

На правах рукописи

Тахавиев Ильдус Гумарович

**БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА СТРЕПТОКОККОВ
И ИЗЫСКАНИЕ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ
СТРЕПТОКОККОЗАСВИНЕЙ ИЗ МЕСТНЫХ ШТАММОВ**

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук

Казань - 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана».

Научный руководитель: **Алимов Азат Миргасимович** – доктор ветеринарных наук, профессор

Официальные оппоненты: **Крысенко Юрий Гаврилович** - доктор ветеринарных наук, профессор кафедры эпизоотологии и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО «Ижевская государственная сельскохозяйственная академия»

Агольцов Валерий Александрович - доктор ветеринарных наук, профессор кафедры болезней животных и ветеринарно-санитарной экспертизы ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова»

Ведущая организация: ФГБНУ «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко РАН»

Защита состоится «4» июля 2022 года в 1000 часов на заседании диссертационного совета Д 220.034.01 при ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» по адресу: 420029, г. Казань, Сибирский тракт, 35.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» и на сайте <https://kazanveterinary.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2022 года и размещен на сайтах: <https://kazanveterinary.ru> и <http://www.vak.ed.gov.ru>

Ученый секретарь диссертационного совета доктор биологических наук, профессор

Асия Мазетдиновна Ежкова

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. 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 (Анищенко А.М., 2017, Болоцкий И.А., 2010, Иванов А.В., Юсупов Р.Х., 2005). К данной группе микроорганизмов относятся и стрептококки (Болоцкий И.А., 2010, Сидорчук А.А., 2007) 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 (Кисленко В.Н., Колычев Н.М., 2007, Петрянкин Ф.П., 2014). 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 защиты животных от инфекционных болезней эффективной является специфическая профилактика. Вакцинация способствует созданию напряженного иммунитета в короткие сроки и снижению потерь (Куриленко А.М., и др., 2006). В практике свиноводства применяют живые и инактивированные вакцины (Кисленко В.Н., и др., 2012, Колычев Н.М., и др., 2018, Масьянов Ю.Н., 2010) 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 (Кленова И.Ф., и др., 2004, Гафаров Х.З., и др., 2002). В связи с этим, изучение стрептококкоза и разработка эффективных средств защиты животных, совершенствование мероприятий борьбы с этой инфекцией имеет важное значение.

Цель и задачи исследований. Целью исследований явилось выделение и изучение биологических свойств отдельных изолятов стрептококков, а также 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 вакцин 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 известных штаммов;

– 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 выведением 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.

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 ГАВМ и в хозяйствах Республики Татарстан.

Исследования с заражением лабораторных животных проводились в условиях вивария ФГНУ «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 Республики Татарстан.

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

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.

Питательные среды готовили сами согласно соответствующих руководств (А.З. Равилов, Р.Я. Гильмутдинов, 1999, А.С. Лабинская, 2008). 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% дефибрированную кровь барана, полусинтетическая среда на основе гидролизата лактоальбумина.

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 так же бактериологические исследования, которые проводились согласно «Методических указаний по эпизоотологическому исследованию».

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.

Выделение стрептококков, изучение их культуральных, морфологических, ферментативных, вирулентных 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.

Безвредность и активность инактивированных вакцин определяли на белых беспородных мышях массой 18 – 20 г. Серологические исследования проводили согласно общепринятых методов (Лабинская А.С., 2008).

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

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.

Статистическую обработку цифровых материалов проводили на персональном компьютере Dell. В качестве рабочих программ использовались приложения пакета «Microsoft», «Microsoft Word» и «Microsoft Excel». При этом руководствовались методикой Р.Х. Тукшаитова (1984).

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



Рисунок 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

Всего за период с 2014 по 2019 годы было исследовано 1045 проб из 102 хозяйств, отобранных нами и доставленных из отдельных хозяйств (табл.1).

В процессе бактериологических исследований патологического и биоматериала выделили и идентифицировали 407 бактериальных изолятов, из которых стрептококки составили 23,3% (99 изолятов). На первом в этапе при бактериологических исследованиях готовили мазки-отпечатки на предметные стёкла. При микроскопии культур стрептококков выявлялись скопления чаще парных и расположенных небольшими цепочками мелкие кокки фиолетового цвета, что характерно для рода бактерий *Streptococcus* (Рис.2).

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



Рисунок 2 – Мазок, окрашенный по Граму, х700

В процессе исследований было отмечено, что в обогащенном МПБ наблюдался рост культуры, характеризующийся диффузным помутнением питательной среды (Рис. 3).



Рисунок 3 – Рост стрептококков в жидкой и плотной питательных средах

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

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 и чувствительность к желчи. Стрептококки проявили каталазную активность и лизировались желчью.

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 Андрее (темно-малиновый), без газообразования.

Стрептококки, расщепляли углеводы и спирты, что соответствует роду *Streptococcus*. Наиболее интенсивное изменение рН 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.

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+
Манит	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.

Полученные данные свидетельствуют о том, что стрептококки, расщепляя углеводы и спирты рН среды сдвигают в кислую сторону, что

соответствует роду *Streptococcus*. Наиболее интенсивное изменение рН 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.

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%). Среди выделенных изолятов наибольшее количество приходилось на вид *Str. Suis*, *Str. pneumoniae*, *Str. Ocidomininus*, *Str. Bovis*. Это объясняется и тем, что больше паталогического и биоматериала исследований от свиноферм.

Вирулентность изолятов подтверждали биологической пробой на молодых беспородных белых мышах. 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.

По результатам идентификации выявлялись стрептококки, относящиеся к видам *Streptococcus* : *acidomininus*, *bovis*, *pneumoniae*, *suis*, *vestibularis*, *oralis*, *zoepidemicus*, *salivarius*, *mutans*.

Полученные данные свидетельствуют о значительной распространенности стрептококкозов среди инфекционных патологий свиней и циркуляции разных видов стрептококков.

2.2.2 Клиника и патологоанатомические изменения при стрептококкозе свиней

При проведении клинико-эпизоотологического обследования свиноферм установили, что респираторные, желудочно-кишечные заболевания регистрируются у свиней во все сезоны года, но проявляются чаще всего в зимне-весенний период со значительным отходом молодняка. Наблюдались 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. 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.

В ходе исследовательской работы нами проведено вскрытие 25 поросят разных возрастов, которым прижизненно был поставлен диагноз стрептококкоз на основании лабораторных исследований. 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 пневмонии гастроэнтериты, увеличение лимфатических узлов, артриты. В брюшной и грудных полостях геморрагический экссудат.

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

На основании изучения биологических свойств 99 изолированных культур было установлено, что наибольшее распространение имеют сероварианты у свиней, относящиеся к роду *Streptococcus suis*.

Учитывая распространенность стрептококков серогрупп D и C мы решили создать бивалентную вакцину из штаммов СЛП (серотип D) и СЛКТ (серотип C). Для определения эффективной питательной среды для культивирования стрептококков проводили сравнительные изучения их роста на разных питательных средах. Показатели оптической плотности и роста культур представлены в таблице 3.

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 питательных средах спустя 24 часа после посева. Через 48 часов наблюдалось небольшое снижение оптической плотности культур микроорганизмов. Сходные показатели были получены и при культивировании штамма СЛКТ.

Таблица 3 – 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±0,02	10,0	*1,9±0,11	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±0,15	6,3	*2,1±0,12	5,3
кита-Тароци	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±0,12	6,6

* - Достоверная разница между МПБ ((p< 0,001).

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 показатели оптической плотности снизились на 5,1% от уровня, достигшего к 24 часам ($p < 0,02$).

Интенсивный рост стрептококков происходил в бульоне Хоттингера: оптическая плотность к 24 часам увеличилась 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% ($p < 0,05$).

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. Среду Китта-Тароцци целесообразно применять для хранения культур и штаммов стрептококков.

После проведенных исследований в качестве питательной среды для наработки биомассы стрептококков нами был выбран обогащенный 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 (*Str.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. Выделенные от белых мышей культуры стрептококков вакцинных штаммов пересевали в среды Китта-Тароцци и хранили в холодильнике при $+ 2...4^{\circ} \text{C}$. Эти культуры использовали в качестве исходных штаммов для наработки биомассы стрептококков.

Из исходной культуры штаммов стрептококков делали посеы в бульон Хоттингера с 0,4% глюкозой и твин-40 – 0,1% (БХГТВ-40) в пробирках и инкубировали при 37°C в течение 18 – 24 часов. Затем из культур первой расплодки делали посеы в ту же питательную среду во флаконах емкостью 200 см^3 , заполненных питательной средой до 150 см^3 , рН питательных составила 7,2 – 7,4. В каждый флакон с питательной средой вносили по

5-10 см³ суточной культуры стрептококков первой расплодки. На каждом этапе посева делали мазки и контрольные посева для оценки чистоты культуры исходного штамма.

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.

2.2.3.2 Инактивация биомассы вакцинных штаммов стрептококков

При создании инактивированной вакцины полученную культуру возбудителя стрептококкоза необходимо обезвредить (инактивировать). При этом выбранный способ инактивации должен быть на 100% эффективным и не нарушать антигенность и иммуногенность получаемого препарата (Татаринцев Н.Т., Нестиферова М.В., 1996).

Одним из методов обезвреживания вакцинных штаммов является химическая инактивация. Для изготовления инактивированных вакцин часто используют формалин. Опытным путем была установлена высокая чувствительность стрептококков к формалину. Эффективной оказалась его концентрация 0,4%. Поэтому инактивацию биомассы стрептококков проводили формалином с концентрацией 0,4%. Для получения вакцины из двух штаммов стрептококков инактивированную 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 инактивированной 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.

2.2.4 Изучение иммуногенных свойств инактивированной БФГОА вакцины против стрептококкоза в экспериментальных и производственных условиях

2.2.4.1 Изучение иммуногенных свойств инактивированных 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.

Для определения иммуногенной активности и дозы ИБФГОА проводили опыты на лабораторных белых мышях. 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 (Первая группа - в дозе 1 мл, вторая - 0,5 мл, третья - 0,25 мл, четвертая - 0,125 мл). 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.

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 невакцинированные 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%.

Далее проводили исследования иммуногенности и эффективности трех разных образцов вакцин: 1) ИБФГОА вакцина, 2) фармол вакцина на основе масляного адьюванта без ГОА, 3) фармол вакцина без адьюванта и ГОА. Данные испытания также проводили на белых мышях. В каждой опытной группе было по 10 лабораторных животных, которых 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 таблице 4.

ИБФГОА вакцина (1 группа) и фармолвакцина без адьюванта (3 группа) не вызывали видимые изменения в состоянии животных. Фармолвакцина 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%. Фармолвакцина с масляным адьювантом и фармолвакцина без адьюванта предотвращали гибель 60 и 50% соответственно иммунизированных животных.

Таблица 4 – 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

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 *Str.suis* «СЛП». Полученные в эксперименте данные обобщены в таблице 5.

Таблица 5 – 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 (не вакцинированные)	–	–	10	10	100	0	0

Исходя из полученных данных, представленных в таблице 5, 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.

2.2.4.2 Разработка параметров контроля вакцины против стрептококкоза

По разработанной технологии изготовили несколько серий ИБФГОА вакцины. Для оценки качества ИБФГОА вакцины применяли следующие параметры контроля: внешний вид препарата, определение стерильности и полноты инактивации, безвредности и иммуногенности.

Изготовленные серии вакцин были стерильными – при посеве на питательных средах роста стрептококков и микрофлоры не выявлялось. Контроль безвредности проводили на белых мышах. 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.

Для оценки иммуногенности 3 серий ИБФГОА вакцины использовали лабораторных мышей. Животным опытных групп в количестве 10-ти особей, для каждой серии инъецировали вакцинные препараты внутримышечно двукратно (Таблица 6). 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 иммунизированных и интактных белых мышей заражали культурой штамма *Str. suis* путём внутрибрюшинного введения в дозе 2 Dlm (200 млн.м.к.).

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.

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

Таблица 6 – Результаты контроля иммуногенности ИБФГОА вакцины против стрептококкоза

Номера образцов вакцин	Вакцина	Доза вакцины, см ³	Безвредность	Результаты заражения через 14 суток штамм S. Suis				
				Количество животных	Пало		Выжило	
					Количество животных	%	Количество животных	%
1.	Против стрептококкоза	Первая доза 0,25, вторая через 10 сут. 0,5	Безвредна	10	1	10	9	90,0
2.			Безвредна	10	0	0	10	100,0
3.			Безвредна	10	0	0	10	100,0
4.	Контроль (не вакцинированные)	–	–	10	10	100	0	0

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

В первом опыте иммунизировали ИБФГОА вакциной 3-х поросят в возрасте 14 дней. Вакцину вводили внутримышечно в области внутренней поверхности бедра в дозах 2 см³ и 3 см³ 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. внутрибрюшинно. 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°С. Все вакцинированные поросята после заражения оставались без видимых клинических признаков болезни в течение всего срока наблюдения (1,5 месяца), тогда как оба не вакцинированные 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 см³, свиноматок в дозах 4 и 5 см³. 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 см³ (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 таблице 7.

Таблица 7 – 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, 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 ± 0,31 lg, 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 токсикогенного 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 в первые же дни заболели 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, режим иммунизации и результаты обобщены в таблице 8).

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 $2,1 \pm 0,21$ Ig, а через 2 месяца на уровне $1,4 \pm 0,31$ Ig. Таким образом, вакцинация создавала напряженный иммунитет 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 агалактия не наблюдались. 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 получено 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 8 – 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 $0,7 \pm 0,21$ Ig , что свидетельствует о передаче им специфических антител молозивом.

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

Результаты определения основных гематологических показателей иммунизированных ИБФГОА вакциной поросят и свиноматок приведены в таблицах 9 и 10.

Таблица 9 – Гематологические показатели поросят (n=5)

Показатели	До вакцинации	Через 14 дней после двукратной 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 (Таблица 10). После вакцинации основные параметры клеток крови существенных изменений не претерпевали.

Таблица 10 – 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 (Таблица 11). В частности, после вакцинации в 1,4 раз 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 (Таблица 12). 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 11 – Лейкоцитарная формула крови поросят до и после вакцинации ИБФГОА вакциной (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 12 – 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 Ферраминовита на иммуногенез при вакцинации поросят ИБФГОА вакциной

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 – Ферраминовит, разработанный сотрудниками кафедры биологической и неорганической химии ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ. В опытах использовали 204 поросят, полученных от вакцинированных ИБФГОА вакцины свиноматок. Сформировали две группы поросят по 102 голов в каждой. По достижении 15-18 суточного возраста всех поросят иммунизировали внутримышечной инъекцией ИБФГОА вакциной двукратно 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 Ферраминовита, 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 росто-весовые показатели поросят обобщены в таблице 13.

Среднесуточный 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 $2,1 \pm 0,07$ Ig, тогда как у второй группы они были на 17% ниже ($p < 0,01$). Следовательно, одновременное ведение с вакциной Ферраминовита способствовало более интенсивному росту поросят и усилению иммунного ответа.

Таблица 13 – Титры специфических антител и масса поросят (n=10)

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

*..- $p < 0,01$

Результаты определения морфологического состава крови и функциональной активности нейтрофилов обобщены в Таблице 14. Анализируя полученные данные, следует отметить, что применение Ферраминовита 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 Ферраминовита (Таблица 15). 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 ($p < 0,01$).

Таблица 14 – Морфологический состав и функциональные состояния клеток 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 Ферраминовита на функцию печени. Полученные данные позволяют констатировать об эффективности применения Ферраминовита для повышения резистентности организма поросят и усиления иммунного ответа на вакцину.

2.2.6 Оценка экономической эффективности ИБФГОА вакцины

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.

Табл. 15 – Биохимические показатели крови поросят двухмесячного возраста (n = 10)

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

3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

1. На основании обследований отдельных хозяйств в зоне Среднего Поволжья и бактериологических исследований 1145 проб биоматериала за 2014 – 2019 годы выделено 407 изолятов бактерий, среди которых 95 изолята идентифицированы как стрептококки (23,3%), 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 напряженный 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. Предотвращенный 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 инактивированную бивалентную формол гидроокись алюминиевую вакцину, изготавливаемую в соответствии с лабораторным регламентом «Изготовления и контроля инактивированной бивалентной формол гидроокись алюминиевой вакцины против стрептококкоза свиней», утвержденного ректором ФГБОУ ВО Казанская ГАВМ 11 марта 2021 году согласно «Временных ветеринарных правил по применению инактивированной бивалентной формол гидроокись алюминиевой вакцины против стрептококкоза свиней», утверждённых Начальником Главного Управления ветеринарии Кабинета Министров Республики Татарстан (17 марта 2021 года).

СПИСОК НАУЧНЫХ РАБОТ ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Тахавиев, И.Г. Анализ заболеваемости сельскохозяйственных животных стрептококкозом в хозяйствах Среднего Поволжья / И.Г. Тахавиев, А.М. Алимов, А.Н. Чернов и др. // Учёные записки Казанской ГАВМ – 2016. Т. 227. – №3, – С. 48 – 53. С. 53–55.
2. 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. – Т. 228. – № 4 (228). – С. 74–78.
3. Тахавиев, И.Г. Эпизоотическая ситуация по стрептококкозу сельскохозяйственных животных на территории Среднего Поволжья / И.Г. Тахавиев, А.М. Алимов, И.З. Тухбатуллин // Учёные записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2017. Т. 230. – №2. – С. 143–145.
4. Тахавиев, И.Г. Характеристика роста Streptococcus на различных питательных средах / И.Г. Тахавиев, А.М. Алимов // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2018. №8. – С. 70 – 74.
5. Тахавиев, И.Г. Изучение роста микроорганизмов рода Streptococcus на различных питательных средах / И.Г. Тахавиев, А.М. Алимов // Учёные записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2018. Т. 234. – №2. – С. 190 – 194.
6. Тахавиев, И.Г. Распространение стрептококкоза у свиней. Мат. Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Знание молодых для развития ветеринарной медицины в АПК страны. ФГБОУ ВО Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины». Санкт-Петербург 19-20 ноября 2020. – С. 187 – 188.
7. Tahaviev, I.G. Efficacy of inactivated bivalent formol-hydroxide aluminum vaccine in Streptococcus of Pigs. / I.G. Tahaviev, A.M. Alimov, N.R, Kasanova, E.Yu. Mikryukova // International scientific conference. Science and innovation 2021: Developmnt directions and prioritites. Melbourne, Australia. March 14, 2021. - P. 168 – 173.