиев, Л.Т.Майгулакова // Вестник Кыргызского национального аграрного университета имени К.И. Скрябина. – 2014. – №2 (31). – С. 204–207.

15. Ассоциативные желудочно-кишечные инфекции молодняка свиней / Т.С. Тамбиев, Л.А. Малышева, Е.В. Колотова и др. – пос. Персиановский: Издательство Донского ГАУ, 2015.– 180 с.

16. Ахматова, Н.К. Стафилококковая вакцина: влияние на киллерную активность лейкоцитов и неспецифическую резистентность / Н.К. Ахматова и др. // Иммунология. 2014. – №3. С. 143–146.

17. Ашурова, З.Ж. Разработка иммуноферментного метода диагностики стрептококковой инфекции: Автореф. дис. канд. вет. наук: 16.00.03 / З.Ж. Ашурова. – М., 2005. – 20 с.
18. Белошицкий, Г.В. Методы серологической идентификации пневмококков / Г.В. Белошицкий // Медицинский алфавит. – 2015. – Т. 2, №10. – С. 47–50.
19. Белошицкий, Г.В. История открытия пневмококков (1875–1883 гг.) / Г.В. Белошицкий // Медицинский алфавит. – 2011. – Т. 1, №5. – С. 12–16.
20. Беляков, И.М. Иммунная система слизистых / И.М. Беляков // Иммунология. – 1997. С. 7–13.
21. Богун, Л.В. Резистентность микроорганизмов, обусловленная бета – лактомазами и способы ее преодоления / Л.В. Богун // Новости медицины и фармации. – 2007. – №19. – С. 227.
22. Болезни молодняка свиней. Под общей ред. В.В. Никольского. – Киев. – 1978. – 176 с.
23. Болоцкий, И.А. Инфекционные болезни свиней / И.А. Болоцкий, А.К. Васильев и др. – Ростов на Дону. Феникс. – 2007. с. 245–250.
24. Болоцкий, И.А. Стрептококкоз свиней / И.А. Болоцкий, А.К. Васильев, В.И. Семенцов и др. // Ветеринария Кубани.– 2010. – №1.– С. 4–6.
25. Быкова, В.П. Лимфоэпителиальные органы в системах местного иммунитета слизистых оболочек / В.П. Быкова // Архив патологий . – 1995. – №1. – С. 11–15.
26. Вакцина ассоциированная поливалентная против сальмонеллеза, пастереллеза и стрептококкоза свиней / http://www.belvitunifarm.by/componouts-jshopping/files/demo_products/bacos.pdf/
27. Вакцина против энтерококковой инфекции у телят, ягнят и поросят <https://www.vetlex.ru/directions/?id=571>.

28. Ветеринарные препараты в России. Справочник в 2 томах. Т. 1 – И.Ф. Кленова, К.Л. Мальцев, Н.А. Яременко, И.А. Архипов. – М.: Сельхозиздат. – 2004. – 546 с.
29. Ветеринарные препараты в России. Справочник в 2 томах. Т. 2 – И.Ф. Кленова, К.Л. Мальцев, Н.А.Яременко, И.А. Архипов. – М.: Сельхозиздат. – 2004. – 464 с.
30. Воробьев, А.А. Адъюванты (неспецифические стимуляторы иммунитета) / А.А. Воробьев, Н.Н. Васильев. М.: «Медицины» – 1969. – 20 с.
31. Гавришева, Н.А. Инфекционный процесс. Клиническое и патофизиологические аспекты / Н.А. Гавришева, Т.В. Антонова – СкПб. – 1999. – 255 с.
32. Гаскелл, Р. Справочник по инфекционным болезням собак и кошек / Р. Гаскелл, М. Беннет. Пер. с англ. Махияновой Е.Б. – 2-е изд., испр. – М.: Аквариум Принт, 2009. – 200 с.
33. Гаффаров, Х.З. Моно- и смешанные инфекционные диареи новорожденных телят и поросят / Х.З. Гаффаров, А.В. Иванов, Е.А. Непоклонов и др. // – Казань: Издательство «Фэн». – 2002. – С. 592.
34. Глотов, А.Г. Этиологическая структура массовых респираторных болезней молодняка крупного рогатого скота в хозяйствах, занимающихся производством молока // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. – 2008. – №3. – С. 72–78.
35. Горбунов, А.П. Влияние некоторых факторов на заболеваемость новорождённых телят в Вологодской области / А.П. Горбунов, З.Н. Морогина, Н.В. Попова // Ветеринарная патология. – 2003. – №2. – С. 42–43. ISSN: 1682– 5616.
36. Горковенко, Н.Е. Острые кишечные расстройства новорожденных телят / Н.Е. Горковенко, Ю.А. Макаров, А.М. Кузьменко, В.А. Серебряков // Труды ВИЭВ. М. – 2011. – С. 179–181.

37. Гречухин, А.Н. Практическое руководство по ветеринарным обработкам в свиноводческих хозяйствах / А.Н. Гречухин // СкПб. – 2010. – 408 с.
38. Грузина, В.Д. Коммуникативные сигналы бактерий / В.Д. Грузина // Антибиотики и химиотерапия. – 2003. – Т. 48. – №10. – С. 32–39.
39. Гумеров, В.Г. Клинико-эпизоотологический мониторинг респираторно-кишечных инфекций молодняка крупно рогатого скота / В.Г. Гумеров, В.В. Евстифиев, Х.Н. Макаев, И.Г. Каримуллина, А.К. Галиуллин, И.Р. Акбашев // В сб.: Актуальные проблемы ветеринарной медицины. Мат. Международной научно-практической конференции, посвященной 90-летию со дня рождения профессора В.А. Киршина. – 2018. – С. 220–223.
40. Дарменова, А.Г. Значение микробного фактора в возникновении послеродовых эндометритов у коров / А.Г. Дарменова, С.Р. Юсупов // International scientific review. – 2016. – №17 (27). – С. 39–44.
41. Джикидзе, Э.К. Роль стрептококков в патологии животных / Э.К. Джикидзе и др. // Микробиолог. – 1996. №1. – С. 81–84.
42. Домарадский, И.В. Антигенное строение стрептококков / И.В. Домарадский // Микробиолог. – 1997. – №4. – С. 16–20.
43. Езепчук, Ю.В. Патогенность как функция биомолекул / Ю.В. Езепчук, М. Медицина. – 1985. – 240 с.
44. Елинов, Н.П. Антибиотики / Н.П. Елинов // В кн.: Химическая микробиология. М.: Высшая школа. – 1989. – С. 322–342.
45. Ермоленко, Е.И. Бактериоцины энтерококков: проблемы и перспективы использования (обзор литературы) / Е.И. Ермоленко // Вестник Санкт-Петербургского университета, серия 11, медицина. – 2009. – №3. – С. 78–93.
46. Есепенок, В.А. Этиология, патогенез, лечение и профилактика стрептококкозов (современный взгляд) / В.А. Есепенок, Х.С. Горбатова // Ветеринарный консультант. – 2006. – №10. – С. 3–8.

47. Зубарев, В.Н. Современный подход к лечению коров при эндометрите / В.Н. Зубарев, И.Ю. Панков, А.В. Егунова // Ветеринария. – 2013. – №7. – С. 36–38.
48. Иванов, А.В. Инфекционные болезни свиней (этиология, эпизоотология, диагностика, профилактика) / А.В. Иванов, Р.Х. Юсупов. – Казань ФГУ ФЦТРБ. – 2005. – 80 с.
49. Инфекционные болезни животных / Б.Ф. Бессарабов, А.А. Вашутин, Е.С. Воронин и др.; Под ред. А.А. Сидорчука. – М.: «КолосС», 2007. – 671 с.
50. Карева, Э.П. Этиологическая структура желудочно-кишечных болезней поросят / Э.П. Карева // Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях: Мат. межд. науч.-прак. конф. – Воронеж, 2002. – С. 296–298.
51. Кисера, Я.В. Разработка инактивированной аутовакцины против диплококковой инфекции / Я.В. Кисера, Ю.Г. Сторчак // Науковий вісник Львівського національного університету ветеринарної медицини та біотехнологій імені С.З. Гжицького. – 2014. – Т. 16. – №2 – 1. – С. 111–117.
52. Кисленко, В.Н. Ветеринарная микробиология и иммунология. Часть 2. Иммунология / В.Н. Кисленко, Н.М. Колычев. – М.: «КолосС», 2007. – 224 с.
53. Кисленко, В.Н. Ветеринарная микробиология и иммунология. Часть 1. Общая микробиология / В.Н. Кисленко, Н.М. Колычев. – М.: «КолосС». – 183 с.
54. Кисленко, В.Н. Ветеринарная микробиология и иммунология. Часть 3. Частная микробиология / В.Н. Кисленко, Н.М. Колычев, О.С. Суворина. – М.: «КолосС», 2007. – 215 с.
55. Кисленко, В.Н. Ветеринарная микробиология и иммунология: учебник / В.Н. Кисленко, Н.М. Колычев, Р.Г. Госманов. Под ред. Проф. В.Н. Кисленко. // 4-е изд. перераб. и дополненное. – М.: «ГЭОТАР-Медиа», 2012. – 752 с.

56. Козлов, Р.С. Пневмококки: прошлое, настоящее и будущее / Р.С. Козлов. – Смоленск: Смоленская государственная медицинская академия. – 2005. – 128 с.
57. Козловский, Е.В. Стрептококки, вызывающие диплококковую инфекцию (*St. pneumoniae*). В кн: Ветеринарная микробиология / Под.ред. Е.В. Козловского и П.А. Емельяненко.М. « Колос » – 1982. – С. 145–148.
58. Колычев, Н.М. Ветеринарная микробиология и вирусология // Н.М. Колычев, Р.Г. Госманов – СПб «Лань» – 2014. – 624 с.
59. Колычев, Н.М. Руководство по микробиологии и иммунологии / Н.М. Колычев, В.Н. Кисленко, Л.Г. Белов и др. // – Инфра – М. – 2018. – 230с.
60. Костинов, М.П. Вакцино профилактика пневмококковых инфекций и гриппа при аутоиммунных заболеваниях / М. П. Костинов, А. А. Тарасова. – М.: Издательско – полиграфическая группа «МДВ», – 2009. – 250с.
61. Костромитинов, Н.А. Терапевтическая эффективность Нео-окси WSP при инфекционной диарее поросят / Н.А. Костромитинов // Ветеринария. – 2012. – №8. – С. 18–20. ISSN: 0042–4846.
62. Красилов, А.П. Комплексная диагностика ассоциативных инфекционных болезней крупного рогатого скота / А.П. Красилов, И.Г. Трофимов, И.Г. Алексеева и др. // Ветеринарная патология. – 2014. – №1 (47). – С. 13–21.
63. Красилов, А.П. Комплексная диагностика инфекционных болезней крупного рогатого скота / А.П. Красилов, И.Г. Алексеева // Электронный научно-методический журнал Омского ГАУ. – 2015. – №1 (1). – С. 1–9.
64. Красилов, А.П. Роль микропаразитоценозов в эпизоотологии инфекционных болезней / А.П. Красилов, В.Э. Малошевич, Н.Н. Новикова и др. // Ветеринарная патология. – 2005. – №1. – С. 69–72.
65. Кудрявцев, А.А. Клиническая гематология животных / А.А. Кудрявцев, Л.А. Кудрявцева. – М.: «Колос». – 1974. – 399 с.

66. Кудряшов, А.А. Болезни новорождённых поросят: классификация, клинико-анатомическое проявление, диагностика, дифференциальная диагностика. Часть четвёртая / А.А. Кудряшов, А.Н. Гречухин // Ветеринарная практика. – 2007. – №2. – С. 65–70.
67. Кудряшов, А.А. Болезни новорождённых поросят: классификация, клинико-анатомическое проявление, диагностика, дифференциальная диагностика. Часть первая / А.А. Кудряшов, А.Н. Гречухин // Ветеринарная практика. – 2006. – №3. – С. 18–21.
68. Кудряшов, А.А. Болезни новорождённых поросят: классификация, клинико-анатомическое проявление, диагностика, дифференциальная диагностика. Часть третья / А.А. Кудряшов, А.Н. Гречухин // Ветеринарная практика. – 2007. – №1. – С. 46–51.
69. Куриленко, А.М. Бактериальные и вирусные инфекции молодняка сельскохозяйственных животных / А.М. Куриленко, В.Л. Крупальник, Н.В. Пименев / М.: «КолосС». – 2006. – 296 с.
70. Лабинская, А.С. Микробиология с техникой микробиологических исследований / А.С. Лабинская – М.: Медицина, – 1978. – 392 с.
71. Литусов, Н.В. Морфология и структура бактерий. Иллюстрированное учебное пособие. – Екатеринбург. Изд-во УГМА. – 2012. – 50 с.
72. Макаров, В.В. Основы учения об инфекции / В.В. Макаров, А.К. Петров, Д.А. Васильев (учебное пособие) Москва / Ульяновск. РУДН / УлГАУ – 2018. – С. 160.
73. Малаткин, И.И. Патоморфологическая диагностика стрептококкоза телят / И.И. Малаткин, Д.Г. Латыпов // Учёные записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2012. – Т. 212. – С. 81–83. ISSN: 0451–5838.

74. Малашко, В.В. Молозиво. Иммуноглобулины молозива. / В.В. Малашко, Н.А. Кузнецов // Учебник для ВУЗов. – Гродно. ГГАУ. – 2010. – 98с.
75. Малик, Е.В. Этиологическая структура стрептококкозов свиней // Ветеринария. – 2000. – №3. – С. 35–39.
76. Малошевич, В.Э. Комплексная система мер борьбы и профилактики с ассоциативными инфекционными болезнями телят: дис. канд. вет. наук / В.Э. Малошевич. – Омск: Омский государственный аграрный университет, – 2005.– 155 с.
77. Мангатханов, А.Д. Санитарно-бактериологическая оценка туш северных оленей при диплококковой инфекции / А.Д. Мангатханов, А.В. Аргунов, М.Х. Малтугуева // Международный вестник ветеринарии. – 2011. – №3. – С. 38–40.
78. Марковская, С.А. Профилактика болезней лёгких инфекционной этиологии / С.А. Марковская, О.Г. Петрова // Агропродовольственная политика России. – 2013. – №2. – С. 83–86.
79. Масьянов, Ю.Н. Иммунный статус крупного рогатого скота и свиней при наиболее распространенных болезнях и его коррекция. Автореферат д-ра вет. наук: 06.02.02 / Ю.Н. Масьянов. – Воронеж. – 2010. – 61 с.
80. Матвеев, А.В. Диагностика и специфическая профилактика стрептококкоза собак: дис. канд. вет. наук: 16.00.03 / А.В. Матвеев. – М., 2008. –117 с.
81. Маянский, Н.А. Серотиповое разнообразие и резистентность пневмококков / Н.А. Маянский, Н.М. Алябьева, А.В. Лазарева и др. // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2014. – №7 – 8. – С. 38–45.
82. Медведев, А.П. Дифференциация кокковых форм микроорганизмов / А.П. Медведев, С.В. Даровских, В.Н. Алешкевичидр. // Учёные записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почёта»

государственная академия ветеринарной медицины». – 2016. – Т. 52, №1. – С. 67–70.

83. Медведев, А.П. Патогенность стрептококков / А.П. Медведев, А.М. Мисник, И.В. Соболева // Учёные записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почёта» государственная академия ветеринарной медицины». – 2010. – Т. 46, №2. – С. 158–160. ISSN: 2078–0109

84. Медведева, Л.В. Моделирование эпизоотического процесса диплококкоза крупного рогатого скота в Алтайском крае на основе эпизоотологического мониторинга / Л.В. Медведева, К.А. Густокашин // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2013. – №9 (107). – С. 92–94.

85. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология. Учебник для студ. Мед вузов / под ред. А.А. Воробьева. – 2-е изд. М.: ООО «Медицинская информационное агенство». – 2006. – 704 с.

86. Медуницин, Н.В. Основы иммунопрофилактики и иммунотерапии инфекционных болезней / Н.В. Медуницин, В.И. Покровский. М.: ГЭОТАР–Медиа. – 2010. – 528 с.

87. Мейл, Д. Иммунология / Д. Мейл, Д. Бростафф, Д. Ройт. Пер. с англ. – М.: Логосфера. – 2007. – 568 с.

88. Методические рекомендации по диагностике, профилактике и лечению желудочно-кишечных болезней новорожденных телят / А.В. Иванов, К.Х. Папуниди, М. Я. Тремасов и др. // – Казань. ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». – 2011. – 39 с.

89. Молокова, А.В. Диагностика бактериальных инфекций желудочно-кишечного тракта животных (обзор литературы) / А.В. Молокова, Н.А. Кольберг, О.Г. Петрова // Агропродовольственная политика России. – 2012. – №9. – С. 69–79.

90. Нетрусов, А.И. Микробиология: учебник для студ. высш. учеб. заведений / А.И. Нетрусов, И.Б. Котова. – М.: Издательский центр «Академия». – 2006. – 352 с.

91. Никитин, И.Н. Организация ветеринарного дела / И.Н. Никитин. Учебное пособие. 3-е изд., перераб. и доп. – Спб. : Лань, 2012. – 288 с.
92. Новиков, Д.К., Клеточные методы иммунодиагностики / Д.К. Новиков, В.И. Новикова – Минск «Беларусь». – 1979. – 222 с.
93. Нургалиев, Ф.М. Роль микропаразитоценозов в эпизоотологии инфекционных болезней / Ф.М. Нургалиев, А.П. Красиков, В.Э. Малошевич // Ветеринарный консультант. – 2006. – №4. – С. 8–10.
94. Оздемиров, А.А. Оценка эффективности разработанного препарата для профилактики и лечения желудочно-кишечных болезней новорожденных телят, протекающих с признаками диарей, на биохимический статус новорожденных телят / А.А. Оздемиров, С.Ш. Кабардулов, Н.Р. Будулов // Ветеринарный врач. – 2014. №6. – С. 36–39.
95. Палий, А.П. Ветеринарно-санитарная защита животноводческих ферм и комплексов / А.П. Палий, А.П. Палий // Вестник Алтайского государственного аграрного университета. – 2013. – №4 (102). – С. 53–55.
96. Петрова, О.Г. Болезни лёгких – актуальная проблема ветеринарии / О.Г. Петрова, Н.А. Кольберг // Агропродовольственная политика России. – 2013. – №2. – С. 87–89.
97. Петров, Р.В. Иммуногены и вакцины нового поколения / Р.В. Петров, Р.М. Хаитов// М.: «ГЭОТАР – Медицина». – 2011. – 608 с. (Серия библиотека врача-специалиста).
98. Петров, Р.В. Иммунология / Р.В. Петров – М. Медицина. – 1987. – 416 с.
99. Петрянкин, Ф.П. Иммунобиология комплекса «мать-плод-новорожденный» у животных / Ф. П. Петрянкин. – Чебоксары. – 2008. – 71 с.
100. Петрянкин, Ф.П. Болезни молодняка животных / СкПб «Лань». – 2014. – 352 с.
101. Плященко, С.И. Естественная резистентность организма животных / С.И. Плященко, В.Т. Сидоров // Л.: «Колос». – 1979. – 184 с.

102. Поздеев, О.К. Молекулярно-генетические основы патогенности энтеробактерий / О.К. Поздеев // Практическая медицина. – 2010. – Т. 41. №2. – С. 84–88.
103. Покровский, В.И. Стрептококки и стрептококкозы / В.И. Покровский, Н.И. Брико, Л.А. Ряпис // – М.: ГЭОТАР-Медиа. – 2006. – 546 с.
104. Покудина, И.О. Резистентность микроорганизмов к антимикробным препаратам / И.О. Покудина, М.А. Шкурят, Д.В. Батталов // Живые и бионосные системы. Научное электронное периодическое издание – выпуск 10.
105. Пономарёва, И.С. Динамика эпизоотической напряжённости заразной патологии в хозяйствах Оренбургской области / И.С. Пономарёва, Е.В. Шамова // Современные проблемы и научное обеспечение развития животноводства (материалы международной научно-практической конференции. ФГБОУ ВПО «Омский государственный аграрный университет им. П.А. Столыпина»). – 2016. – С. 164–168.
106. Равилов, А.З. Микробиологические среды / А.З. Равилов, Р.Я. Гальмутдинов, М.Ш. Хусаинов // Казань. ФЭН. – 1999. – 398 с.
107. Руководство по медицинской микробиологии. Общая и санитарная микробиология. Книга 1 – Кол. Авторы // Под ред. А.С. Лабинской, Е.Г. Волиной. М.: Изд. БИНОМ. – 2008. – 1080 с.
108. Румянцев, С.Н. Микробы, эволюция, иммунитет / С.Н. Румянцев // – Л. – 1984. – 176 с.
109. Сазонов, А.А. Адекватная терапия респираторных болезней телят / А.А. Сазонов, С.В. Новикова // Эффективное животноводство. – 2016. – №3 (124). – С. 38–40.
110. Сатторов, Н.Р. Эффективность пробиотических препаратов при профилактике и лечении инфекционных пневмоэнтеритов телят / Н.Р. Сатторов, Ш.А. Турдиев, Ш.Х. Саидов // Доклады Таджикской академии сельскохозяйственных наук. – 2014. – №2 (40). – С. 39–43.

111. Семёнов, Б.С. Роль этиологических факторов в возникновении и развитии хирургических болезней в условиях современных животноводческих комплексов / Б.С. Семёнов, В.Н. Виденини, Т.Ш. Кузнецов // Актуальные вопросы ветеринарной хирургии. – 2016. – С. 161–167.
112. Сепиашвили. Р.И. Основы физиологии иммунной системы. Науч. редактор Т.А. Славянская. М. Медицина. – Здоровье. – 2003. – 221 с.
113. Сергеев, В.А. Иммунная система слизистых: концепция общности и механизм функционирования / В.А.Сергеев, Т.И. Алипер, Г.Г. Рухадзе и др. // Вопросы иммунологии. – 1988. – С. 392–402.
114. Серeda, А.Д. Иммуностимуляторы. Классификации, характеристика и область применения (Обзор) / А.Д. Середина, В.С. Кропов, М.М. Зубаиров // Сельскохозяйственная биология – 2001. – №4. – С. 81–86.
115. Сидоров, М.А. Определитель зоопатогенных микроорганизмов / М.А. Сидоров, Д.И. Скородумов, В.Б. Федотов // М. «Колос». – 1995. – 320 с.
116. Симонов, И.И. Анализ заболеваемости молодняка в хозяйствах Волгоградской области / В.В. Симонов // Ветеринарный врач. – 2015. М. – С. 19–20.
117. Собко, А.И. Справочник по болезням свиней – Киев. – 1988. – 360 с.
118. Соломкин, П.С. Диплококковая инфекция / П.С. Соломкин // В кн.: Болезни свиней. М. – 1961. – С. 111–114.
119. Спиридонов, М.А. Иммунный статус и синдром, смешанные болезни новорожденных телят и поросят / М.А. Спиридонов, Ю.Н. Федоров, О.М. Савич и др. // Ветеринария. – 2006. – №11. – С. 3–5.
120. Спиридонов, А.Г. Этиология желудочно-кишечных заболеваний телят и поросят в хозяйствах среднего Поволжья и Предуралья / А.Г. Спиридонов // Учёные записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2011. – Т. 206. – С. 200–204.

121. Субботин, В.В. Желудочно-кишечные болезни поросят с симптомокомплексом диареи: причины, профилактика и терапия / В.В. Субботин // Ветеринария и кормление. – 2005. – №3. – С. 12–13.

122. Тамбиев, Т.С. Ассоциативные желудочно-кишечные инфекции молодняка свиней / Т.С. Тамбиев, Л.А. Малышева, Е.В. Колотова и др.-пос. Персиановский: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Донской государственный аграрный университет». – 2015. – 180 с.

123. Татаринцев, Н.Т. Основные показатели качества оценки анотоксинов и инактивированный вакцин против бактериальных и вирусных болезней животных / Н.Т. Татаринцев, М.В. Нестиферова // СБ. Научн. трудов ВГНК. – 1996. – Т. 59. – С. 13–18.

124. Тахавиев, И.Г. Анализ заболеваемости сельскохозяйственных животных стрептококкозами в хозяйствах Среднего Поволжья / И.Г. Тахавиев, А.М. Алимов, А.Н. Чернов и др. // Учёные записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2016. – №3, Т. 227. – С. 53–55.

125. Тахавиев, И.Г. Культурально-морфологические и биохимические свойства стрептококков, выделенных из различных животных / И.Г. Тахавиев, А.М. Алимов // Учёные записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2016. – №4 (228). – С. 74–78.

126. Терехов, В.И. Стрептококкоз телят и поросят / В.И. Терехов, А.В. Скориков, О.Б. Терехов // Ветеринария Кубани. – 2006. – №6. – С. 12–14

127. Тимаков, В.В. Бактерия рода *Streptococcus*. В кн: Микробиология / В.Д. Тимаков, В.С. Левашов, Л.Б. Борисов. М.: Медицина. – 1983. С. 258–266.

128. Тихомиров, А.И. Маркетинговый анализ эффективности развития животноводства в современных условиях / А.И. Тихомиров // Вестник аграрной науки. – 2017. – №5 (68). – С. 113 – 115.

129. Толкач, Н.Г. Лечение телят, больных гастроэнтеритом, с использованием тилозиновых антибиотиков / Н.Г. Толкач // Учёные записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почёта» государственная академия ветеринарной медицины». – 2012. – Т. 48, №1. – С. 145–148.

130. Тукшаитов, Р.Х. Основы динамической метрологии и анализа результатов статистической обработки (биологические, медицинские, физические) – Казань. – 2001. – 284 с.

131. Урбан, Ю.Н. Молекулярно-генетическая, фенотипическая и филогенетическая характеристика штаммов *Streptococcus pneumoniae* в оценке их эпидемиологической роли / Ю.Н. Урбан, Е.А. Воропаева, С.С. Афанасьев и др. // Астраханский медицинский журнал. – 2014. – Т.9, №1. – С. 83–93.

132. ФАО – о перспективе мирового рынка мяса [электронный ресурс] – Режим доступа: <http://www.meat-info.lv/lv/articles/meat/item>

133. Холодный, В.В. Этиология и эффективность лечения собак при бактериальном отите / В.В. Холодный, В.А. Головеко, Р.В. Суверен // Учёные записки учреждения образования «Витебская ордена «Знак Почёта» государственная академия ветеринарной медицины». – 2016. – Т. 52, №1. – С. 102–105.

134. Цветков, Е.И. Энтерококковая (диплококковая) септицемия телят, ягнят, поросят и жеребят / Е.И. Цветков – М.: – 2005. – 250 с.

135. Цой, Л.М. Перспективы развития свиноводства в Российской Федерации / А.М. Цой // Механизация, автоматизация и машинные технологии в животноводстве. – 2019. – №1 (29). – С. 25–26.

136. Частная медицинская микробиология с техникой микробиологических исследований. Учебное пособие. / Под ред. А.С. Лабинской, Л.П. Блинковой. – М.: ООО «Издательство медицина». – 2005. – 600 с.

137. Чепуров, К.П. Стрептококки. В кн.: Ветеринарная микробиология. Под ред. Е.В. Козловского. М.: «Колос». – 1982. – С. 141–148.

138. Шахов, А.Г. Влияние комплексного применения пробиотиков глубокостельным коровам и новорожденным на процессе формирования микробиоценоза биотиков телят и их клинический статус / А.Г. Шахов, Л.Ю. Сашнина, Т. А. Ерина // Ветеринарный врач. – 2015. – №3 – С. 6–19.

139. Шахов, А.Г. Этиология и профилактика желудочно-кишечных и респираторных болезней телят и поросят / А.Г. Шахов // Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях. Материал международной практической конференции. – Воронеж. – 2002. – С. 3–8.

140. Шляхов, Э.Н. Иммунология, иммунодиагностика, иммунопрофилактика инфекционных болезней / Э.Н. Шляхов // Изд. «Карта Молдовеняскэ» – Кишинев. – 1997. – 424 с.

141. Щербакова, А.В. Этиологическая структура инфекционных болезней свиней в животноводческих хозяйствах России / А.В. Щербакова // Актуальные проблемы инфекционной патологии животных: Мат. межд. науч.-прак. конф. – Владимир. – 2003. – С. 146–150.

142. Юсупов, М.А. Этиологические факторы возникновения инфекционных кератоконъюнктивитов крупного рогатого скота / М.А. Юсупов // Известия ВУЗов Кыргызстана. – 2011. – №6. – С. 141–143.

143. Юров, К.П. Этиология, диагностика и профилактика массовых респираторных болезней телят / К.П. Юров и др. // Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных. Материал научно-практической конференции – Москва, 16–17 мая 2006. – С. 126–132.

144. Asadi Karam, M.R. Urinary tract infalium pathogeneticity, antibiotic resistance and development of effective vaccines ageints urophthogenic Escherichia coli / M.R. Asadi Karam, M. Habibi, S. Bauzari // Mol. Immunol. – 2019/-v. 108. – P. 56–57.

145. Balachandran, P. The autolytic enzyme Lyt A of Streptococcus pneumoniaeis not responsible for realizing pneumolysin / P. Balachandran, S. K. Hollingshaed, J.C.Paton, D.E.Briles // J.Bacteriol. – 2001. – Vol. 183, №10. – P. 3108–3116.

146. Beachy, E.H. Primary structure of protective antigens of type 24 streptococcal M. Protein. / E.H. Beachy, J.M. Seger, A.H. Kang // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* – 1978. – v. 75. P. 363 – 3167.
147. Berne, C. Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by gram-negative bacteria [text] / C. Berne, A. Ducet, G.G. Harby, V.V. Brun // *Microbiol. Spectr.* – 2015. – v. 3. – №4. DOI: 10.1128 / microbiolspa. MB – 0018 – 2015.
148. Berne, C. Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by gram-negative bacteria/ C. Berne, A. Ducet, G.G. Harby, J.V. Brun // *Microbiol. Streptococcus* – 2015. – v. 3. №4., DOI: 10.1128 / microbiolspec. MB – 0018 – 2015.
149. Bisno, A.L. Alternative complement pathway activation by group – A Streptococci: role of M-protein. / A.L. Bisno // *Infect. Immun.* – 1979. V. 26. P. 1172–1176.
150. Bruno, G. The perfect mix: recent progress in adjuvant research / G. Bruno // *Nature Rev. Microbiol.* – 2007. – Vol. 5 – P. 505–517.
151. Chow, J. Effect of ionophores and pH on growth *Streptococcus bovis* in batch and continuous culture/ J. Chow, J. Rossel // *Appl. Environ. Microbiol.* – 1990. – v. 56/– №6. P. 1588–1592.
152. Dijk, H.V. Quantification of in vitro antibody secretion by immune spleen cells. / H.V. Dijk, N. Bloksma. – *J. Immunol. Meth.* – 1977. v. 14. №3–4.
153. Evstifiev, V.V. Improvement of an oil adjuvant vaccine against chlamydia for cattle in Kazan city Russia / V.V. Evstifiev, A.I. Nikitin, A.N. Chernov, H.N. Makaev et.al. // *Indian Veterinary Journal* – 2018. – T. 95. – №7 – P. 26–28.
154. Geiger, Ch. Migration inhibitor factor-like activity in inflammatory synovial fluids might be due to proteases // Ch. Geiger, T.h. Vischer // *Clin. Exp. Immunol.* – 1976. V. 26. – №1. P. 176–180.

155. Holan, V. Antigen-mediated macrophage adherence inhibition / V. Holan, M. Hasek, J. Bubenik, J. Chutna – Cell. Immunol. – 1974. – v. 13. – №1. P. 107–116.
156. Javadi, M. Horizontal gene transfer and the diversity of *Escherichia coli*, in *Escherichia coli*. / M. Javadi // *Escherichia coli – recent advances on physiology, pathogenesis and biotechnological applications* / M. Javadi, S. Bouzari, M. Oloomi / – London: intech open. – 2017. – P. 317–331.
157. Joo, H.S. Molecular basis in vitro biofilm formation by bacterial pathogens [text] / H.S. Joo, M. Otto // *Chem. Biol.* – 2012. – v.19. – №12 – p
158. Kalita, A. Recent advances in adherence and invasion of pathogenic *Escherichia coli* [text] / A. Kalita, A.C. Torres // *Curr. Opin. Infect. Dis.* – 2014. V. 27. – №5. – p. 459–464.
159. Kessler, R. Precursor or product relationship of intracellular and extracellular lipoteichoic acids of *Streptococcus faecium* / R. Kessler, G.D. Shockman // *J. Biotechnology*. – 1979. V. 137. P. 869–877.
160. Kohler, E.M. *E. coli* vaccines / E.M. Kohler // *Animal science series unif. agr. Res. And development center* – 1982. – v. 82. – №1. – P. 63–65.
161. Lebeaux, D. From in vitro models of bacterial biofilm – related infections / D. Lebeaux, A. Chauhan, O. Rendueles., C. Beloin // 1) *Pathogens*. – 2013. – v. 2. №2. – p. 288–356.
162. Lincoff, W.D. The bovine complement system. In.: *The ruminant immune system* / W.D. Lincoff, R.P. Triglis.-Ed. By Buller I.E. – 1981. №4. – P. 433.
163. Luthie, P. Virulence factors of enteropathogenic *E. coli* and their interaction with the host / P. Luthie, A. Brauner // *Adv. Microbiol. Physiol.* – 2014. – v. 65. – P. 337–372.
164. Meena, M. Virulence Factors and Their Associated Genes in microbes / M. Meena // *New and future developments in microbiology biotechnology and bioengineering* / M. Meena, P. Swapnil, A. Zehra, M. Amir, M.K. Dubey, S.P. Patel, R.S. Upadhyay. – Elsevier. 2019. – P.

165. Mufwiri, G. Innate immunity and new adjuvants / G. Mufwiri, V. Gerats, M. Koper [et al.] // Rev. Scient. Techn. (Int. Office Epizoot.) – 2007. – v. 26. – №1. P. 147–156.
166. Neonatal E.coli Rairrea in Pigs the sings, diagnosis, treatment and prevention // Swine Health Intercom. – 1998. – v. 1– №2. – P. 1–4.
167. Orden, B. Edalnation of selective streptococcal agar(ssa) for culture detection of group A. Streptococcus / B. Orden, A. Gonzaler, E. Juarez et al. // 5th Congr. Cein. Microbiol and Infect. Diseases. Oslo, Abstr. – 1991, p. 111.
168. Pigs and science make a gzeat couple [Electronic resurse] – Available at: [http // www. pasi – tiveaction. info /pdfls /stars / A D Neo- JRT.1–8 – 2015. pdf](http://www.pasitiveaction.info/pdfls/stars/A%20Neo-JRT.1-8-2015.pdf)
169. Ristow, L.C. Hemolysin of uropathogenic of Eschrichia coli:f cloak or a dagger / L.C. Ristow, R.A. Welck // Biochim. Biophys. Acta. – 2016. – v. 1858. – №3. – P. 538–545.
170. Roder, H.L. Studying bacterial multispecies biofilms: where to start? / H.L. Roder, S-Y. Sorensen, M. Burmille // Trends Microbiol. – 2016. – v. 24, №6. – P. 503–513.
171. Saif, L.I. Virol Diarrhea of man and animals / L.I. Saif // CRC . Pr.Press. Inc.-/ L.I.Saif, G.V.Sanchez, In vitro antibiotal resistance of urinary Escherichia coli isolafes among U.S.outpatiens fvom 2000 Antimicrob Agents Chemother. – PMID 22252813 – 2010. 56 (4). P. 2181–2183.
172. Sanchez, G.V. In vitro antibiotal resistance of urinary Eschrichia coli isolates among U.S.out patients from 2000. Antimicrobial agents end Chemorher. – PMID 22252813 – 2010. V. 56 (4). P. 2181–2183.
173. Show, D.J. Shedoling pattens of verocito toxin-producing Escherichia coli Streins in a cohort of calves and their dems of a Scottish beef farm / D.J. Show, C.Yenkiks et al. // Applied and Environ mental Microbiology.– 2004. – V. 70. – №22. P. 7456–7465.

174. Stokes, C.R. immunology on the porcine gastrointestinal tract / C.R.Stokes, M.Bailey // Vet.Immunol Immunopathology. – 1994. – №43. P. 143–150.

175. Tuomanen, E.I. The Pneumococcus / E.I. Tuomanen, T.J. Mitchell, D.A. Morrison, B.G. Spratt. – Washington: D.C.ASM PRESS, 2004.– 427 p.

176. Ulmer, I.B., Vaccine manufacturings: challenges and Saluteonis / I.B. Ulmer, U. Valley. R. Rappuoli // Nat. Biotechnol. – 2006. – v. 24 – P 1377–1383.

177. WHO MANUAL, 2ND EDITION. Laboratory Methods for the Diagnosis of Mening it is caused by Neisseria mening it idis Streptococcus pneumoniae and Haemophilus influenza // WHO / IVB.11.09. – 2011.

178. Wilken, A.Y. Structure and cell membrane binding properties of bacterial lipoteichon acid and their possible role in adhesion streptococci to eukaryotic cells. / A.Y. Wilken // In: Receptors and recognitions: ser. B. – London. New York. – 1980. V. 6. – P. 139–158.

179. Wiles, T.J. The RTX pore-forming toxin a-hemolysin of uropathogenic Eschrichia coli: progress and perspectives / T.J. Wiles, M.A. Mulvey // Future Microbiol. – 2013. – v. 8. – №1. – P. 73–84.

180. Yardi, S. Bacterial aggregation and biofilm formation in a vertical flow / S. Yardi, A.M. Ardekani // Biomicrofluidics. – 2012. – v. 6. – №4: 441414 doi 10.1063/1.

181. Zygmunt, Pejsan. Protecting the health of pigs. – Poznan. – 2007. – 648 c.

Инф. Ресурсы (Web-ресурсы):

182-<http://www.microbiology.ru>

183-<http://www.wikipedia.org>

184-<http://immunology.ru>

185-<http://rusmedsenv.com>.

9 ПРИЛОЖЕНИЯ

1. Паспорт штамма *Streptococcus suis* СЛК

2. Паспорт штамма *Streptococcus suis* СЛКТ

3. Лабораторный регламент изготовления и контроля инактивированной бивалентной формол – гидроокись алюминиевой вакцины против стрептококкоза свиней, утверждены Ректором Казанской ГАВМ 11.03.2021 г.

4. Временные ветеринарные правила по применению инактивированной бивалентной формол – гидроокисьалюминиевой вакцины против стрептококкоза свиней (в порядке апробации), утверждены Начальником Главного Управления ветеринарии Кабинета Министров Республики Татарстан А. Г. Хисамутдиновым 12.03.2021 г.

5. Акт о производственных испытаниях инактивированной бивалентной формол гидроокись алюминиевой вакцины против стрептококкоза свиней из местных штаммов.

ПАСПОРТ

штамма *Streptococcus suis* СЛК

Показатели	Результат
1. Наименование штамма 2. Объект выделения Окраска по Граму 3. Наличие капсулы 4. Рост в жидкой питательной среде 5. Среда для хранения 6. Лизис в 10% желчи 7. Ферментация 8. Каталазная активность 9. Образование сероводорода 10. Образование индола 11. Чувствительность к антибиотикам: - Пенициллин -Ампициллин - Эритромицин -Тетрациклин - Канамицин	Streptococcus suis СЛК, серотип D Поросянок Грамположительные Образует капсулу Равномерные помутнения с образованием осадка Китта- Таротци, при температуре 2-4 °С Лизируется Разлагает : глюкозу, мальтозу, сахарозу, ксилозу, маннит, лактозу, раффинозу, инулин. Не расщепляет : сорбит, дульцит, арабинозу Положительная Отсутствует Отсутствует Устойчивый Устойчивый Чувствительный Чувствительный Чувствительный

ПАСПОРТ

штамма *Streptococcus suis* СЛКТ

Показатели	Результат
1. Наименование	<i>Streptococcus suis</i> СЛКТ
2. Объект выделения	Свиноматка , серотип С
Окраска по Граму	Грамположительные
3. Наличие капсулы	Образует капсулу
4. Рост в жидкой питательной среде	Равномерные помутнения с образованием осадка
5. Среда для хранения	Китта- Таротци, при температуре 2-4 °С
6. Лизис в 10% желчи	Лизируются
7. Ферментация	Разлагает : глюкозу, мальтозу, сахарозу, ксилозу, маннит, лактозу, раффинозу, инулин. Не расщепляет : сорбит, дульцит, арабиноза
8. Кatalазная активность	Положительная
9. Образование сероводорода	Отсутствует
10. Образование индола	Отсутствует
11. Чувствительность к антибиотикам:	
- Пенициллин	Устойчивый
-Ампициллин	Устойчивый
- Эритромицин	Чувствительный
-Тетрациклин	Чувствительный
- Канамицин	Чувствительный

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Казанская государственная академия
ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана»

УТВЕРЖДАЮ:
Ректор ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ
проф.  Р.Х. Равилов
« 11 » 03 2021 г.



ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ

изготовления и контроля инактивированной
бивалентной формол-гидроокись алюминиевой
вакцины против стрептококкоза свиней

Казань – 2021

ЛАБОРАТОРНЫЙ РЕГЛАМЕНТ

Изготовления и контроля инактивированной бивалентной формол-гидроокись алюминиевой вакцины против стрептококкоза свиней

Одобрено и рекомендовано к утверждению научно-техническим советом ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ, протокол № 1 от 11.03.2021 г.

Разработчики: Алимов А.М. – д.в.н., профессор

Тахавиев И.Г., аспирант

УТВЕРЖДАЮ:

Начальник Главного Управления
ветеринарии Кабинета Министров
Республики Татарстан



А.Г. Хисамутдинов

« » 2021 год

ВРЕМЕННЫЕ ВЕТЕРИНАРНЫЕ ПРАВИЛА

по применению инаktivированной бивалентной
формол-гидроокисью алюминия вакцины
против стрептококкоза свиней
(в порядке апробации)

1. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1 Инаktivированная бивалентная формол-гидроокисью алюминия вакцина предназначена для специфической профилактики стрептококкоза свиней.

1.2 Вакцина содержит *Streptococcus suis* сероваров С и Д с капсульной субстанцией инаktivированные формалином в концентрации 0.4% и депонированную гидратом окиси алюминия.

1.3 По внешнему виду вакцина представляет собой желтоватую жидкость с белым осадком, который легко разбивается при встряхивании с образованием беловатой однородной суспензии.

1.4 Вакцину выпускают в специальных флаконах по 100 см³, укупоренных резиновыми пробками и обкатанных алюминиевыми колпачками.

1.5 Срок годности вакцины 12 месяцев с даты изготовления. Вакцину хранят при температуре от плюс 2 до плюс 8°С в сухом, защищенном от света месте.

1.6 Флаконы с вакциной без этикеток, с нарушенной укупоркой, имеющие трещины, а также не использованные в течение 12 ч после их

Акт

о производственных испытаниях инактивированной бивалентной формол-гидроокись алюминиевой вакцины против стрептококкоза свиней из местных штаммов

15.01.2018г.

ООО «Агрокам»

Мы, нижеподписавшиеся, Тахавиев И.Г. аспирант Казанской ГАВМ, ветеринарный врач ООО «Агрокам» Мифтахова З.Г., оператор-животновод ООО «Агрокам» Фарзиев И.Н., провели вакцинацию поросят 14-18 дневного возраста в количестве 70 голов и 20 супоросных свиноматок за 1,5 месяца до срока опороса с вакциной «Инактивированная бивалентная формол-гидроокись алюминиевая вакцина против стрептококкоза свиней из местных штаммов», изготовленной в Казанской ГАВМ (серия №2, контроль №2 дата изготовления 18.12.2018 г.)

Поросят иммунизировали двукратно в дозе 2мл и 3мл, свиноматок в дозе 4мл и 5 мл. Вакцину вводили внутримышечно в области средней трети шеи. Вторую аналогичную группу поросят иммунизировали биофабричной вакциной «Ассоциированная поливалентная против сальмонеллеза, пастереллеза и стрептококкоза свиней», двукратно в дозах по 5 мл (серия №15 дата изготовления 1.11.2018 г.) Вакцину вводили внутримышечно в области средней трети шеи.

Поствакцинальных осложнений в обеих группах не наблюдалось.

Подписи:

Тахавиев И.Г.

Мифтахова З.Г.

Фарзиев И.Н.

Аспирант Казанской ГАВМ

Ветеринарный врач ООО «Агрокам»

Оператор-животновод

