ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ, РАДИАЦИОННОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ»

На правах рукописи

НАСЕРТДИНОВ ДИНАР ДАМИРОВИЧ

РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ПОЛИСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ГИПЕРИММУННОЙ СЫВОРОТКИ ПРОТИВ АНАЭРОБНОЙ ЭНТЕРОТОКСЕМИИ И ЭШЕРИХИОЗНОЙ ДИАРЕИ ТЕЛЯТ

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук

Научный руководитель:
доктор биологических наук
Спиридонов Г.Н.

Казань – 2018

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ…….4

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ…….....12

1.1 Анаэробная энтеротоксемия телят…….12

1.2 Эшерихиозная диарея телят……..24

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ..... 37

2.1 Материалы и методы исследований…….……37

3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ...…….46

3.1 Этиологическая структура желудочно-кишечных заболеваний телят в Приволжском Федеральном округе …….……46

3.2 Разработка полиспецифической гипериммунной сыворотки против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят…….….….55

3.2.1 Биологические свойства штаммов микроорганизмов, используемых при изготовлении гипериммунной сыворотки…… ……...55

3.2.2 Получение бактериальной массы бактерий *Cl. perfringens*, *E. coli* и их анатоксинов для иммунизации быков-продуцентов……..……..57

3.2.3 Изыскание оптимальной схемы гипериммунизации быков-продуцентов антигенами бактерий *Cl. perfringens* и *E. coli*……..……58

3.2.4 Оценка безвредности, стерильности и специфической активности гипериммунной сыворотки…… 62

3.2.5 Определение оптимальной лечебной и профилактической дозы гипериммунной сыворотки для новорожденных телят……65

3.2.6 Испытание лечебно-профилактической эффективности гипериммунной сыворотки против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят в производственных условиях……..67

3.2.7 Экономическая эффективность применения гипериммунной лечебно-профилактической сыворотки при анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят……72

ЗАКЛЮЧЕНИЕ……..……....77
РЕКОМЕНДАЦИИ ПРОИЗВОДСТВУ…….…....….85
СПИСОК СОКРАЩЕННЫХ ТЕРМИНОВ …….…….86
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ……. ……...……..…87
СПИСОК ИЛЛЮСТРИРОВАННОГО МАТЕРИАЛА ……..…120
ПРИЛОЖЕНИЯ…….…....122
1. Приложение А. Патент Российской Федерации на изобретение «Способ получения гипериммунной сыворотки против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят», патент РФ № 2523389, 23.05.2014 г. ……..123
2. Приложение Б. Технические условия на сыворотку гипериммунную против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят…….126
3. Приложение В. Инструкция по применению сыворотки гипериммунной против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят……...128
4. Приложение Г. Справка о депонировании энтеротоксигенного штамма «КВ-1» *Escherichiae coli* - возбудителя эшерихиозной диареи телят……....131
5. Приложение Д. Справка о депонировании энтеротоксигенного штамма «ПЗ-3» *Escherichiae coli* - возбудителя эшерихиозной диареи телят……132
6. Приложение Е. Паспорт на штамм «КВ-1» *Escherichiae coli*…….133
7. Приложение Ж. Паспорт на штамм «ПЗ-3» *Escherichiae coli*……134
8. Справка о депонировании штаммов *Cl. perfringens* …….135
9. Приложение З. Паспорт на штамм №28 *Cl. perfringens* (тип А)……..136
10. Приложение И. Паспорт на штамм №392 *Cl. perfringens* (тип С)……..137
11. Приложение К. Паспорт на штамм №213 *Cl. perfringens* (тип Д)……..138
12. Приложение Л. Акт о производственном испытании вакцины…….139
13. Приложение О. Диплом лауреата ежегодного Республиканского конкурса «Лучшее изобретение года» в номинации «Медицина и ветеринария»…..142

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Выживаемость молодняка крупного рогатого скота является одним из наиболее важных факторов поддержания высокого качества ведения животноводства. Тем не менее, на практике увеличение поголовья сельскохозяйственных животных упирается в проблему эпидемий болезней, прежде всего, среди телят постнатального периода. В структуре заболеваемости новорожденных телят важное место занимают желудочно-кишечные болезни бактериальной и вирусной этиологии, протекающие обычно в качестве смешанной инфекции и являющиеся одной из наиболее распространённых причин падежа молодняка в первые несколько суток жизни. По имеющимся данным, к которым пришли российские учёные, на молочно-товарных фермах Российской Федерации каждый год заболевают 70-90 % новорожденных телят и приблизительно одна треть из числа заболевших погибает в первые дни жизни, причина чего - острые гастроэнтериты с проявлениями диареи [22,24,38,57,103,114,128].

В этиологии желудочно-кишечных заболеваний новорожденных телят рядом российских и иностранных авторов отмечается увеличение значения бактерий *Clostridium perfringens* и их ассоциаций с другими видами энтеробактерий, в частности, с *E.coli* [89,107,148,172,242]. Исследованиями сотрудников лаборатории бактерийных инфекций ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» выявлено, что анаэробная энтеротоксемия и эшерихиозная диарея являются широко распространенными в сельскохозяйственных предприятиях Приволжского Федерального округа животноводческого профиля. Из 50 обследованных животноводческих хозяйств анаэробная энтеротоксемия выявлена в 23 хозяйствах, из числа последних в 18 (78,2%) хозяйствах она проявлялась совместно с эшерихиозом. Болеют прежде всего телята в возрасте 1-3 недели. Генезис этих заболеваний инфекционной природы, как и тяжесть их течения, обусловлены такими факторами, как нерациональное

кормление и содержание глубокостельных коров, а также нарушения санитарно-гигиенических и противоэпизоотических требований [87,120].

Усилиями исследователей ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» создана ассоциированная вакцина против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят, основой которой послужили инактивированные антигены бактерий *Cl. perfringens* (серотипы А, С, Д) и *E.coli*, синтезирующие адгезивные антигены К99, А20, а также их ТЛ- и ТС-анатоксины (Патент РФ № 2428202). Вакцина применяется для иммунизации глубокостельных коров и нетелей с целью формирования у молодняка колострального иммунитета через материнское молозиво, а также для иммунизации телят 18-20-ти дневного возраста, полученных от иммунизированных маток.

Получаемые с молозивом матери антитела формируют у молодняка защиту от инфекций до тех пор, пока они не выработают собственные механизмы иммунитета. Известно, что некоторые животные после рождения по ряду причин лишены возможности получить эту естественную защиту в необходимом количестве. Это объясняется, например, недостаточным поступлением антител с молозивом матери, недостаточным по объёму и несвоевременным получением от матери молозива либо дефектами механизма абсорбции иммуноглобулинов молозива кишечником телят. С учётом сказанного, разработка полиспецифической лечебно-профилактической гипериммунной сыворотки против бактерий *Cl. perfringens* и *E. coli* представляет собой крайне актуальную задачу. Биопредприятия Российской Федерации в настоящее время производят несколько видов гипериммунных сывороток, применяемых с целью формирования специфической профилактики, а также лечения желудочно-кишечных болезней сельскохозяйственных животных, но они не имеют в своем составе специфических антител к бактериям *Cl. perfringens*.

В учётом вышеизложенного, изыскание гипериммунной сыворотки для специфической профилактики и лечения анаэробной энтеротоксемии и

эшерихиозной диареи у телят как инфекции смешанного типа – является актуальной задачей ветеринарной науки и практики.

Степень разработанности проблемы. В настоящее время в Российской Федерации с целью специфической профилактики анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи молодняка сельскохозяйственных животных нашли применение различные моно- и ассоциированые вакцины российского и зарубежного производства [38,127]. Разработаны и освоены в промышленном производстве гипериммунные лечебно-профилактические сыворотки против эшерихиозной диареи. С целью лечения анаэробной энтеротоксемии применяются различные антибиотики и химиотерапевтические препараты, эффективность которых не всегда является достаточной. Также наработан опыт применения на ранней стадии заболевания антитоксической сыворотки в сочетании с антибиотиками. Если заболевание вызвано *Cl. perfringens* типов В, С и Д, то для этой цели применяется бивалентная антитоксическая сыворотка против анаэробной дизентерии ягнят и инфекционной энтеротоксемии овец в сочетании с антибиотиками или же сульфаниламидными препаратами. В случае, если анаэробная энтеротоксемия телят вызвана *Cl. perfringens* типа А, применяется противогангренозная медицинская сыворотка. Но необходимо отметить, что в противогангренозной медицинской сыворотке не содержатся антитела против энтеротоксинов, в связи с чем её эффективность не может быть признана высокой [141]. В связи с этим, разработка гипериммунной сыворотки против анаэробной энтеротоксемии актуальна. Учитывая то, что анаэробная энтеротоксемия часто сочетается с эшерихиозом, имеется необходимость разработки полиспецифической сыворотки против этих болезней.

Цель и задачи. Целью исследований явилось изучение этиологической структуры желудочно-кишечных заболеваний молодняка крупного рогатого скота и разработка полиспецифической гипериммунной сыворотки против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят.

Цель исследования обусловила необходимость решения следующих задач:

1. Проанализировать этиологическую структуру анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи молодняка крупного рогатого скота в Приволжском Федеральном округе;

2. Разработать технологию изготовления гипериммунной лечебно-профилактической сыворотки против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят;

3. Оценить эффективность полиспецифической гипериммунной сыворотки в лабораторных и производственных условиях;

4. Разработать нормативные документы, регламентирующие изготовление, контроль и применение гипериммунной сыворотки против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят для её внедрения в ветеринарную практику.

Научная новизна. На основании результатов клинико-эпизоотологических, патологоанатомических, бактериологических исследований установлено, что желудочно-кишечные заболевания молодняка крупного рогатого скота в сельскохозяйственных предприятиях Приволжского Федерального округа протекает преимущественно в виде смешанной инфекции. Основными этиологическими агентами при этом являются энтеропатогенные штаммы *E.coli*, *Cl. perfringens*, бактерии рода *Streptococcus*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella* и *Pseudomonas aeroginosa*.

Выявлено, что 71,8% патогенных изолятов *E. coli*, вызывающих эшерихиозы новорожденных телят, продуцируют различные адгезивные антигены. Наиболее часто у больных новорожденных животных до 10-дневного возраста присутствуют возбудители с адгезивными антигенами А20 и К99.

Обоснована необходимость разработки полиспецифической гипериммунной сыворотки для лечения и пассивной иммунопрофилактики анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи молодняка сельскохозяйственных животных.

Впервые в Российской Федерации разработана и освоена технология изготовления гипериммунной лечебно-профилактической сыворотки против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят.

Определены оптимальные профилактическая и лечебная дозы гипериммунной лечебно-профилактической сыворотки для новорожденных телят. Подтверждена эффективность сыворотки в лабораторных и производственных условиях.

Новизна и приоритет научных исследований диссертационной работы подтверждены Патентом РФ на изобретение.

Теоретическая и практическая значимость. На основании результатов исследований разработан и предложен для внедрения в ветеринарную практику инновационный эффективный биологический препарат для лечения и пассивной профилактики анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят (Патент РФ № 2523389 от 23.05.2014 г.).

Материалы исследований составили основу нормативных документов, регламентирующих порядок изготовления, контроля и применения лечебно-профилактической сыворотки:

– Технические условия на сыворотку гипериммунную против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят, ТУ 9384-003-00492374-2015 (утверждены директором ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», согласованы с ГУВ КМ РТ 12.02.2015 г.);

– Инструкция по изготовлению и контролю сыворотки гипериммунной против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят (утверждена директором ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» 03.02.2015 г.);

– Инструкция по применению сыворотки гипериммунной против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят (утверждена директором ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», согласована с ГУВ КМ РТ 12.02.2015 г.).

Методология и методы исследований. Работа выполнена в период с 2010 по 2017 гг. в лаборатории бактерийных инфекций ФГБНУ «ФЦТРБ-

ВНИВИ» в соответствии с государственным заданием по НИР № 01200202602. Производственные испытания сыворотки проведены на базе ряда сельскохозяйственных предприятий Республики Татарстан, неблагополучных по желудочно-кишечным заболеваниям молодняка сельскохозяйственных животных.

Методологические подходы в решении задач диссертационного исследования заключаются в следующем: литературном поиске, направленном на обоснование актуальности, цели и задач исследования; анализе данных российских и зарубежных публикаций в области тематики исследования; выявлении этиологии и характера распространения желудочно-кишечных заболеваний молодняка крупного рогатого скота в Приволжском Федеральном округе; разработке и оценке эффективности гипериммунной лечебно-профилактической сыворотки против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Этиологическая структура желудочно-кишечных заболеваний молодняка крупного рогатого скота в хозяйствах Приволжского Федерального округа;
2. Технология изготовления сыворотки гипериммунной против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят;
3. Иммунобиологические показатели полиспецифической гипериммунной сыворотки: безвредность, превентивные свойства, содержание специфических антител, лечебно-профилактическая активность.

Личный вклад соискателя. Диссертационная работа выполнена автором самостоятельно. В ходе выполнения работы практическую и консультативную помощь оказывали кандидаты биологических наук Спиридонов А.Г. и Махмутов А.Ф., за что выражаю им глубокую благодарность.

Степень достоверности и апробация результатов. Экспериментально полученный цифровой материал обработан методом вариационной статистики с применением пакета прикладных программ Microsoft Excel.

Основные положения диссертации доложены, обсуждены и получили положительную оценку на:

- ежегодных заседаниях Ученого совета Федерального центра токсикологической, радиационной и биологической безопасности (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ») при обсуждении отчетов о НИР за 2010-2017 гг.;

- Всероссийской научно-практической конференции «Научное обеспечение инновационного развития ветеринарной медицины и животноводства» ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана» (Казань, 2013, 2014, 2016);

- Международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Биотехнологии в решении экологических проблем природы, общества и человека в Евразии: Взгляд молодых ученых и специалистов» (Казань, 2013);

- Международной научно-практической конференции «Биотехнология: реальность и перспективы в сельском хозяйстве», посвященной 100-летию СГАУ им. Н.И. Вавилова (Саратов, 2013);

- II Всероссийской научно-практической конференции «Современные достижения ветеринарной медицины и биологии – в сельскохозяйственное производство», посвященной 100-летию со дня рождения заслуженного деятеля науки РСФСР и Башкирской АССР, профессора Х.В. Аюпова (Уфа, 2014);

- Региональной научно-практической межвузовской конференции «Актуальные задачи ветеринарии, медицины и биотехнологии в современных условиях и способы их решения» (Самара, 2015);

- Научно-практической конференции «Актуальные проблемы современной ветеринарной науки и практики», посвященной 70-летию Краснодарского научно-исследовательского ветеринарного института

(Краснодар, 2016);

- Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов «Эколого-биологические проблемы использования природных ресурсов в сельском хозяйстве» (Екатеринбург, 2017);

- Международной научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины», посвященной 90-летию со дня рождения профессора В.А. Киршина (Казань, 2018).

Публикация результатов исследований. По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, из них 4 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, получен патент РФ на изобретение № 2523389: «Способ получения гипериммунной сыворотки против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят».

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 142 страницах компьютерного текста и включает следующие разделы: общая характеристика работы, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследований, заключение, рекомендации производству, список использованной литературы, состоящий из 285 источников, в том числе – 132 иностранных авторов и приложения. Диссертация содержит 11 таблиц и иллюстрирована 4 рисунками.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Анаэробная энтеротоксемия телят

Анаэробная энтеротоксемия (Enterotoxaemia infectiosa anaerobica) представляет собой токсико-инфекционную болезнь многих видов животных, прежде всего, молодняка, характеризующуюся общей интоксикацией организма с отличительными признаками поражения нервной системы и желудочно-кишечного тракта, большим охватом поголовья и высокой летальностью (до 60-100%) [13,66,216,268]. Возникновение анаэробной энтеротоксемии связано с быстрым размножением в кишечнике заболевших особей бактерий *Cl. perfringens* и всасывания возникающих токсинов.

Заболевание, первоначально получившее название «энтеротоксемическая желтуха», впервые было описано австралийскими учёными в 1936 году при следующих обстоятельствах. Болели телята в возрасте 2-4 месяцев, в наблюдаемой популяции отмечалась высокая смертность. Менее чем за сутки до летального исхода телята отказывались от корма, демонстрировали такие признаки поражения центральной нервной системы, как судороги и нарушения координации движений. Вскрытия павших животных показывали одни и те же признаки: желтушность и геморрагическое воспаление кишечника и почек.

Несколько позже эту болезнь молодняка крупного рогатого скота описали французские учёные Lesbonries, Bartheion (1937). От павших телят они выделили так называемую культуру *Cl. perfringens* типа Д. В Новой Зеландии, с учётом характерной патологоанатомической картины негативных изменений в работе почек, болезни дали название «болезнь размягчения почек». Bennets в 1932 г. выделил из кишечника павших овец бактерий *Cl. perfringens* тип D, дав ему название «B. ovitoxicus». Несколько позднее в Великобритании были выделены бактерии *Cl. perfringens* типа С (Мак-Эвен, 1930 г.). *Cl. perfringens* типа А были открыты в 1892 г. американскими микробиологами Уэлчем и Нэталлом (1892), чистую культуру получили Вейон и Жубер (1893), наименовавшие её *perfringens* [20]. В Великобритании

Bosworth (1943) выделил из кишечного тракта трёх павших от энтеротоксемии телят возбудителя, не соответствующего ни одному известному ранее типу *Cl. perfringens* (А. В. С. Д). Этот возбудитель, названный автором *Cl. perfringens* типа Е, генерировал не известный ранее токсин, убивающий мышей при внутривенном введении и активирующийся трипсином [140].

В США анаэробную энтеротоксемию, вызываемую бактериями *Cl. perfringens* типа С, описали учёные Griner, Broken (1953) и Griner, Baldwin (1954). Инфекция заражала телят, не достигших возраста в 10 дней. Болезнь протекала остро, характеризовалась высокой смертностью телят. В некоторых случаях за несколько часов до летального исхода у поражённых животных удавалось наблюдать признаки колик, тетанические и тонические спазмы, а также прострацию. В тех случаях, когда течение болезни было более продолжительным, отмечалась сильная диарея с кровью. В кишечнике павших телят обнаруживался бета-токсин. Вскрытие показывало геморрагическое и некротическое воспаление тощей и подвздошной кишок. Введение телятам гипериммунной сыворотки сразу после рождения позволяло добиться у них иммунитета против *Cl. perfringens* типа С. Вакцинация коров профилактировала болезнь.

Энтеротоксемию, вызываемую *Cl. perfringens* типа Д, у коров 6-летнего возраста породы абердин-ангус зафиксировали Keast, McBarron (1954). Течение заболевания сопровождалось значительными потерями выращиваемого крупного рогатого скота.

Доступные в литературе данные об анаэробной энтеротоксемии, вызываемой бактерией *Cl. perfringens* типа Е, ограничены. Болезнь новорожденных телят, вызываемая этим типом бактерий, характеризовалась очень высокой скоростью течения. Заражённый молодняк крупного рогатого скота демонстрировал такие характерные признаки, как повышение температуры, выделения из носа, слезотечение и диарею с кровью. Вскрытие показывало наличие в основном поражений, характерных для

геморрагического и некротического энтерита, а также кровоизлияния во внутренних органах [141].

В настоящее время анаэробная энтеротоксемия крупного рогатого скота демонстрирует широкую распространённость во многих странах мира. В России болезнь впервые наблюдал П.Н. Андреев (1928), а подробное описание дал С.Н. Муромцев (1936) [13].

В.Г. Зароза (1984) в обзоре зарубежной литературы по проблеме анаэробной энтеротоксемии крупного рогатого скота приходит к выводу, что в настоящее время в этиологии энтеротоксемии новорожденных телят увеличивается роль *Cl. perfringens*, особенно типа А, и негативное влияние этой инфекции в перспективе может возрастать при концентрации и интенсификации животноводства, если не будут обеспечены оптимальные условия кормления и содержания молодняка.

Анаэробная энтеротоксемия вызывается палочками *Cl. perfringens*, представляющими собой спорообразующие грамположительные палочки. По характеру выделения токсинов палочки *Cl. perfringens* подразделяются на следующие типы: А, В, С, Д, Е, F, отличающиеся друг от друга антигенной структурой выделяемых ими токсинов [3,20,77]. У ягнят рассматриваемую инфекцию вызывают возбудители серотипов В и Д; у телят – серотипов А, С и D, у поросят – преимущественно возбудители типа С, в более редких случаях – другими [7,66,107].

Родовое название инфекции дано по факту сходства этих бактерий с веретеном (closter – лат. маленькое веретено), которое они приобретают в результате раздувания бактериальных клеток крупными спорами, расположенными в центре или же ближе к одному концу [13].

Бактерии *Cl. perfringens* представляют собой крупные палочки с обрубленными или несколько закругленными концами длиной 3-9 мкм и шириной 0,9-1,3 мкм. Эти бактерии неподвижны, не имеют жгутиков, молодые клетки окрашиваются по Граму положительно, старые – отрицательно [13,77,141]. В организме животного и средах, содержащих в

себе нативный белок, бактерии *Cl. perfringens* формируют капсулу, а во внешней среде – споры. Капсула окружает микробную клетку в виде светлого ободка, хорошо видного при окраске мазков простым способом. Способность к образованию капсулы у бактерии нейтрализуется при длительном хранении штаммов или частых пересевах на среды, бедные нативным белком. Если имеют место неблагоприятные условия во внешней среде, а также при продолжительном выращивании на безуглеводных, щелочных, богатых белками средах, бактерии *Cl. perfringens* образуют споры. Споры *Cl. perfringens* по форме крупные, овальные, расположены центрально, клетка-спорангий почти не деформируется. Термоустойчивость спор серотипов B и D относительно невысока (они погибают при кипячении в течение 15-30 минут), споры типов A и C более устойчивы и выживают при кипячении и даже автоклавировании в течение 1-6 ч. Спорообразование стимулирует прогревание при 75°C в течение 10-15 минут [20,77].

Бактерии *Cl. perfringens* расщепляют с образованием кислоты и газа глюкозу, ксилозу, галактозу, сахарозу, мальтозу, лактозу, раффинозу, маннозу, крахмал, гликоген и инозит; глицерин разлагают не все штаммы, не сбраживает маннит, дульцит; в редких случаях ферментирует салицин и инсулин. *Cl. perfringens* от других клостридий отличает наличие таких свойств, как: способность восстанавливать нитраты, расщеплять лактозу, образовывать лецитиназу [77].

На жидких питательных средах, приготовленных из гидролизата мяса или казеина и включающих в себя ферментируемые углеводы, бактерии *Cl. perfringens* демонстрируют обильный и быстрый рост с бурным газообразованием [20,77,140].

На поверхности кровяного агара *Cl. perfringens* по истечении 12-18 часов образуют крупные, сочные колонии сероватого цвета, окруженные одним или двумя светлыми зонами гемолиза, которые в результате выдерживания на воздухе приобретают зеленоватый оттенок, что является характерным признаком для колоний микроорганизмов рассматриваемого вида.

В зависимости от диссоциации штамма, условий культивирования и качества сред у *Cl. perfringens* выявляется три варианта колоний на поверхности плотных питательных сред: гладкий (S), шероховатый (R) и слизистый (M). Гладкие колонии отличаются средними размерами, также им свойственна выпуклая правильная или почти правильная округлая форма с ровными краями и гладкой блестящей поверхностью серовато-белого цвета. В мазках из колоний этой формы выявляются грамположительные палочки средних размеров с несколько закругленными концами. Они располагаются или изолированно друг от друга, или рядами (группами). Недиссоциированные штаммы, формирующие колонии гладкой формы, продуцируют более активные токсины.

Колонии шероховатой формы значительно больше по размерам, чем колонии гладкой формы, и отличаются неровной, бугристой, матовой поверхностью с изрезанными краями и плотно приподнятым центром. Колонии шероховатых вариантов состоят из длинных палочек и нитей с утолщениями на краях, наподобие спор, при этом они слабо окрашиваются по Граму.

Колонии М варианта отличаются от других наличием слизистой консистенции. Колонии этого типа состоят из капсульных клеток и при росте на жидких средах выделяют слизь [141].

Активность токсинов зависит не только от индивидуальных свойств штаммов и качества питательной среды, но и от сроков выращивания, физиологического состояния и дозы засеваемой культуры. Максимально накопление главных летальных токсинов *Cl. perfringens* отмечается через 5-8 ч при засеве культурой в фазе логарифмического роста в количестве 3% к объему питательной среды и совпадает с завершением активного роста и снижением газообразования. Затем активность токсинов падает, что связано с разрушающим действием собственных протеаз.

Фильтраты микробных культур *Cl. perfringens* могут содержать также другие токсичные вещества (в частности, фибринолизин и гиалуронидазу)

[20,54].

Различные виды как патогенных, так и сапрофитных клостридий обладают близким родством в антигенном отношении. Выявлено наличие перекрестных серологических реакций между отдельными видами клостридий, обусловленное не только соматическими и жгутиковыми антигенами, но и антигенами токсинов и ферментов, продуцируемых этими микроорганизмами [141].

Вирулентность *Cl. perfringens* обусловлена типовой принадлежностью штамма, его индивидуальными свойствами и составом сред, в которых эта культура выращена. Парэнтеральное введение штамма любого типа, продуцирующего достаточное количество альфа-токсина, вызывает гибель инфицированных животных. Из лабораторных животных наибольшей чувствительностью к вирусу обладают голуби и морские свинки, для них смертельная доза находится в диапазоне 0,1-1 см^3. Штаммы типа В и С обычно более вирулентны, чем типа А и Д. Вирулентность штамма типа Д зависит от его способности вырабатывать альфа- и эпсилон-токсины. Штаммы, продуцирующие значительное количество альфа-токсина, более вирулентны в сравнении со штаммами, синтезирующими большое количество эпсилон- и малое количество – альфа-токсина.

Устойчивость *Cl. perfringens* к воздействию на них различных факторов зависит от физиологического состояния микробной клетки и индивидуальных особенностей штамма. Вегетативные формы клостридий быстро гибнут под воздействием кислорода, солнечных лучей, высокой температуры, кислот, щелочей, дезинфицирующих средств и антибиотиков. Например, солнечные лучи разрушают вегетативные формы в чашках Петри в течение 5 часов, кипячение – за 1-3 мин, 2%-ный раствор едкого натра, 5%-ный раствор серной кислоты, 2%-ный раствор формальдегида, 5%-ный раствор фенола – за 5-10 минут.

Во внешней среде споры *Cl. perfringens* выживают продолжительное время, нередко годами. Они гибнут при кипячении в течение 10-15 мин, за

исключением спор некоторых штаммов типов А и С, способных выдержать этот процесс более 1 часа. Споровые формы микроорганизмов более устойчивы также к воздействию химических факторов.

В естественных условиях к возбудителю инфекционной энтеротоксемии более восприимчивы овцы, в меньшей степени – животные иных видов (крупный рогатый скот, лошади, свиньи и др.), но в наибольшей степени уязвим молодняк животных [66]. Как отмечалось, болезнь широко распространена во многих странах мира, в том числе и в различных регионах Российской Федерации, нанося животноводству существенный экономический ущерб [3,19,40,86].

Источником возбудителя инфекции являются больные животные и бактерионосители. Они контаминируют почву, подстилку, предметы ухода, чем объясняется стационарный характер болезни [66,106]. Заражение происходит алиментарным путем с инфицированными кормами, водой, при сосании вымени, загрязненного выделениями больных животных. Болезнь протекает спорадически, сначала возникают единичные случаи инфицирования, затем количество заражённых особей увеличивается. Возникновению и распространению болезни способствуют нарушения зоогигиенических и ветеринарно-санитарных правил выращивания молодняка, недостаточное и нерациональное кормление [56,269]. Энтеротоксемия у телят, вызванная типом А, может возникать без заноса инфекции извне. Типы С и Д традиционно являются причиной болезни у телят более старшего возраста (6-12 мес), направленных на пастбищное содержание или находящихся на откорме с высоким содержанием концентратов в рационе [13].

В некоторых количествах бактерии *Cl. perfringens* – сапрофиты организма. Кроме того, будучи почвенными микробами, клостридии проникают в пищеварительный тракт животных. Для начала проявления патогенного действия возбудителю необходимо усиленно размножаться в желудочно-кишечном тракте носителя и вырабатывать большое количество

токсина. Усиленному размножению микробов и их токсинообразованию предшествует нарушение моторной и секреторной деятельности животного, обусловленное, например, сменой кормления и другими факторами [55,56,231,270].

Развитие патологического процесса при анаэробной энтеротоксемии животных всех видов, вне зависимости от штамма, вызывающего заболевание, происходит одинаково. Возбудитель, проникая в желудочно-кишечный тракт животного, усиленно размножается и выделяет токсины, которые, воздействуя на слизистую оболочку тонкого и толстого кишечника, вызывают воспаления, язвы, некротические изменения, негативно влияют на секреторную и моторную функции пищеварительного тракта. Токсины проникают в кровь, оказывают воздействие на эндотелий сосудов, слизистые и серозные оболочки, внутренние органы, вызывают множественные кровоизлияния, разрушают паренхиму почек, печени, других органов. Слизистая оболочка кишечника при этом утрачивает барьерную функцию, и кровь поступает в необезвреженном виде в общее кровеносное русло. Заражённые животные погибают от интоксикации [13].

Особенности клинических признаков и характер течения болезни зависят от типа возбудителя. У телят в возрасте от 1-5 дней до 3 недель болезнь протекает очень остро, иногда гибель наступает через 3-4 ч после появления первых симптомов: повышение температуры тела, учащение пульса и дыхания, отказ от корма, вялость, острые колики, нервные явления. У молодняка крупного рогатого скота наблюдаются диарея с примесью крови, кал сначала имеет желто-зеленый цвет, содержит пузырьки газа, а потом приобретает буро-коричневый цвет. У некоторых телят - кровотечение из естественных отверстий. В области подчелюстного пространства, шеи, подгрудка, живота, спины, конечностей могут быть заметны инфильтраты в подкожной клетчатке. Животное гибнет в коматозном состоянии. В некоторых случаях телята выживают, но отстают в росте и развитии [13,17,54,66].

У крупного рогатого скота на откорме болезнь имеет три формы. Первая (наиболее часто встречающаяся) выражается непредвиденным падежом животных без каких-либо зафиксированных ранее признаков развития болезни. В тех случаях, когда болезнь проявляет себя клинически, в качестве характерных признаков необходимо назвать внезапную потерю координации движений и состояние прострации. Могут также отмечаться конвульсии, мышечные спазмы ушей и глаз. При второй форме развития заболевания температура тела животного незначительно повышается, при этом развивается паралич тазовых конечностей. Летальный исход наступает быстро - в течение 8-12 ч. Третья форма развития болезни характеризуется коматозным состоянием и прострацией уже в самом начале болезни. Тактильные и слуховые раздражители вызывают у заболевших животных конвульсии и опистонус. Смерть, как правило, наступает через неделю.

При всех клинических формах развития болезни отмечаются гипергликемия и гликозурия. Заболевание может возникать спорадически, но в некоторых стадах в течение короткого периода времени заболеваемость может достигать 5-10 %. Летальность составляет почти 100 % [13].

При осмотре павших животных наблюдаются вздутие трупа и быстрое разложение. У телят присутствуют пенистые и кровянистые выделения из полости рта и носовой полости. Видимые слизистые оболочки анемичны, область вокруг анального отверстия запачкана испражнениями. Основные изменения обнаруживаются в брюшной полости: острое катаральное воспаление сычуга, в тонком отделе кишечника слизистая оболочка диффузно гиперемирована, часто язвочками и покрыта фибрином. Содержимое кишечника темно-красного цвета с пузырьками газа. Брыжеечные и портальные лимфатические узлы отечны, гиперемированы. Печень незначительно увеличена, дряблая, серо-желтоватого цвета с красноватыми пятнами. В почках содержатся инфильтраты. Селезенка без видимых изменений. На серозных оболочках, эндокарде левого желудочка, эпикарде и тимусе наблюдаются множественные точечные и пятнистые

кровоизлияния. Возможен отек мозга [13,33,145].

Диагноз на анаэробную энтеротоксемию ставят, руководствуясь содержанием эпизоотологических данных, клинических признаков, патологоанатомических изменений и результатов лабораторных исследований. Для исследования в лабораторию направляется труп животного целиком или пораженные в наибольшей степени отрезки тонкого отдела кишечника с содержимым, перевязанные с обоих концов, а также часть печени, селезенки и почку. Патологический материал необходимо брать не позднее 3-4 часов после летального исхода.

Лабораторное исследование проводится в двух направлениях:

- выявление токсина в содержимом тонкого отдела кишечника;

- обнаружение и выделение культуры возбудителя из патологического материала с последующей её проверкой на токсичность.

С целью обнаружения токсина фильтрат экстракта содержимого кишечника вводят внутрибрюшинно двум белым мышам в дозе 0,5 см^3. Если токсин присутствует, белые мыши погибают в течение 12 часов. Для определения типа основных летальных токсинов *Cl. perfringens* ставят реакцию нейтрализации на белых мышах или кроликах. С этой целью в пять пробирок разливают по 1,0 см^3 фильтрата экстракта содержимого кишечника и добавляют по 1,0 см^3 диагностических антитоксических сывороток *Cl. perfringens,* разведенных стерильным физиологическим раствором до содержания 10АЕ в 1,0 см^3: в первую пробирку – сыворотку типа А, во вторую – типа С, в третью – типа Д, четвертую – типа Е. В пятую пробирку для контроля добавляют 1,0 см^3 физиологического раствора. Пробирки выдерживаются при температуре 37^{0}С в течение 30 минут. Смесь из каждой пробирки вводят внутривенно или внутрибрюшинно по 0,5 см^3 двум белым мышам или внутрикожно по 0,2 см^3 морской свинке или кролику. Результат реакции нейтрализации фиксируется при гибели контрольных белых мышей или образовании некроза у контрольных морских свинок (кроликов).

Белые мыши, получившие инъекцию смеси токсина с гомологичной

антитоксической сывороткой, остаются живы, а у морских свинок и кроликов не развивается некроз. При обнаружении в содержимом кишечника токсинов определенного типа дальнейшую работу по выделению культуры не проводят [7,11,13,54,145].

Выделение культуры возбудителя. Высевы из паренхиматозных органов делают в среду Китта-Тароцци, МПБ и на МПА, из содержимого тонкого отдела кишечника – только в среду Китта-Тароцци. Посевы инкубируют в термостате при 37-38^{0}С в течение 20-24 ч. Для очистки культуры возбудителя от сопутствующей микрофлоры используют следующие специальные методы: метод частых пересевов на среде Китта-Тароцци; метод прогревания культуры в водяной бане при температуре 65^{0}С в течение 10 мин. На среде Китта-Тароцци *Cl. perfringens* дает бурный рост с сильным равномерным помутнением бульона и сильным газообразованием. В мазках из культур наличествуют грамположительные короткие толстые палочки с обрубленными концами, не имеющие спор. На глюкозо-кровяном агаре *Cl. perfringens* формирует крупные, гладкие, выпуклые колонии с ровными краями, окруженные одной или двумя зонами сильного непрозрачного (неполного) гемолиза. Типичные для возбудителя колонии отвивают на среду Китта-Тароцци. Для определения токсичности используют 8-16-часовую культуру, выращенную на среде Китта-Тароцци.

Инъекцию культуры проводят внутривенно или внутрибрюшинно в дозе 0,5 мл белым мышам массой 16-18 г. При подозрении на присутствие *Cl. perfringens* типов Д и Е культуру подвергают активированию добавлением 0,5% панкреатина или 0,25% трипсина при pH 8,0-8,2. С этой целью культуру подщелачивают 10%-ным раствором едкого натра, вносят панкреатин или трипсин и выдерживают при температуре 37-38^{0}С в течение 2 часов, периодически взбалтывая. После активирования токсичность культур типов Д и Е существенно увеличивается, а токсичность культур типа С, напротив, резко снижается. Токсичность культур типа В может сохраниться на прежнем уровне за счет активации эпсилон-токсина. Определение типа

токсина осуществляют в реакции нейтрализации основных летальных токсинов с применением диагностических антитоксических сывороток Клостридиум перфрингенс типов А, С и Д, производство которых осуществляется Курской биофабрикой. Для обнаружения и количественной фиксации энтеротоксина *Cl. perfringens* применяется также встречный иммуноэлектроосмофорез. Типирование токсинов *Cl. perfringens* осуществляется в мультиплексе ПЦР [49,83].

Диагноз на инфекционную энтеротоксемию животных считают установленным в случае:

- обнаружения токсина в фильтрате содержимого тонкого отдела кишечника биологическим методом и определения его типа в реакции нейтрализации с типоспецифическими сыворотками;

- выделения из содержимого тонкого отдела кишечника культуры с характерными для данного возбудителя свойствами, продуцирующей токсин, тип которого установлен в реакции нейтрализации с типоспецифическими сыворотками.

В ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» разработана иммуноферментная тест-система для определения специфических антител к 4 серотипам *Cl. perfringens* (А, В, С и Д), применение которой позволяет достоверно определять анаэробную энтеротоксемию среди невакцинированного поголовья и контролировать напряженность поствакцинального иммунитета у вакцинированных животных (Патент РФ № 2625031).

При постановке диагноза также учитывают клиническое проявление и течение болезни, возраст больных и павших животных, а также патологоанатомические изменения [70,113].

Животные, переболевшие анаэробной энтеротоксемией, приобретают иммунитет, напряженность и длительность которого зависят от силы и тяжести перенесенной болезни [13,66]. Для создания специфического иммунитета у животных применяют:

- концентрированную поливалентную гидроокисьалюминиевую вакцину

против брадзота, инфекционной энтеротоксемии, злокачественного отека овец и дизентерии ягнят, содержащую в своем составе антигены *Cl. perfringens* типов В, С и Д;

- поливалентный анатоксин против клостридиозов овец на основе анатоксинов *Cl. perfringens* типов С и Д;

- вакцину ассоциированную против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиоза поросят на основе микробных клеток бактерий *Cl. perfringens* типа С и эшерихий 7 серологических групп [13,58,106,145].

Американской компанией «Pfizer Animal Health» выпускается и применяется в Российской Федерации вакцина «Ван Шот Ультра 8», в состав которой входят антигены бактерий *Cl. chauvoei, Cl. septicum, Cl. haemolyticum, Cl. noviy, Cl. sordellii, Cl. perfringens* типов С и Д.

Но во всех этих вакцинах отсутствует антиген *Cl. perfringens* серотипа А - основного возбудителя анаэробной энтеротоксемии новорожденных телят, что делает их недостаточно эффективными в хозяйствах, где превалирует возбудитель этого серотипа.

В последние годы в ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» разработана ассоциированная вакцина против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят [127]. Вакцина изготовлена на основе антигенов бактерий *Cl. perfringens* серотипов А, С, Д и энтеротоксигенных штаммов *E. coli,* синтезирующих адгезивные антигены К99 и А20, а также их ТЛ-, ТС-анатоксинов. Вакцина предназначена для профилактики анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят в угрожаемых и стационарно неблагополучных хозяйствах. Вакцину вводят стельным коровам и нетелям за 50-60 дней до отела двукратно с интервалом 14-15 дней в дозе 10 см^3. Телят, полученных от вакцинированных коров, вакцинируют в возрасте 18-20 дней в дозе 3 см^3 двукратно с интервалом 14-15 дней.

1.2 Эшерихиозная диарея телят

Эшерихиоз (Escherichiosis), колибактериоз, колиэнтерит, колисепсис –

остро протекающая зоонозная болезнь молодняка животных многих видов, проявляющаяся септицемией, токсемией и энтеритом, обезвоживанием организма, поражением центральной нервной системы, нарастающей депрессией и слабостью, иногда пневмонией и артритами [13,21,24,102].

Существенный вклад в исследование болезни внесли российские учёные, такие как С.Н. Вышелесский, Р.А. Цион, А.Г. Малявин, Я.Е. Коляков, О.А. Поляков, М.А. Сидоров, В.Г. Зароза и другие. Н.А. Михин (1930) впервые приготовил специфическую сыворотку, А.М. Ахмедов (1958) и Я.Е. Коляков (1960) выявили значение отдельных серологических типов кишечной палочки в патологии молодых особей крупного рогатого скота. И.Ф. Квеситадзе, К.Н. Шерстобаев разработали бактериофаг, М.А. Сидоров (1980) – колипротектан ВИЭВ [63,66].

Первоначально возбудителя колибактериоза впервые выделил и описал Т. Эшерих (1885), в честь которого этот микроб был назван *Escherichia coli* (*E. coli*). Продолжительное время заболевание было известно под названием «колибактериоз». В настоящее время эта болезнь носит название «эшерихиоз».

Болезнь вызывают патогенные штаммы *Escherichia coli*, относящиеся к роду *Escherichia*, семейству *Enterobacteriaceae* [13,54]. *E. coli* представляет собой короткую, толстую, обладающую закругленными концами грамотрицательную палочку, аэроб или же факультативный анаэроб, хорошо растет на обычных питательных средах, особенно быстро - при температуре 37-38^{0}С и pH 7,0-7,2. В жидкой среде (МПБ) рост эшерихий проявляет себя равномерным помутнением среды с образованием легко разбивающегося осадка. На МПА через 16-20 ч формируются влажные, круглые колонии, имеющие ровные края и гладкую поверхность, сероватого цвета. В своём большинстве *E. coli* – подвижный микроб, но могут встречаться и неподвижные варианты, которые не образуют спор. Располагаются бактерии одиночно, капсулу обычно не образуют, исключением являются отдельные штаммы серогрупп 08, 09, 0101 [66]. Известно более 9000 серологических

вариантов эшерихий по О-, К- и Н-антигенам, но только незначительная часть из них обладает способностью вызывать рассматриваемую болезнь у животных и человека. Ведущей ролью в развитии диареи новорожденных поросят, телят, ягнят обладают энтеротоксигенные штаммы эшерихий с адгезивными антигенами К88, К99, 987Р, F41, F18, А20, Att25 различных О-серогрупп. У телят зачастую возбудители представлены энтеротоксигенными эшерихиями, продуцирующими фимбриальные адгезивные антигены К99 и А20 [110,128], в более редких случаях – эшерихии с адгезивными антигенами F41.

Кишечная палочка включает три вида антигенов: О-соматический, К-оболочечный и Н-жгутиковый. Сочетание антигенов обуславливает специфичность отдельных серологических типов кишечной палочки, их биологические свойства и своеобразие.

Возбудителю эшерихиоза свойственна полидетерминированность факторов вирулентности: эндотоксины, экзотоксины, колицин, фактор колонизации (адгезин), и другие. К настоящему времени достоверно установлено, что диарею у молодняка крупного рогатого скота с характерными признаками геморрагического гастроэнтерита могут, как и у человека, вызывать штаммы эшерихий серогруппы 0157 (0157:Н7 и 0157:Н), образующие шигоподобный вероцитотоксин [13,38,65,92,161,268].

Наиболее часто встречающиеся возбудители энзоотических вспышек эшерихиоза у телят – это бактерии серогрупп 078, 0101, 086, 015, 08, 09, 0119, 0137, 0115,041.

В настоящее время выявлена тенденция к широкому распространению энтеротоксигенных и энтероинвазивных штаммов эшерихий. Токсигенные эшерихии демонстрируют высокую антибиотикоустойчивость, что сильно ограничивает эффективность применения антибиотиков. Поэтому для обнаружения циркулирующих в хозяйствах эшерихий является недостаточным определение их по О-серогруппе. Необходимо также принимать во внимание такие факторы, как токсигенность и инвазивность

(адгезия) [13,136].

Бактерии *E. coli* способны сохраняться в почве, навозе, воде, помещениях для содержания животных достаточно продолжительное время – в течение 1-2 месяцев. Обычные дезинфицирующие средства в общепринятых концентрациях обеззараживают болезнетворных бактерий за короткое время [13].

Эшерихиоз, и прежде всего его кишечная форма, характеризуется значительным объёмом в структуре желудочно-кишечных заболеваний молодняка крупного рогатого скота. Заболевание регистрируется обычно в раннем неонатальном периоде, его возникновение и особенности прогрессирования тесно взаимосвязаны с нарушениями санитарно-гигиенического и противоэпизоотического режимов содержания стада, необычайно высоким уровнем колонизации слизистой оболочки кишечника не только вирулентными *E. coli*, но и иными условно-патогенными микроорганизмами, грибами и простейшими, а также такими факторами, как измененная реактивность и физиологическая незрелость только что родившихся телят.

Телята заболевают в основном в первые 2-7 дней жизни. Источниками возбудителя инфекции являются больные и переболевшие эшерихиозом животные, а также коровы, в желудочно-кишечном тракте которых длительное время присутствуют энтеротоксигенные эшерихии. Животные выделяют возбудитель во внешнюю среду с испражнениями, а иногда - с мочой. В поголовье молодняка во время массовых отелов возбудитель пассируется на восприимчивых, ослабленных животных, в результате чего повышается вирулентность всего стада, что инициирует новую вспышку болезни [13,66].

Передаётся возбудитель с молозивом, кормом, водой, посредством рук и одежды персонала животноводческих хозяйств, навоз, подстилку, пыль и другие предметы, в которых содержатся фекалии и моча заболевших животных. Носителями патогенных штаммов кишечной палочки могут быть

также крысы и мыши [13,66].

Наиболее часто встречающийся путь заражения - алиментарный, более редко - аэрогенный и через пуповину. Не исключается возможность внутриутробного заражения плода. В возникновении и развитии эшерихиоза существенная роль принадлежит также следующим способствующим факторам: неблагоприятные условия содержания, неполноценное кормление коров в период отелов, значительный разрыв времени между рождением телёнка и первой выпойкой молозива. Имеют место быть также предрасполагающие факторы, которые могут иметь отношение к анатомо-физиологическим особенностям новорожденного молодняка: недоразвитость коры головного мозга, отсутствие слизи на слизистой оболочке тонкого кишечника и высокая проницаемость её в первые часы и дни жизни, невысокая кислотность и слабая бактерицидность желудочного сока [13,46,115,146].

Эшерихиоз также может получить развитие в качестве вторичной инфекции на фоне поражения молодняка вирусами (рота-, корона- и др.).

Патогенность *E. coli* формируется структурой клеточной поверхности (липополисахаридно-белковым комплексом, полисахаридами и липидами наружной мембраны, адгезивными и половыми фимбриями, оболочечными антигенами), продукцией активных веществ, выделяемых в среду (экзотоксины, гемолизины), а также некоторыми особенностями метаболизма клетки, дающими им возможность сохранять жизнестойкость в меняющейся среде макроорганизма. Наиболее весомыми факторами вирулентности принято считать следующие: энтеротоксигенность – продукцию энтеротоксинов; адгезивность – синтез антигенов адгезии, посредством которых бактерии прикрепляются к эпителиальным клеткам макроорганизма и реализуют их болезнетворный потенциал; инвазивность – проникновение в кишечный эпителий с последующим внутриэпителиальным размножением или прохождением сквозь него без размножения, с генерализацией или без неё. Названные факторы вирулентности в естественных условиях оказывают

своё воздействие не изолированно, а в комплексе, в совокупности формируя особенности протекания инфекционного процесса [39].

При проникновении возбудителя в организм носителя алиментарным путем он может вызвать патологические изменения в том случае, если новорожденный молодняк не получил первой порции молозива или оно имеет неудовлетворительное качество. При проникновении инфекции в организм телёнка через кровь (септическая форма) болезнетворные микроорганизмы локализуются в крови, внутренних органах и тканях, кишечнике и регионарных лимфатических узлах; при энтеритной форме заражения – в кишечнике и брыжеечных лимфатических узлах, в более редких случаях – в паренхиматозных органах [13]. Колонизация инфекцией тонкого кишечника – неотъемлемый этап процесса развития эшерихиоза независимо от его формы [74]. Энтеропатогенные штаммы *E. coli*, проникая в просвет кишечника, интенсивно размножаются, выделяя при этом эндо- и экзотоксины, которые, в свою очередь, провоцируют развитие в кишечнике воспалительных процессов [21,232,187].

Если же болезнетворные микроорганизмы проникли в организм животного посредством слизистых оболочек органов дыхания, глотки, миндалин, через пупочный канатик, то в этом случае обычно наблюдается развитие болезни септической формы, диарея не успевает себя проявить, так как животное быстро погибает. Бактериемия имеет потенциал развития также при энтеритной форме, когда инфицирование происходит посредством энтеропатогенных и энтеротоксигенных штаммов *E. coli*. Но в этом случае болезнь протекает с меньшей остротой и начинается с диареи, поражается тонкий отдел кишечника, при этом вытесняются другие микроорганизмы – сапрофиты кишечной полости, что даёт возбудителю возможность быстро накапливаться.

Репродукция гемолитических штаммов кишечной палочки в полости кишечника предопределяет возникновение в тканях воспалительных процессов и накопление чрезмерного количества гистамина. Это, в свою

очередь, вызывает развитие токсикоза, появление отеков, нервных расстройств, могут наблюдаться коллапс и шок.

Термолабильный токсин адсорбируется на ворсинках эпителиальных клеток кишок, стимулируя аденилатциклазу. Это вызывает быстрое очаговое увеличение концентрации циклического аденозинмонофосфата. Указанный медиатор вызывает гиперсекрецию электролитов, а также диффузию воды молодыми малодифференцированными клетками эпителия слизистой оболочки в просвет тонкой кишки и угнетает реабсорбцию натрия. Жидкость переполняет просвет кишки, усиливается перистальтика и появляется диарея. Так как секреция повышена, то из организма выделяются вода и электролиты, что неизбежно приводит к ацидозу и при тяжелом течении болезни может вызвать дегидратационный шок [13,24,38,76].

Инкубационный период развития заболевания продолжается от нескольких часов до 1-2 дней, что определяется такими факторами, как: индивидуальная устойчивость телят, условия их содержания, вирулентность и доза патогенного штамма *E. coli.* В науке принято выделять три формы болезни: энтеротоксическую, септическую и энтеритную. Энтеротоксическая форма заболевания порождается энтеротоксигенными *E. coli* с адгезивными фимбриями, для неё свойственны диарея, дегидратация органов и тканей животного, токсические явления, отсутствие бактериемии и типичных патоморфологических изменений в паренхиматозных органах и кишечнике. У телят в возрасте 1-3 дня энтеротоксическая форма эшерихиоза развивается в виде моноинфекции, в более старшем возрасте – в виде смешанной или же вторичной инфекции.

Болезнь проявляется постепенно. Сначала заражённое животное демонстрирует снижение аппетита, малую подвижность, в начале заболевания у него повышается температура тела на 1-2^{0}С. С появлением диареи и по мере её нарастания температура тела животного понижается до 36^{0}С, фекалии – в виде водянистой массы, содержащей пузырьки газа и непереваренные хлопья казеина молозива, зловонного запаха. Заболевшие

телята не встают, у них стремительно развивается обезвоживание организма с последующей гибелью через 2-4 дня после появления первых симптомов заболевания.

Септическая форма болезни характеризуется септицемией либо локализацией инфекции в суставных полостях, почках, головном мозге. Отсутствие или малое количество материнских антител и витаминов в организме телят, и прежде всего витамина А, являются основным располагающим фактором генезиса болезни. Могут быть выделены генерализованная и локальная септические формы.

Энтеритная форма заболевания характеризуется диареей с более легким течением болезни, ей не свойственны признаки токсикоза. Летальность наблюдается реже, нежели при первых двух формах эшерихиоза[13,66].

Принято выделять сверхострое, острое и подострое течение болезни. Сверхострое течение заболевания наблюдается преимущественно у телят в первые 3-5 дней жизни. Температура тела телёнка может повышаться до 40-41^{0}С (кратковременно), шерсть приобретает взъерошенный вид, развиваются конъюнктивит, депрессия, инфекция проявляет себя в септической форме [13,208].

В энтеритной и энтеротоксемической формах болезнь стремительно развивается у телят в возрасте первых 3-7 дней жизни. Эти формы заболевания характеризуются болезненностью при надавливании на брюшину, депрессией, учащенным дыханием, отказом от приёма пищи. Глаза западают, выраженный вид приобретает диарея и наблюдается сильное обезвоживание организма. В первый или на второй день болезни изменяются консистенция или цвет фекалий. Первоначально кал разжижен, потом становится серо-белым, часто – пенистым, с прожилками крови, слизистым, еще позднее – водянистым. Живот вздут либо сильно подтянут, голодные ямки западают. В некоторых случаях наблюдаются судороги. С приближением смерти температура тела понижается до нормальной или ниже нормальной. Дыхание приобретает затрудненный, поверхностный, а

позже – учащенный характер. Пульс – частый и слабый. Истощенные болезнью телята погибают в состоянии глубокого коматоза. Течение болезни продолжается 2-3 дня [96,188,200].

Подострое течение болезни у молодняка крупного рогатого скота в возрасте 6-10 дней протекает в большинстве случаев в энтеритной форме, характеризуется развитием секундарной микрофлоры верхних дыхательных путей. Могут также наблюдаться артриты на грудных и тазовых конечностях. Как правило, артриты возникают только на второй или третьей неделе жизни. Сначала появляется болезненность в суставах, хромота, впоследствии – опухание отдельных суставов (чаще – коленного и скакательного). Поражение легких может возникать как осложнение и выражаться течением из носа, болезненным кашлем и учащенным, затруднённым дыханием [13,66].

При сверхостром течении инфекции патологоанатомические изменения, свойственные исследуемой болезни, не успевают получить развитие. При наружном осмотре трупа в случае острого течения болезни наблюдаются сильное истощение, анемичность слизистых оболочек. Кожа вокруг анального отверстия, хвост и задние конечностизагрязнены жидкими фекальными массами. В сычуге створоженное молозиво, в кишечнике много газов и жидкая масса, имеющая желто-белый цвет, иногда содержащая кровь. Слизистая оболочка сычуга и кишечника покрыта слизью, утолщена, особенно в пилорической части. Часто на ней присутствуют точечные кровоизлияния. Некоторые участки тонкого отдела кишечника, а иногда и весь тонкий отдел гиперемированы, причём и со стороны серозной, и со стороны слизистой оболочек [50,82,156].

Содержимое толстого отдела кишечника – темновато-белого цвета. Слизистая оболочка прямой кишки отечная, гиперемирована с точечными либо полосчатыми кровоизлияниями. Солитарные фолликулы и пейеровые бляшки – набухшие и сочные при разрезе, иногда содержат многочисленные кровоизлияния. Селезенка несколько увеличена, имеет тонкие края, под

капсулой заметны точечные кровоизлияния. В печени, почках и в мышцах погибшего животного наблюдаются дегенеративные процессы в выраженном виде. Как правило, диагностируется жировое перерождение печени. Желчный пузырь в значительной своей части наполнен и растянут. Сердечная мышца обычно дряблая, иногда имеются точечные кровоизлияния под эпикардом и на эндокарде, на клапанах – чаще пятнистые. В некоторых случаях могут иметь место отек легких или их катаральное воспаление, а также воспаление суставов и пупка [24,63,66].

Диагноз на эшерихиоз в животноводческих хозяйствах ставится на основании анализа эпизоотических данных (возраст заболевших животных, стационарность, строго энзоотический характер, массовость заболевания), клинических признаков болезни, патологоанатомических изменений и результатов бактериологического исследования патологического материала от погибших или вынужденно убитых больных животных при отсутствии их гибели, с принятием во внимание эпизоотологических данных – возраст заболевших голов скота [13,84].

Бактериологическое исследование патологического материала осуществляется согласно «Наставлению по бактериологической диагностике колибактериоза (эшерихиоза) с.-х. животных и птиц», утвержденным ГУВ МСХ СССР 12.12.1991 г. При бактериологической диагностике эшерихиоза является обязательным выделение чистой культуры инфекции, исследование её морфологических, тинкториальных, культуральных и ферментативных особенностей. Патогенные признаки эшерихий находятся посредством постановки биологической пробы на белых мышах. Осуществляется серологическая типизация культур эшерихий по О-антигену, при этом ставится цель определения их принадлежности к энзоотическим серологическим вариантам. Культуры эшерихий, имеющие патогенность для белых мышей, серологической типизации не подвергаются. О-группу эшерихий находят с помощью набора типоспецифических агглютинирующих сывороток согласно «Наставлению по применению агглютинирующих О-

коли-сывороток» [4,24].

Фиксацию эшерихий, продуцирующих адгезивные антигены, осуществляют в соответствии с «Временным наставлением по применению агглютинирующих сывороток к адгезивным антигенам *E. coli* К88, К99, 987Р, F41, А20», утвержденному ГУВ Госагропрома СССР 21.02.1989 г.

Бактериологический диагноз на эшерихиоз у млекопитающих считается установленным при условии наличия одного из следующих показателей:

- при выделении культур возбудителя из двух следующих органов: селезенки, костного или головного мозга без определения их патогенности и серологической принадлежности;

- при выделении не менее чем из двух исследованных органов культур эшерихий, патогенных для белых мышей либо относящихся к О-серогруппам, получившим признание в качестве патогенных для животных (то есть типируемых агглютинирующими О-коли-сыворотками, включенными в диагностический набор).

В РНГА создана эритроцитарная тест-система, предназначенная для определения специфических антител к веротоксинам в сыворотке крови животных, заражённых веротоксинпродуцирующими эшерихиями [103].

Кроме общепринятого метода микробиологической диагностики, могут применяться и следующие дополнительные ускоренные методы: реакция нейтрализации антител, реакция непрямой гемагглютинации, полимеразная цепная реакция, и др. [62,66].

Формирование колострального иммунитета свойственно новорожденным телятам, его напряженность определяется приёмом и резорбцией достаточного объёма молозивных иммуноглобулинов. Таким образом, основой профилактики заболеваний новорожденных телят, в том числе эшерихиоза, является своевременное (не позднее 2-х часов после рождения) скармливание телятам молозива, особенно первых двух удоев.

Крайне важный аспект профилактики эшерихиоза – это вакцинация телят препаратами, имеющими в своём составе различные антигены адгезии

и энтеротоксины. Парэнтеральная иммунизация ими коров в период беременности формирует в молозиве высокий титр антиадгезивных и антитоксических антител. Названные антитела концентрируются в молочной железе и, поступая с молозивом в организм новорожденных телят, обеспечивают им защиту от воздействия патогенных эшерихий. Они не дают энтеротоксигенным эшерихиям прикрепляться к эпителиальным клеткам слизистой оболочки тонкой кишки [52,63,72,112,132,158].

Определено, что для максимальной концентрации иммуноглобулинов в молозиве и формирования у новорожденных телят колострального иммунитета коровы должны быть вакцинированы в течение 1,5-3 месяцев, предшествующих отелу. Продолжительность колострального иммунитета при этом у телят составляет 30-45 дней [24,112,121].

С целью специфической профилактики диареи используется поливалентная гидроокисьалюминиевая формолтиомерсаловая вакцина против колибактериоза поросят, телят и ягнят в двух вариантах: формолтиомерсаловая вакцина против колибактериоза и сальмонеллеза телят, поросят, пушных зверей и птиц; поливалентная вакцина против паратифа и колибактериоза телят, поросят, пушных зверей и птиц, квасцовая концентрированная вакцина, и др.

Армавирская биофабрика наладила производство вакцины «Коли-Вак» (К99, К88, 987Р, F41, ТЛ-, ТС-анатоксины) против эшерихиоза; ООО «Агровет» (г. Москва) – вакцины ассоциированной инактивированной против колибактериоза, сальмонеллеза, клебсиеллеза и протейной инфекции молодняка рогатого скота и пушных зверей (вакцина ОКЗ) (Колычев Н.М. и соавт., 2003). Также производится и находит применение в практике вакцинации поливалентная ГОА формолвакцина против колибактериоза телят и ягнят «Коливак 99» [13,103].

С целью формирования пассивного иммунитета телята получают колипротектант ВИЭВ (взвесь убитой нагреванием культуры эшерихий одной серогруппы, очищенной от токсинов и консервированной

формалином). Российской биологической промышленностью производятся «Поливалентная антитоксическая сыворотка против паратифа и колибациллеза телят, ягнят, овец и птиц» и «Бивалентная антитоксическая сыворотка против паратифа и колибациллеза телят» [24].

При осуществлении профилактики и терапии колибактериоза применяют антиадгезивную гипериммунную сыворотку, руководствуясь наставлением. Для профилактики служит также колибактериозный бактериофаг. В арсенале антибактериальной терапии присутствуют антибиотики, нитрофурановые и сульфаниламидные препараты с учетом чувствительности к ним болезнетворных бактерий [58].

Резюмируя сказанное, может быть сделан вывод, что проблема специфической профилактики и лечения анаэробной энтеротоксемии телят в Российской Федерации продолжает оставаться крайне актуальной задачей. Тот факт, что анаэробная энтеротоксемия молодняка крупного рогатого скота чаще всего протекает вместе с эшерихиозом, дало основание для проведения научных исследований по разработке полиспецифической гипериммунной сыворотки для специфической профилактики и лечения этих инфекций.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Хронологически работа выполнялась в период с 2010 по 2017 гг. в лаборатории бактерийных инфекций ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» в соответствии с государственным заданием по НИР № 01200202602. Производственные испытания полученной сыворотки проведены на базе ряда сельскохозяйственных предприятий Республики Татарстан, отличающихся неблагополучием по желудочно-кишечным заболеваниям молодняка сельскохозяйственных животных.

2.1 Материалы и методы исследований

Процесс выполнения научно-исследовательской работы по разработке гипериммунной лечебно-профилактической сыворотки потребовал использования следующих материалов и компонентов:

1. Штаммы возбудителей:

– бактерии *E. coli*: «ПЗ-3» – синтезирующий адгезивный антиген А20, «КВ-1» – синтезирующий адгезивный антиген К99;

– бактерии *Cl. perfringens*: №28 (тип А), №392 (тип С), №213 (тип Д).

2. Подопытные животные:

- белые мыши, массой 14-16 г – 385 голов;
- кролики, массой 2,5-3,0 кг – 37 голов;
- крупный рогатый скот – 1128 голов.

3. Питательные среды: МПА, МПБ, КМПА, МППБ, тиогликолевая, мясо-печеночно-казеиновая, Эндо, Хоттингера, Минка, Сабуро, Китта-Тароцци.

4. Растворы и реактивы: 0,85% раствор хлорида натрия, pH 7,2-7,4; 1% бычий (лошадиный) сывороточный альбумин (БСА/ЛСА); 2% раствор серной кислоты по ГОСТ 4204-77; 0,01М карбонатно-бикарбонатный буфер (КББ), pH 9,0-9,6; 0,01М фосфатно-буферный раствор (ФБР), pH 7,2; 0,01М фосфатно-буферный раствор с твином (ФБР/т), pH 7,0-7,6; забуференный фосфатами физиологический раствор хлорида натрия (ЗФР) pH 7,41; субстратный раствор на основе ортофенилендиамина; 5% раствор фенола.

5. Антитела диагностические против Ig G быка и кролика, меченные пероксидазой, сухие.

6. Диагностические наборы: «О» - коли агглютинирующих сывороток; антиадгезивные коли-сыворотки К88, К99, 987Р, А20, F41 «Колиадгезин-тест»; сыворотки антитоксические клостридиум перфрингенс типов А, В, С, Д.

7. Оборудование и инструменты: стерилизатор паровой ВК-75-01; шкаф холодильный среднетемпературный ШХ-0,80М; холодильник фармацевтический "ПОЗИС" ХФ-250-3; микроскоп биологический Микромед-2; весы электронные A&D EK-600i; pH метр pH-150МИ; термостат электрический суховоздушный ТС-1/80 СПУ; стерилизатор воздушный автоматический ГП-320-ПЗ; бокс микробиологической безопасности БМБ-II «Ламинар-С»-1,2 (231-120); облучатель рециркулятор воздуха ультрафиолетовый бактерицидный "Pozis" ОРБ -2П «Pozis ETRA», считывающее устройство Titertek Multiskan (США); спектрофотометр СФ-46; камера морозильная «Свияга-106»; центрифуга лабораторная РС-6; глубинные фильтры EKS; мембранные миллипоровые фильтры; одно- и многоканальные микропипетки (НПО «Биоприбор»); посуда лабораторная стеклянная по ГОСТ 35336-82Е; планшеты полистироловые для иммуноферментного анализа (Медполимер, Санкт-Петербург); шприцы инъекционные однократного применения с иглами на 1, 2, 5, 10, 20 см3.

Клинико-эпизоотологическому обследованию подвергнуто поголовье крупного рогатого скота, принадлежащего 57 сельскохозяйственным предприятиям, расположенным в Приволжском Федеральном округе (ПФО), в том числе: в республиках Татарстан - 46, Марий Эл – 1, Чувашия - 3, Самарской обл. – 3, Кировской обл. – 2, Нижегородской обл. – 1, Ульяновской обл. – 1. Анализ эпизоотической ситуации в хозяйствах, неблагополучных по желудочно-кишечным заболеваниям крупного рогатого скота, проводили в соответствии с рекомендациями, предложенными Бакуловым И.А. и соавт. (1975).

Клинический осмотр больных животных, патологоанатомическое вскрытие павших и вынужденно убитых животных, бактериологические и серологические исследования материала осуществляли общепринятыми методами.

Бактериологическому исследованию подвергнуто 796 проб клинического и патологического материала, полученного от больного и павшего молодняка крупного рогатого скота.

Объекты для исследований - паренхиматозные органы (кусочки печени, селезенки, почки, легких), участки желудка, тонкого и толстого отделов кишечника с содержимым, брыжеечные лимфатические узлы, пробы фекалий и сыворотки крови больных животных.

Выделение и исследование биологических свойств культур *E. coli* осуществлялось в соответствии с «Методическими указаниями по бактериальной диагностике колибактериоза (эшерихиоза) животных», утвержденными ГУВ МСХ СССР 01.12.1981 г. и «Временными наставлениями по применению агглютинирующих сывороток к адгезивным антигенам эшерихий К88, К99, А20, 987Р и F41», утвержденными ГУВ Госагропрома СССР 27.02.1989 г. Серогрупповая принадлежность эшерихий выявлялась только у культур, отнесенных по морфологическим, культуральным и ферментативным свойствам к роду эшерихий, с использованием агглютинирующих О-колисывороток согласно наставлению по их применению, утвержденному Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода РФ 19.05.1998 г.

Культуры *E. coli* с типичными культурально-морфологическими и биологическими свойствами, продуцирующие адгезивные антигены (К88, К99, А20, 987Р, F41), исследованы на патогенность на белых мышах путем внутрибрюшинного заражения их в дозе 500 млн. м.к. Для оценки активности энтеротоксинов *E. coli* (ТЛ- и ТС-токсинов) использовали чувствительный и легко воспроизводимый тест отека лап белых мышей (Вартанян Ю.П. и соавт., 1978).

Диагностику анаэробной энтеротоксемии телят осуществляли в соответствии с «Методическими указаниями по лабораторной диагностике инфекционной энтеротоксемии животных и анаэробной дизентерии ягнят», утвержденными ГУВ МСХ СССР от 15.02.1984 г., по двум направлениям:

1. обнаружение токсина *Cl. perfringens* в содержимом тонкого отдела кишечника;

2. выделение культуры возбудителя из патологического материала с последующей проверкой её на токсичность.

С целью обнаружения токсинов ставились биопробы на белых мышах и кроликах по следующему алгоритму. Содержимое кишечника разводили 1:1 либо 1:2 физиологическим раствором, экстрагировали при комнатной температуре в течение часа, фильтровали через ватно-марлевый фильтр и центрифугировали в течение 20 мин при 3-5 тыс. об/мин. Полученную после центрифугирования жидкость проверяли на токсичность путем внутрибрюшинного введения двум белым мышам в дозе 0,5 см^3 или внутривенно кроликам в дозе 1,0-1,5 см^3. При наличии токсина животные погибали в течение 12 ч. При обнаружении в исследуемом материале токсина ставилась реакция нейтрализации (РН) на белых мышах, кроликах и морских свинках для определения типа основных летальных токсинов *Cl. perfringens*. Для этого в пять пробирок разливали по 1,0 см^3 фильтрата, приготовленного так, как указано выше, добавляли по 1,0 см^3 диагностических антитоксических сывороток *Cl. perfringens*, разведенных стерильным физиологическим раствором до содержания 10 АЕ в 1,0 см^3, в первую пробирку – сыворотку типа А, во вторую – типа С, в третью – типа Д, в четвертую – типа Е, в пятую пробирку 1,0 см^3 физиологического раствора (контроль). Пробирки выдерживали при 370 в течение 30 мин. Смесь из каждой пробирки вводили внутрибрюшинно по 0,5 см^3 двум белым мышам или внутрикожно по 0,2 см^3 морской свинке или кролику. Наблюдение за животными вели в течение 48 часов.

Результаты РН учитывали по гибели контрольных белых мышей или

образованию некроза у контрольных морских свинок (кроликов).

Белые мыши, получившие смесь токсина с гомологичной антитоксической сывороткой, оставались живыми, а у морских свинок и кроликов некроз не развился.

Для выделения возбудителя анаэробной энтеротоксемии – бактерии *Cl. perfringens* делались высевы из паренхиматозных органов в среды Китта-Тароцци, МПБ, МПА, а также в накопительную тиогликолевую среду. Посевы инкубировали в термостате при 37-38^{0}С в течение 20-24 ч. Для очистки культуры возбудителя от сопутствующей микрофлоры использовали метод частых пересевов на среде Китта-Тароцци. При незначительном росте посторонней микрофлоры делали высевы на глюкозно-кровяной агар и агар Цейсслера. Засеянные чашки инкубировали в анаэробных условиях при 37-38^{0}С в течение 20-24 ч.

Кровь у быков-продуцентов брали в убойном цехе мясокомбината при помощи закрытой системы, исключающей контакт крови с атмосферным воздухом. Система включала в себя полый нож длиной 40 см, диаметром 1,6 см из нержавеющей стали, соединенный герметично через силиконовый шланг и резиновую пробку с 10-литровой бутылью, которая сообщалась с атмосферным воздухом через ватный фильтр. Предварительно в бутыли наливали 100 см^3 5%-ого раствора натрия хлорида, после чего систему монтировали и автоклавировали при 1,5 атм в течение 40 минут. Взятие крови у животных производили непосредственно из сердца. После наполнения бутыли кровью примерно наполовину шланг перекрывали зажимом и нож вынимали из сердца. Бутыли с кровью в вертикальном положении оставляли при комнатной температуре на 1-2 ч до образования плотного сгустка, после чего их размещали под углом 300 в холодильную камеру при температуре 2-4^{0}С. Отстой сыворотки проводили в течение 48-72 часов. Сыворотку из бутылей отсасывали в стерильных условиях. Собранную сыворотку сначала пропускали через глубинные фильтры EKS, консервировали 5%-ым раствором фенола до концентрации его в общем

объеме сыворотки 0,5%. После этого сыворотку перекачивали в отстойник и выдерживали 2-2,5 мес при 2-4^{0}С. Затем сыворотку пропускали через мембранные миллипоровые фильтры с убывающим размером пор (от 1,2 до 0,22 мкм) и разливали в стеклянные флаконы по 100 – 200 см^3, закрывали резиновыми пробками, обкатывали алюминиевыми колпачками, этикетировали.

После этого проводили контроль сыворотки на внешний вид, стерильность, безвредность и активность.

С целью определения внешнего вида, цвета, наличия посторонних примесей, неразбивающихся хлопьев, герметичности укупорки все флаконы с сывороткой встряхивали, просматривали в проходящем свете и переворачивали пробками вниз.

Определение стерильности сыворотки проводили в соответствии ГОСТом 28085 «Препараты биологические. Методы бактериологического контроля стерильности».

Оценку безвредности гипериммунной сыворотки против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят проводили по ГОСТ 9380067-00008064 на 10 белых мышах с массой 14-16 г, которым сыворотку вводили подкожно в дозе 0,5 см^3 в область лопаток, и на 3 новорожденных телятах с массой 40-45 кг, которым сыворотку вводили внутримышечно в дозе 100 см^3. После введения сыворотки осуществляли ежедневное клиническое наблюдение за состоянием животных в течение 10 суток.

Исследование превентивных свойств экспериментальных серий гипериммунной сыворотки проводили на 150 белых мышах с массой 14-16 г, разделенных на 3 группы по 50 голов в каждой. Животным 1-ой группы вводили гипериммунную сыворотку подкожно в дозе 0,5 см^3, животным 2-ой группы вводили сыворотку крови, взятую от быков-продуцентов до начала иммунизации, также в дозе 0,5 см^3 подкожно, животные 3-ей группы служили контролем, им сыворотка не вводилась. Заражение мышей осуществляли внутрибрюшинно через 24 ч после введения сыворотки

оттитрованными летальными дозами бактерий *Cl. perfringens* (типы А, С, и Д) и *E. coli* (К99 и А20).

Для определения контаминации сыворотки бактериями *Cl. perfringens, E. coli* использовали смесь сывороток из трех флаконов, объединенную в стерильных условиях по 10 см^3 из каждого флакона в отдельную стерильную колбу. Сыворотку разводили физиологическим раствором в соотношении 1:10 и мерной пипеткой 0,5 см^3 вносили на поверхность чашек Петри с МПА и в пробирку со средой Китта-Тароцци. Посевы инкубировали в термостате при 37^{0}С в течение 24-72 часов. Сыворотку считали неконтаминированной, если на поверхности чашек Петри с МПА и в пробирках со средой Китта-Тароцци не выявлялось роста бактерий.

Исследовали сыворотку крови на содержание специфических антител к антигенам бактерий *Cl. perfringens* в ИФА, к *E.coli* в РА.

Реакцию ИФА ставили непрямым методом на 96-луночных полистироловых планшетах однократного применения по общепринятой методике (Егоров А.М. с соавт., 1991).

Планшеты с иммобилизованным антигеном трижды промывали 0,01 М раствором фосфатно-солевого буфера (ФСБ), содержащим 0,05% твина-20 (ФСБ/т). Для этого в лунки вносили отмывающий раствор, выдерживали не менее 3 минут, затем раствор удаляли и планшет осушали постукиванием о фильтрованную бумагу, сложенную в 2-3 слоя. Далее в каждую лунку вносили по 0,1 см^3 1% раствора БСА, приготовленного на ФСБ/т. Планшет закрывали крышкой и выдерживали в течение 30 минут при температуре 37^{0}С в термостате. После чего трижды промывали раствором ФСБ/т и осушали. В лунки вертикальных рядов с 1 по 6 залили по 0,1 см^3 ФСБ/т. Непосредственно перед началом исследования испытуемые сыворотки, контрольные (положительную и отрицательную) сыворотки крови разводили в пробирке на растворе ФСБ/т в 8 раз. Затем вносили в лунки (горизонтальный ряд А) рядов 1 и 2 по 0,1 см^3 испытуемой сыворотки крови иммунизированных кроликов в разведении 1:16; в 3-4 рядов – контрольной

положительной, 5-6 – контрольной отрицательной сывороток и непосредственно в лунках А, В, С, Д, Е, F, G планшета готовили двукратные разведения сывороток от 1:200 до 1:12800 с помощью многоканальной пипетки. В последний горизонтальный ряд (Н) разведения сывороток не вносили, это «контроль» конъюгата, в них заливали по 0,1 $см^3$ раствора ФСБ/т. Планшет закрывали крышкой и выдерживали при 37^0С в течение часа. По истечении времени содержимое лунок сливали, 5 раз промывали раствором ФСБ/т, осушали и заполняли каждую лунку 0,1 $см^3$ пероксидазным конъюгатом кролика в рабочем разведении, установленном ранее, приготовленном на растворе ФСБ/т. Планшет помещали на 1 час в термостат с температурой 37^0С, затем 5 раз промывали ФСБ/т и осушали. Во все лунки планшетов вносили по 0,1 $см^3$ субстратной смеси. Планшет закрывали крышкой и оставляли в защищенном от света месте при комнатной температуре (20-22^0С) на 15 минут. Не сливая содержимое, во все лунки добавляли по 0,05 $см^3$ 8М раствора серной кислоты для остановки реакции.

Результаты реакции учитывали по показаниям оптической плотности при длине волны 492 (ОП492) на считывающем устройстве Titertek Multiskan или визуально. За положительный результат принимали коэффициент специфичности (отношение оптической плотности раствора в лунке с исследуемой сывороткой к таковой в лунке с отрицательной сывороткой) равный или превышающий 2,0.

Реакцию агглютинации ставили в обычных серологических пробирках в объёме 1 $см^3$. Сыворотку разводили стерильным физиологическим раствором от 1:20 и выше. Для приготовления исходного разведения к 1,9 $см^3$ физиологического раствора добавляли 0,1 $см^3$ испытуемой сыворотки. Во все другие пробирки разливали по 0,5 $см^3$ физиологического раствора. Из исходного разведения переносили 0,5 $см^3$ смеси во вторую пробирку, из второй - в третью и т.д. Каждое разведение готовили отдельной пипеткой. Содержимое каждой пробирки смешивали. Из первой пробирки удаляли 1,0

см3, из последней - 0,5 $см^3$ смеси. В пробирки с разведённой сывороткой добавляли по 0,5 $см^3$ антигена - суточную агаровую культуру *E. coli* К 99 или А 20, имеющую концентрацию 500 млн. микробных клеток в 1 $см^3$.

Одновременно ставили контроли:

а) антиген + физиологический раствор (для исключения самоагглютинации);

б) антиген + агглютинирующая антиадгезивная сыворотка;

в) испытуемая сыворотка в разведении 1:20 без антигена (для исключения флокуляции).

Штатив с пробирками встряхивали и выдерживали 16-18 часов при температуре 37^0С и 6-8 часов при комнатной температуре. Реакцию оценивали как положительную при просветлении жидкости и образовании на дне пробирки осадка бактерий в форме раскрытого зонтика, который при встряхивании распадался на мелкие хлопья или комочки.

Реакцию считали отрицательной, если на дне пробирки образовывался дискообразный осадок, разбивающийся при встряхивании в равномерную взвесь.

В контрольных пробирках с антигеном + физиологический раствор после встряхивания наблюдалась равномерная взвесь бактерий.

Испытуемая сыворотка в разведении 1:20 без антигена не образовывала хлопья.

В контрольной пробирке с антигеном + агглютинирующая антиадгезивная сыворотка наблюдалась положительная реакция.

Производственное испытание экспериментальных серий полиспецифической гипериммунной сыворотки проводилось в хозяйствах, неблагополучных по анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Этиологическая структура желудочно-кишечных болезней молодняка крупного рогатого скота в Приволжском Федеральном округе

Исследование этиологической структуры желудочно-кишечных болезней молодняка крупного рогатого скота проводилось в 57 сельскохозяйственных предприятиях Приволжского Федерального округа, из них: в Республике Татарстан - 46, Республике Чувашия – 3, Республике Марий Эл – 1, Самарской обл. – 3, Кировской обл. – 2, Нижегородской обл. – 1, Ульяновской обл. – 1. При этом установили, что желудочно-кишечные заболевания возникают во все сезоны года. Наиболее высокая заболеваемость и гибель новорожденных телят наблюдается в зимне-весенний период, что обусловлено комплексом причин, в числе которых – нарушение ветеринарно-санитарных требований содержания и кормления животных, низкий естественный уровень специфической защиты новорожденных от воздействия не только патогенной, но и условно-патогенной микрофлоры. Факторами, способствующими возникновению, развитию и клиническому проявлению желудочно-кишечных заболеваний у новорожденных телят в обследованных хозяйствах, явились в одних случаях отсутствие сменных профилакторий, скученность, антисанитарное состояние в профилакториях, несоблюдение ветеринарно-санитарных правил при проведении отелов в родильных отделениях, а в других случаях – несвоевременное скармливание телятам молозива первых удоев. В 64,9% обследованных хозяйствах наблюдалась смешанная инфекция, вызванная одним или несколькими видами возбудителей (таблица 1). Изучение особенностей эпизоотического процесса при смешанных формах инфекционной диареи показало, что заболевание охватывает от 40 до 100% новорожденных телят, смертность среди больных животных достигает до 30-50%. Заболевание характеризуется стационарностью, затяжной и тяжелой формой течения.

При патологоанатомической экспертизе павших новорожденных телят до 30 дневного возраста установили однотипные изменения: трупы истощены, слизистые оболочки анемичны, корень хвоста и задние конечности загрязнены слипшимися фекальными массами. Слизистые оболочки сычуга, тонкого и, отчасти, толстого отделов кишечника гиперемированы, отечны, с мелкоточечными кровоизлияниями на складках. Сычуг содержит плотные творожистые сгустки (рис. 3). Лимфатические узлы брыжейки увеличены, на разрезе сочные. Отмечается застойная гиперемия печени, у некоторых – признаки дегенеративных изменений. Селезенка незначительно увеличена, с закругленными краями. Сердце переполнено кровью, имеются мелкоточечные кровоизлияния под эпикардом и на эндокарде.

Характерными признаками смешанного течения анаэробной энтеротоксемии и эшерихиоза являлись диарея, повышение температуры, учащение пульса и дыхания. Отмечались судороги, нарушение координации движений, тремор мускулатуры, шаткость походки. Кал жидкий, с примесью слизи, сгустков молока и пузырьков газа, беловато-серого цвета, с гнилостным или кислым запахом. Животные переставали принимать пищу, теряли массу тела и через 2-3 дня погибали при явлениях нарастающей слабости и общей интоксикации. У некоторых телят старшего возраста наблюдали сверхострое течение болезни, заканчивающее летальным исходом через 3-6 часов после появления первых признаков. Переболевшие телята отставали в росте и развитии. При патологоанатомическом вскрытии трупов павших телят обнаруживали геморрагическое воспаление слизистой оболочки кишечника, преимущественно тонкого отдела, обширные изъязвления в стенке кишечника (рис. 1). Содержимое кишечника темно-красного цвета с пузырьками газа. В сычуге часто обнаруживали большое количество свернувшегося молозива (рис. 2). Брыжеечные лимфатические узлы отечны, гиперемированы. Печень незначительно увеличена, дряблая, серо-желтоватого цвета с красноватыми пятнами. Желчный пузырь большой,

часто наполнен и растянут. Сердце переполнено кровью, имеются мелкоточечные кровоизлияния под эпикардом и на эндокарде. В почках наблюдаются инфильтраты (рис. 3). Селезенка незначительно увеличена (рис. 4).

При бактериологическом исследовании патологического материала от больных и павших телят изолировали различные колонии бактерий - возбудителей желудочно-кишечных заболеваний. Результаты этих исследований представлены в таблице 1. Из данных таблицы видно, что причиной желудочно-кишечных заболеваний молодняка крупного рогатого скота явились в 75,4% случаев энтеропатогенные штаммы *E.coli*, в 43,8% случаев – бактерии *Cl. perfringens*, в 42,1% случаев – бактерии рода *Streptococcus*, , в 17,5% случаев – *Proteus vulgaris*, в 7,1% случаев – *Klebsiella* и в 3,5% случаев – *Pseudomonas aeroginosa*. Установили, что из 57 обследованных хозяйств в 37 (64,9%) наблюдалась смешанная инфекция, вызванная одним или несколькими видами возбудителей.

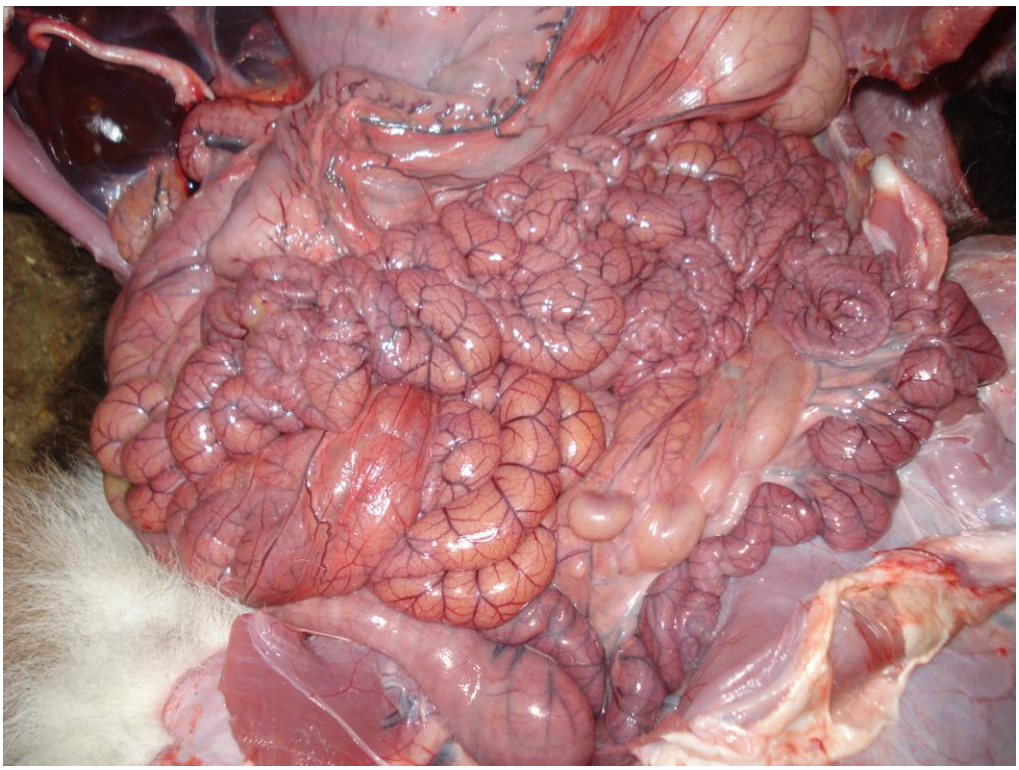

Рисунок 1 - Геморрагическое воспаление слизистой оболочки кишечника.

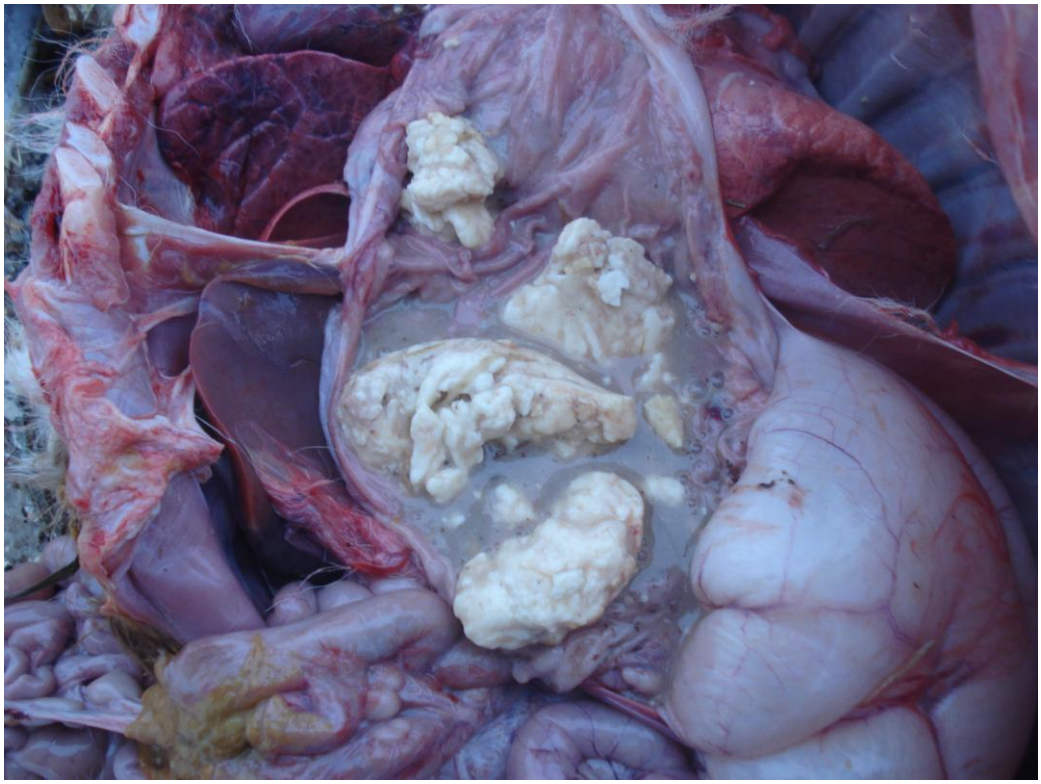

Рисунок 2 - Сычуг после вскрытия, содержит большое количество свернувшегося молозива.

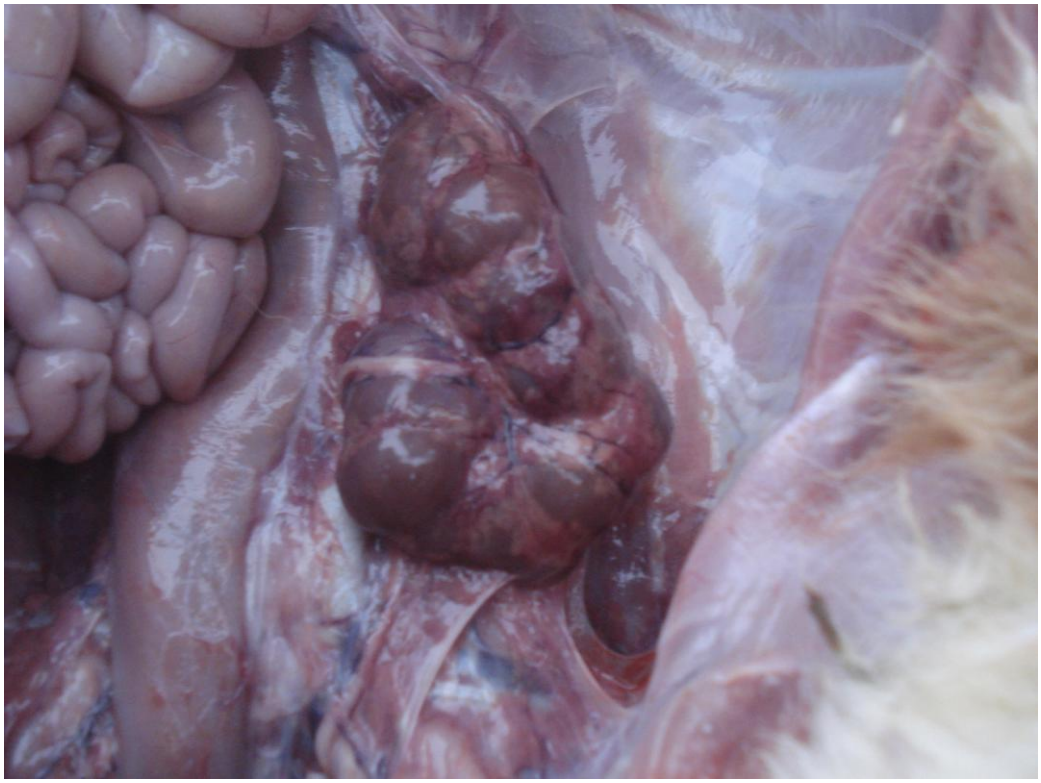

Рисунок 3 - Инфильтраты в почке.

Рисунок 4 - Незначительное увеличение селезенки.

Эшерихиозную диарею установили в 43 (75,4%) хозяйствах, анаэробную энтертоксемию – в 25 (43,8%) хозяйствах. При этом смешанную анаэробную энтеротоксемию и эшерихиозную диарею наблюдали в 18 (31,8%) хозяйствах. Анаэробная энтеротоксемия в 17 (68%) хозяйствах была вызвана бактериями *Cl. perfringens* серотипа А, в 7 (28%) хозяйствах – бактериями *Cl. perfringens* серотипа Д и в 1 (4%) хозяйстве - бактериями *Cl. perfringens* серотипа С.

Проводили изучение биологических свойств 423 изолятов *E. coli*, выделенных от больных и павших телят. Из них 304 (71,8%) изолята положительно реагировали с комплексной антиадгезивной колисывороткой, в том числе 176 (57%) изолята с антиадгезивной сывороткой А20, 119 (39,2%) изолята – с К99, 9 (2,9%) изолятов – с F41. Агглютинировались одновременно с антиадгезивными сыворотками А20 и К99 37 (12,2%) изолятов.

Таблица 1 – Результаты бактериологического исследования патологического материала от телят, больных желудочно-кишечными заболеваниями

№ п/п	Наименование хозяйства	Всего исследовано проб	Выделено возбудители инфекций					
			E .coli	*Cl. perfringens*	*Proteus vulgaris*	*Strepto-coccus*	*Pseudo-monas aerogi-nosa*	*Klebsiella*
1	2	3	4	5	6	7	8	9
Республика Татарстан								
1	ОАО ХК «Ак Барс Агро», Арский район	46		+		+		
2	ОАО «Татарстан», Арский район	14	+					
3	ООО «Корсинская МТФ», Арский район	9	+	+		+		
4	ООО «А/ф «Вамин-Арча», Арский район	12	+	+				
5	ООО «Дусым», Атнинский район	18	+					
6	СХПК «Кушар», Атнинский район	14				+		
7	ООО «Аксу-Агро», Аксубаевский район	16	+			+		
8	ООО «Чишма», Актанышский район	12	+			+		
9	ООО «А/ф «Анясе», Актанышский район	6	+	+	+			
10	ООО «Нур», Актанышский район	12	+					
11	ООО «Нур Баян», Актанышский район	16	+		+			
12	СХПК «Игенче», Балтасинский район	20	+			+		

1	2	3	4	5	6	7	8	9
13	ООО «Дуслык», Балтасинский район	12				+		
14	СХПК «Кугунур», Балтасинский район	12	+					+
15	СХПК «Уныш», Балтасинский район	18	+					
16	СХПК «Активист», Балтасинский район	14	+	+				
17	СХПК «Кама», Балтасинский район	12		+				
18	ООО «Ясная поляна», Алексеевский район	14	+					
19	ООО «Алга», Балтасинский район	28	+	+				
20	ООО «Бурнак», Балтасинский район	10			+		+	
21	ООО «Якты Юл», Балтасинский район	10	+	+		+		+
22	СХПК «Кызыл Юл», Балтасинский район	16	+					
23	ООО им. Тимирязева, Балтасинский район	28	+	+	+			
24	ЗАО «Бирюли», Высокогорский район	22	+		+		+	
25	ООО СХПК «Ватан», Высокогорский район	13		+		+		
26	СХПК «Красная Заря», Высокогорский район	6	+					
27	ООО «А/ф «Татарстан», Высокогорский район	9				+		
28	ЗАО «Авангард», Зеленодольский район	16	+	+	+			
29	ООО «Среднее Девятово» ,Лаишевский район	22	+	+				
30	ООО «Хаерби», Лаишевский район	6		+		+		
31	ООО «Йолдыз», Лаишевский район	13	+	+				

1	2	3	4	5	6	7	8	9
32	ООО «А/ф «Семиречье», Лаишевский район	25	+	+	+			
33	ООО « А/ф «Лениногорский», Лениногорский район	8		+				
34	ООО СХП «Бола», Буинский район	9	+	+				+
35	ООО «Ак Барс Дрожжаное», Дрожжановский район	24	+	+		+		
36	ООО «Цильна», Дрожжановский район	16	+					
37	ОАО «Кукморагрохимсервиз», Кукморский район	14	+		+			+
38	ООО «АгроЛак», Тюлячинский район	6	+			+		
39	ООО «А/ф «Кулон» , Новошешминский район	37	+					
40	КФХ «Сулейманов А.И.», Нурлатский район	49	+	+				
41	ООО «А/ф «Татарстан», Новошешминский район	15	+			+		
42	ООО «Рацин-Шали», Пестречинский район	28	+					
43	А/ф «Кама», Рыбно-Слободский район	10				+		
44	ООО «СХП «Юлбат», Сабинский район	15	+					
45	ООО «А/ф «Колос», Тетюшский район	18	+	+				
46	ООО «Вамин-Чистай», Чистопольский район	22	+	+	+			
Чувашская Республика								
47	СХПК «Труд», Батыревский район	12	+	+		+		

1	2	3	4	5	6	7	8	9
48	СХПК «Коминтерн», Красночетайский район	18	+			+		
49	ЗАО «Фирма Акконд-Агро», Янтиковский район	26	+			+		
Кировская область								
50	СХПК «Зерновое», Малмышский район	16		+		+		
51	СПК «Большевик», Сунский район	6				+		
Нижегородская область								
52	ООО «Колос», Бутурлинский район	24		+		+		
Республика Марий Эл								
53	СХПК «Первое Мая», Новоторъялский район	17	+			+		
Самарская область								
54	ПСХ «Фрунзе», Кошкинский район	18	+			+		
55	ЗАО «А/ф им. Ленина», Ставропольский район	29	+	+	+			
56	СПК (колхоз) им. Куйбышева, Кинельский район	24	+					
Ульяновская область								
57	СПК им. Н.К. Крупской, Мелекесский район	14				+		
	Всего/%	996	43/75,4	25/43,8	10/17,5	24/42,1	2/3,5	4/7,1

3.2 Разработка полиспецифической гипериммунной сыворотки против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят

3.2.1 Биологические свойства штаммов микроорганизмов, используемых при изготовлении гипериммунной сыворотки

В ходе выполнения работы по разработке лечебно-профилактической сыворотки использовались следующие производственные штаммы возбудителей:

– бактерии *Cl. perfringens*: №28 – тип А, №392 – тип С, №213 – тип Д;

– бактерии *E. coli*: «ПЗ-3» – синтезирующий адгезивный антиген А20, «КВ-1» – синтезирующий адгезивный антиген К99.

Штаммы бактерий *Cl. perfringens* получены в 1987 г. из Всесоюзного научно-контрольного института ветеринарных препаратов.

Штаммы бактерий *Cl. perfringens* обладают следующими свойствами. На среде Китта-Тароцци бактерии демонстрируют быстрый рост с сильным равномерным помутнением бульона и обильным газообразованием. В мазках из культуры бактерии являют собой грамположительные короткие толстые палочки с обрубленными концами без спор. На глюкозо-кровяном агаре Cl. perfringens формируют крупные, гладкие, выпуклые колонии с ровными краями, окруженные одной или двумя зонами сильного непрозрачного (неполного) гемолиза. Бактерии *Cl. perfringens* разжижают желатину, свертывают лакмусовое молоко с образованием сгустка коричневого цвета и полным просветлением молочной сыворотки, сбраживают глюкозу, лактозу, сахарозу с образованием кислоты и газа, не ферментируют манит и дульцит. Культуры токсичны, вызывают гибель белых мышей в течение 12 часов.

Энтеротоксигенный штамм «ПЗ-3» *Escherichiae coli* – возбудителя эшерихиозной диареи телят – выделен сотрудниками лаборатории бактерийных инфекций ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» из тонкого отдела кишечника павшего новорожденного телёнка. По своим морфологическим,

тинкториальным, ферментативным и антигенным свойствам штамм отнесен к сем. *Enterobacteriaceae*, роду *Escherichiae*, виду *Escherichiae coli*; имеет высокую антигенную активность в РА, группоспецифический и видоспецифический антигены, синтезирует адгезивный антиген А20, обладает инфекционной активностью на белых мышах $10^{6,0}$ м.к. $ЛД_{50}$ в лиофилизированном и $10^{5,0}$ м.к. $ЛД_{50}$ в нативном материалах. Штамм «ПЗ-3» представляет из себя мелкие, полиморфные, грамотрицательные палочки. В МПБ инспирирует диффузное помутнение, на МПА формирует слабовыпуклые полупрозрачные сероватые колонии; ферментирует глюкозу, лактозу, маннит, сорбит и некоторые другие углеводы, при этом образуются кислота и газ; образует индол; яаляется лизин- и орнитинположительным.

Штамм производственный, апробирован для производства биологических препаратов и диагностикумов.

Энтеротоксигенный штамм «КВ-1» *Escherichiae coli* – возбудителя эшерихиозной диареи – выделен сотрудниками лаборатории бактерийных инфекций ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» из тонкого отдела кишечника больного диареей новорожденного телёнка. По своим морфологическим, тинкториальным, ферментативным и антигенным свойствам штамм отнесен к сем. *Enterobacteriaceae*, роду *Escherichiae*, виду *Escherichiae coli*; имеет высокую антигенную активность в РА, группоспецифический и видоспецифический антигены, синтезирует адгезивный антиген К99, инфекционная активность на белых мышах $10^{5,0}$ м.к. $ЛД_{50}$ в нативном материале. Штамм «КВ-1» представляет из себя грамотрицательные палочки, не образующие спор, одиночно располагающиеся в мазках. В МПБ штамм «КВ-1» провоцирует интенсивное помутнение, на среде Минка формирует сочные, блестящие, выпуклые, гладкие с ровными краями колонии, круглые по форме. Ферментирует лактозу, манит и другие углеводы, не разжижает желатину, сероводород не выделяет. Штамм производственный, апробирован для производства биологических препаратов и диагностикумов.

Штаммы *Escherichiae coli* депонированы 28 ноября 2000 г. во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве (Россия, 123002, Москва, Звенигородское шоссе, 5, ВГНКИ), им присвоены регистрационные номера: штамм «ПЗ-3 *Escherichiae coli* - ВНИВИ (г. Казань)-ДЕП» и штамм *«Escherichiae coli* КВ-1-ВНИВИ (г. Казань) - ДЕП» возбудителей эшерихиозной диареи телят.

3.2.2 Получение бактериальной массы бактерий *Cl. perfringens, E. coli* и их анатоксинов для иммунизации быков-продуцентов

С целью получения клостридиозных антигенов для гипериммунизации животных производственные штаммы *Cl. perfringens* №28, №392, №213 выращивали в реакторе на мясо-печеночно-казеиновой среде с аминным коэффициентом 0,7-0,8, до накопления не менее 4 млрд./см^3 микробных клеток. Продолжительность выращивания – 8 часов, температура – 37-38^{0}С. Токсичность каждой из выращенных культур проверялась на белых мышах, на каждый штамм использовалось 10 белых мышей. Для приготовления антигена использовалась культура, содержащая не менее чем 6000 ДЛМ/см^3 для белых мышей.

С целью получения анатоксина в реактор с выращенной культурой *Cl. perfringens* добавлялся формалин до 0,7%-ной конечной концентрации, анатоксин выдерживался 8 суток при температуре 37-38^{0}С, потом вносился 6%-ый раствор гидроокиси алюминия из расчета 100 см^3 на 1 л культуры. Суспензия выдерживалась 5 суток. Для получения необходимой концентрации удаляли 50% общего объема надосадочной жидкости, устанавливали pH 7,2-7,4.

С целью получения бактериальной массы *E. coli* штамм «ПЗ-3», синтезирующий адгезивный антиген А20, выращивался на мясопептонном

агаре, штамм «КВ-1», синтезирующий адгезивный антиген К99, - на среде Минка в термостате при температуре 37 – 38^{0}С. По прошествии 24 ч сформировавшиеся колонии культур *E. coli* смывали 0,85%-ым стерильным раствором хлорида натрия, готовили суспензию с концентрацией 14-15 млрд. м.к. в 1 см^3 бактерийному или оптическому стандарту мутности ГИСК им. Тарасевича. Инактивация бактериальной массы осуществлялась формалином: формалин добавлялся во взвесь до 0,5% конечной концентрации и выдерживался в течение 5 суток в термостате при температуре 37-38^{0}С. Затем полнота инактивации бактерий *E. coli* проверялась посевом на соответствующие питательные среды.

Для получения анатоксина, каждый штамм *E. coli* засевали отдельно в реактор с бульоном Хоттингера, выращивали в течение 5 суток при температуре 37-38^{0}С. Концентрация ТЛ-, ТС-токсинов определялась в реакции диффузионной преципитации (РДП). Титр ТЛ-, ТС-токсинов в культуральной жидкости составлял не менее 1:4 - 1:8. После этого к культуре добавлялся формалин до 0,4-0,5% конечной концентрации, выдерживали при температуре 37-38^{0}С продолжительностью 10 суток, затем добавляли 6%-ную гель гидроокиси алюминия из расчета 100 см^3 на 1 л культуры, выдерживали 3 суток и для получения концентрации удаляли 50% общего объема надосадочной жидкости, устанавливали pH 7,2-7,4.

3.2.3 Изыскание оптимальной схемы гипериммунизации быков-продуцентов антигенами бактерий *Cl. perfringens* и *E. coli*

Опыты, направленные на отработку оптимальной схемы гипериммунизации быков-продуцентов для получения полиспецифической гипериммунной сыворотки, осуществляли в условиях ООО «Среднее Девятово» (Лаишевский район Республики Татарстан). Быков-продуцентов, отобранных для этой цели, предварительно подвергали карантинированию,

исследованию и необходимой обработке против инфекционных болезней, руководствуясь Инструкцией «О порядке заготовки и санитарной обработке животных, используемых для производства биопрепаратов».

С целью отработки оптимальной схемы гипериммунизации быки-продуценты живой массой 350-400 кг были объединены в 4 группы по 5 голов в каждой. Животные каждой группы получили специфические антигены введением 4-кратно с интервалом 14 суток в дозах, приведённых в таблице 2.

Таблица 2 – Схема гипериммунизации быков-продуцентов антигенами бактерий *Cl. perfringens* и *E. coli*

Этап иммуни-зации	Срок иммуни-зации, сут	Антиген	Схема иммунизации				Способ введения
			I	II	III	IV	
			Доза антигена, $см^3$				
I-ый	1	*Cl. perfringens* *E. coli*	3,0 3,0	5,0 5,0	8,0 8,0	10,0 10,0	Подкожно Подкожно
II-ой	14	*Cl. perfringens* *E. coli*	5,0 5,0	8,0 8,0	10,0 10,0	15,0 15,0	Подкожно Подкожно
III-ий	28	*Cl. perfringens* *E. coli*	8,0 8,0	10,0 10,0	15,0 15,0	20,0 20,0	Подкожно Подкожно
IV-ый	42	*Cl. perfringens* *E. coli*	10,0 10,0	15,0 15,0	20,0 20,0	25,0 25,0	Подкожно Подкожно

С целью гипериммунизации быков-продуцентов применялись инактивированные антигены *Cl. perfringens*, включающие анатоксин и соматические антигены бактерий серотипов А, С, Д в среде культивирования и инактивированные антигены *E. coli*, включающие соматические и адгезивные антигены (К99, А20) в физиологическом растворе, ТЛ-, ТС-анатоксины *E. coli* в среде культивирования (бульон Хоттингера) при таком соотношении их компонентов в двух различных иммуногенах (в 1 л

антигена):

1. Антиген *Cl. perfringens:*

- анатоксин и соматический антиген штамма №28 (тип А) – концентрацией 10-11 млрд. м.к. в 1 см^3, см^3 - 300,0 – 350,0;
- анатоксин и соматический антиген штамма №392 (тип С) – концентрацией 10-11 млрд. м.к. в 1 см^3, см^3 - 300,0 – 350,0;
- анатоксин и соматический антиген штамма №213 (тип Д) – концентрацией 10-11 млрд. м.к. в 1 см^3, см^3 - 300,0 – 350,0;

Формалин, см^3 - 4,0-5,0

2. Антиген *E. coli:*

- соматический и адгезивный антиген штамма КВ-1 (К99) – концентрацией 14-15 млрд. м.к. в 1 см^3, см^3 - 300,0 – 350,0;
- соматический и адгезивный антиген штамма ПЗ-3 (А20) – концентрацией 14-15 млрд. м.к. в 1 см^3, см^3 - 300,0 – 350,0;
- формалин, см^3 - 4,0-5,0
- ТС- и ТЛ-анатоксины штаммов *E. coli* КВ-1 и ПЗ-3 в соотношении 1:1 в культуральной среде с титрами в РДП 1:8-1:16, л. – до 1.

Антигены вводили подкожно в область шеи: с правой стороны антиген *Cl. perfringens*, с левой – антиген *E. coli*.

По прошествии 20 суток после последнего введения антигенов у быков-продуцентов брали кровь и определяли в её сыворотке степень содержания специфических антител. Титры антител к *Cl. perfringens* определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА), к *E. coli* - в реакции агглютинации (РА), к ТЛ- и ТС-токсинам *E. coli* – в реакции диффузионной преципитации. Результаты проведённых исследований приведены в таблице 3.

Из данных, приведенных в таблице 3, следует, что в наибольшей степени оптимальна четвёртая схема гипериммунизации животных, так как именно эта схема позволяет получать гипериммунную сыворотку с высоким содержанием специфических антител к антигенам *Cl. perfringens* и *E. coli* с

наименьшим расходом антигенов и, при этом, без осложнений после введения иммуногенов.

Таблица 3 – Специфическая активность гипериммунных сывороток, полученных разными схемами иммунизации быков-продуцентов антигенами *Cl. perfringens* и *E. coli* (M±m, n = 5, p≤0,05(*))

Антиген	Титр специфических антител				
	Схема 1	Схема 2	Схема 3	Схема 4	Схема 5
Cl. perfringens тип А	10240±350	14080±7010	14080±7010	22080±7010	23040±5724
Cl. perfringens тип С	8960±3505	12800±0	17920±7010	20480±5030	17920±7010
Cl. perfringens тип Д	11520±4172	11520±4172	15360±2862	20480±3505	17920±3505,4
E. coli К99	1280±219,1	2240±438,2	2880±357,7	3840±715,5	3200±0
E. coli А20	1760±657,2	3200±0	3520±876,3	4480±876,3	3840±715,5
ТС-токсин *E. coli*	9,6±1,78	19,2±3,57	22,4±4,38	25,6±4,38	25,6±4,38
ТЛ-токсин *E. coli*	8±0	16±0	19,2±3,57	19,2±3,57	22,4±4,38

При пятой схеме иммунизации у животных также определены высокие титры специфических антител, но не удалось выявить их достоверного отличия от таковых у быков-продуцентов четвертой группы. Также необходимо отметить, что у быков-продуцентов пятой группы по прошествии заключительного этапа иммунизации были отмечены осложнения через 5-10 минут после введения антигенов, а именно: учащенное дыхание, одышка, слюнотечение.

С использованием четвертой схемы гипериммунизации нами изготовлены 12 серий полиспецифической гипериммунной сыворотки против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят. Показатели специфической активности отдельных экспериментальных серий полиспецифической сыворотки приведены в таблице 4.

Таблица 4 – Показатели специфической активности экспериментальных серий полиспецифической сыворотки (M±m, n = 5)

Антиген	Метод исследования	Титр специфических антител		
		Серия №1	Серия №4	Серия №9
Cl. perfringens тип А	ИФА	23040±2862,16	20480±3505,42	23480±2802,16
Cl. perfringens тип С	ИФА	17920±3505,42	20480±3505,42	25600±0
Cl. perfringens тип Д	ИФА	20480±3505,42	17920±3505,42	23040±2862,16
E. coli К99	РА	3200±0	3520±876,35	2880±1043,07
E. coli А20	РА	38040±715,54	2880±357,77	3200±979,79
ТС-токсин *E. coli*	РДП	28,8±3,57	25,6±4,38	32,0±0
ТЛ-токсин *E. coli*	РДП	25,6±4,38	22,4±4,38	25,6±4,38

Из данных, приведенных в таблице 4, следует, что именно четвертая схема гипериммунизации даёт возможность получать от быков-продуцентов гипериммунную лечебно-профилактическую сыворотку со стабильно высоким содержанием специфических антител к антигенам бактерий *Cl. perfringens* и *E. coli*.

3.2.4 Оценка стерильности, безвредности и специфической активности гипериммунной сыворотки

Контроль качества сыворотки осуществляли согласно ГОСТ Р 52683. Каждую серию сыворотки проверяли на стерильность согласно ГОСТ 28085 «Препараты биологические. Методы бактериологического контроля стерильности». При этом установили, что сыворотка не давала роста бактерий и грибов на питательных средах, т. е. она была стерильна.

Оценку безвредности сыворотки проводили по ГОСТ 9380067-00008064. С этой целью использовали 10 белых мышей живой массой 14-16 г, которым вводили подкожно полиспецифическую сыворотку в дозе 0,5 см^3 в область лопаток и 3 телятам с живой массой 40-45 кг, которым вводили сыворотку в

четыре точки внутримышечно в дозе 100,0 см^3. После введения сыворотки осуществляли ежедневное клиническое наблюдение за состоянием животных в течение 10 суток. В период этого времени все подопытные мыши и телята оставались здоровыми, без признаков болезни и интоксикации.

Определение контаминации экспериментальных серий сыворотки бактериями *Cl. perfringens* и *E. coli* проводили путем нанесения сыворотки на поверхность чашек Петри с МПА и в пробирки со средой Китта-Тароцци. Посевы инкубировали в термостате при 37^{0}С в течение 24-72 часов. Сыворотку считали не контаминированной, если на поверхности чашек Петри с МПА и в пробирках со средой Китта-Тароцци не обнаруживали роста бактерий.

Изучение превентивных свойств экспериментальных серий гипериммунной сыворотки проводили на 150 белых мышах массой 14-16 г, разделенных на 3 группы по 50 гол в каждой. Животным 1-ой группы вводили гипериммунную сыворотку подкожно в дозе 0,5 см^3, животным 2-ой группы вводили сыворотку крови, взятую от быков-продуцентов до начала иммунизации, также в дозе 0,5 см^3 подкожно, животные 3-ей группы служили контролем, им сыворотка не вводилась. Заражение мышей осуществляли внутрибрюшинно через 24 ч после введения сыворотки оттитрованными летальными дозами бактерий *Cl. perfringens* (типы А, С, и Д) и *E. coli* (К99 и А20). Результаты этих исследований представлены в таблице 5. Данные таблицы 5 свидетельствуют о том, что гипериммунная сыворотка против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи обладает высокими превентивными свойствами по отношению к бактериям *Cl. perfringens* серотипов А, С, Д и *E. coli*, продуцирующим адгезивные антигены К99 и А20. Так, в 1-ой группе, обработанной гипериммунной сывороткой, выживаемость мышей составила после заражения патогенными культурами *E. coli* и *Cl. perfringens* 90-100%, тогда как в контрольной группе, не обработанной сывороткой, выживаемость мышей составила 0%. В группе

мышей, обработанной нативной сывороткой крови, полученной от животных до начала гипериммунизации, сохранность составила 20-30%, что объясняется наличием у животных-донноров специфических антител к бактериям *Cl. perfringens* и *E. coli* в невысоких титрах

Таблица 5 - Превентивные свойства гипериммунной сыворотки на белых мышах по отношению к бактериям *Cl. perfringens* и *E. coli*

Группа мышей	Кол-во, гол.	Доза сыворотки, $см^3$	Заражены бактериями	Результаты контроля			
				Пало		Выжило	
				к-во	%	к-во	%
Опытная. Обработана гипериммунной сывороткой.	10	0,5	*Cl. perfringens*, тип А	0	0	10	100
	10	0,5	*Cl. perfringens*, тип С	1	10	9	90
	10	0,5	*Cl. perfringens*, тип Д	1	10	9	90
	10	0,5	*E. coli* К99	0	0	10	100
	10	0,5	*E. coli* А20	1	10	9	90
Контрольная. Обработана нативной сывороткой.	10	0,5	*Cl. perfringens*, тип А	8	80	2	20
	10	0,5	*Cl. perfringens*, тип С	10	100	0	0
	10	0,5	*Cl. perfringens*, тип Д	10	100	0	0
	10	0,5	*E. coli* К99	7	70	3	30
	10	0,5	*E. coli* А20	8	80	2	20
Контрольная. Необработанная сывороткой	10	-	*Cl. perfringens*, тип А	10	100	0	0
	10	-	*Cl. perfringens*, тип С	10	100	0	0
	10	-	*Cl. perfringens*, тип Д	10	100	0	0
	10	-	*E. coli* К99	10	100	0	0
	10	-	*E. coli* А20	10	100	0	0

Таким образом, установили, что все испытуемые серии гипериммунной сыворотки стерильны, безвредны для животных, содержат специфические антитела к бактериям *Cl. perfringens* и *E. coli* в высоких титрах и обладают выраженными превентивными свойствами.

3.2.5 Определение оптимальной лечебной и профилактической дозы гипериммунной сыворотки для новорожденных телят

Опыты проводили на молочно-товарной ферме, стационарно неблагополучной по анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят.

Для определения оптимальной лечебной дозы полиспецифической гипериммунной сыворотки были сформированы 4 опытные группы и 1 контрольная группа из больных телят 3-6 дневного возраста по 10 голов в каждой. Телятам опытной группы с лечебной целью гипериммунную сыворотку вводили внутримышечно в область ягодицы однократно в различных дозах (таблица 6), телятам контрольной группы сыворотка не вводилась. Одновременно животным всех групп вводили антибиотик (гентамицин) согласно инструкции по его применению.

Данные таблицы 6 свидетельствуют о том, что полиспецифическая гипериммунная сыворотка оказывает выраженное лечебное действие при анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи. Применение сыворотки в дозах 1,5 и 2,0 см^3 на 1 кг массы теленка позволило вылечить 70 и 80% больных телят, соответственно.

Таблица 6 – Оптимальные лечебные дозы полиспецифической гипериммунной сыворотки, n=10

Группа телят	Доза сыворотки, кг/см^3	Выздоровело		Пало		Сохран-ность, %
		кол-во	%	кол-во	%	
Опытные	1,5	7	70	3	30	70
	2,0	8	80	2	20	80
	2,5	10	100	0	0	100
	3,0	10	100	0	0	100
Контрольная	-	6	60	4	40	60

В 3 и 4 группах телят, где с лечебной целью применялась сыворотка в дозах 2,5 и 3,0 см^3, соответственно, произошло выздоровление 100% больных телят, тогда как в контрольной группе, где в качестве лечебного средства применялся только антибиотик гентамицин, сохранность новорожденных телят составила лишь 60%, что на 40% ниже, чем у животных 3-ей и 4-ой опытных групп. Следует отметить, что у телят 4-ой опытной группы через 20-30 мин после введения сыворотки в дозе 3,0 см^3 на 1 кг массы тела наблюдались побочные явления в виде беспокойства животного, дрожи. Следовательно, оптимальной, экономически оправданной лечебной дозой сыворотки для новорожденных телят является 2,5 см^3 на 1 кг массы тела.

Для отработки оптимальной профилактической дозы полиспецифической гипериммунной сыворотки были сформированы 4 опытные группы и 1 контрольная из новорожденных телят массой 40-45 кг по 10 голов в каждой. Животных опытной группы (40 гол.) разделили на 4 подгруппы по 10 голов в каждой, которым в первый день после рождения вводили гипериммунную сыворотку с профилактической целью в различных дозах (таблица 7). Телятам контрольной группы сыворотка не вводилась. За животными велось клиническое наблюдение в течение 30 дней.

Таблица 7 - Оптимальные профилактические дозы полиспецифической гипериммунной сыворотки, n=10

Группа телят	Доза сыворотки, кг/см^3	Заболело		Пало		Сохран-ность, %
		кол-во	%	кол-во	%	
Опытные	1,0	8	80	2	20	80
	1,5	6	60	1	10	90
	2,0	2	20	0	0	100
	2,5	2	20	0	0	100
Контрольная	-	10	100	5	50	50

Из данных таблицы 7 следует, что полиспецифическая гипериммунная сыворотка обладает выраженными профилактическими свойствами по

отношению к бактериям *Cl. perfringens* (серотипы А, С, Д) и эшерихиям коли (К99, А20). Так, в 3-ей и 4-ой опытных группах телят, обработанных гипериммунной сывороткой соответственно в дозах 2,0 и 2,5 $см^3$ на 1 кг массы тела, заболело 20%, тогда как в контрольной (интактной) группе все телята (100%) заболели диареей, из которых 5 (50%) пали. Сохранность новорожденных телят в 3-ей и 4-ой опытных подгруппах достигала 100% против 50% в контрольной группе, т.е. применение сыворотки с профилактической целью позволило повысить сохранность новорожденных телят в 2 раза. Установлено, что наиболее оптимальной дозой гипериммунной сыворотки для профилактики анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи новорожденных телят является 2,0 $см^3$ на 1 кг массы тела. При увеличении ее дозы до 2,5 $см^3$ достоверного повышения эффективности сыворотки не наблюдалось, а при дозах 1,0 и 1,5 $см^3$ – желаемый профилактический эффект не достигался.

Таким образом, оптимальной профилактической дозой сыворотки для новорожденных телят является 2,0 $см^3$ на 1 кг массы тела.

3.2.6 Испытание лечебно-профилактической эффективности гипериммунной сыворотки против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят в производственных условиях

Производственные испытания профилактических и лечебных свойств экспериментальных серий гипериммунной сыворотки проводили в 2-х крупных комплексах по производству молока (ООО «Ак Барс Агро» Арского и КФХ Сулейманова А.И. Нурлатского районов РТ) и в 1-ой молочно-товарной ферме (ООО «Среднее Девятово» Лаишевского района РТ), неблагополучных по анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят.

Профилактические свойства гипериммунной сыворотки изучали на 349 новорожденных телятах, при этом 299 телят служили контролем (таблица 8). Сыворотку телятам вводили внутримышечно в первые сутки после рождения в дозе 2,0 $см^3$ на 1 кг массы тела. За животными ввелось клиническое наблюдение в течение 30 дней. В результате проведенных исследований было установлено, что из 349 пассивно иммунизированных животных переболели диареей 86 (24,6%), пало 18 (5,2%) телят. В контрольной группе, не подвергавшихся профилактической обработке полиспецифической гипериммунной сывороткой, заболели диареей 245 (81,9%) телят, пало 54, сохранность телят в контрольной группе составила 81,9%.

Лечебные свойства сыворотки изучали на 238 больных телятах 2-10-дневного возраста (таблица 9). С лечебной целью гипериммунную сыворотку вводили внутримышечно в дозе 2,5 $см^3$ на 1 кг массы тела. При тяжелом течении болезни сыворотку вводили повторно через 1-3 дня в тех же дозах. Суточную лечебную дозу сыворотки вводили в 2 приема с интервалом 6 часов. Кроме сыворотки для лечения телят как опытной, так и контрольной групп применяли антибиотики (гентамицин, тетрациклин) в лечебных дозах. Результаты испытания сыворотки в ООО «Среднее Девятово» Лаишевского, ООО «Ак Барс Агро» Арского и КФХ Сулейманова А.И. Нурлатского районов РТ показали, что из 238 животных, подвергнутых лечению гипериммунной сывороткой, клиническое выздоровление наступило у 223 (93,7%) телят, 15 (6,3%) телят погибли. В то время как из 196 животных контрольной подгруппы, лечение которых проводилось антибиотиками, наблюдали выздоровление лишь у 156 (79,6%) телят, пало 40 (20,4%) телят.

Таким образом, гипериммунная сыворотка против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят обладает выраженными лечебными и профилактическими свойствами. Так, например, при применении ее в стационарно неблагополучных хозяйствах по желудочно-

кишечным болезням с профилактической целью повышается сохранность новорожденных телят на 12,9%, с лечебной целью – на 14,1%.

Положительные результаты производственного испытания полиспецифической гипериммунной сыворотки позволили рекомендовать ее к внедрению в ветеринарную практику с лечебно-профилактической целью при анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят.

Таблица 8 – Показатели эффективности применения сыворотки гипериммунной против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят с профилактической целью в производственных условиях

Хозяйство	Опытная группа телят							Контрольная группа телят						
	кол-во	заболело		не заболело		пало		кол-во	заболело		не заболело		пало	
		кол-во	%	кол-во	%	кол-во	%		кол-во	%	кол-во	%	кол-во	%
ООО «Среднее Девятово»	85	22	25,9	63	74,1	2	2,35	63	51	81,0	12	19,0	9	14,3
ООО «Ак Барс Агро»	128	41	32,0	87	68,0	9	7,03	139	116	83,5	23	16,5	26	18,3
КФХ «Сулейманов А.И.»	136	23	16,9	113	83,1	7	5,1	97	78	80,4	19	19,6	19	19,6
Всего	349	86	24,6	263	75,4	18	5,2	299	245	81,9	54	18,1	54	18,1

Таблица 9 – Показатели эффективности применения сыворотки гипериммунной против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят с лечебной целью в производственных условиях

Наименование хозяйства	Опытная группа					Контрольная группа				
	кол-во телят	Выздоровело		пало		кол-во телят	выздоровело		пало	
		кол-во	%	кол-во	%		кол-во	%	кол-во	%
ООО «Среднее Девятово»	47	45	95,7	2	4,3	25	22	88,0	3	12,0
ООО «Ак Барс Агро»	68	62	91,2	6	8,8	67	51	76,2	16	23,8
КФХ «Сулейманов А.И.»	123	116	94,3	7	5,7	104	83	79,8	21	20,2
Всего	238	223	93,7	15	6,3	196	156	79,6	40	20,4

За период с 2010 по 2017 гг. в лаборатории по изучению болезней молодняка изготовлено 215 л гипериммунной сыворотки против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят. Лечебно-профилактическая эффективность сыворотки подтверждена испытанием ее в 3 хозяйствах Республики Татарстан, стационарно-неблагополучных по инфекционным желудочно-кишечным заболеваниям новорожденных телят. Применение полиспецифической сыворотки в комплексе с ветеринарно-санитарными мероприятиями обеспечивало сохранность новорожденных телят в этих хозяйствах до 91,2 - 95,7%.

3.2.7 Экономическая эффективность применения гипериммунной лечебно-профилактической сыворотки при анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят

Экономическую эффективность от применения гипериммунной лечебно-профилактической сыворотки определяли по официальной методике, утвержденной Департаментом ветеринарии МСХ РФ 21 февраля 1997 г., а также с использованием методики, приведенной в учебнике для вузов «Организация и экономика ветеринарного дела» (Никитин И.Н. и соавт., 1999).

Экономическую эффективность применения гипериммунной сыворотки с профилактической целью определяли опытным путем, сравнивая показатели заболеваемости и сохранности телят опытной группы, которым в первые часы после рождения внутримышечно вводили сыворотку в дозе 2,0 $см^3$ на 1 кг массы тела, с аналогичными показателями контрольной группы телят, которым сыворотка не вводилась. С этой целью вначале расчетным путем была определена стоимость одного новорожденного теленка (Ст), стоимость одного теленка в трехдневном возрасте (Стзд) и количество дополнительно сохраненных телят (М). Стоимость новорожденного теленка в обследованных хозяйствах составила 9348 руб, трехдневного – 9405 руб. В

наших опытах сохранность в контрольной группе составила 81,9%, в опытной – 94,8%, т.е. поголовье, предотвращенное от падежа при использовании гипериммунной сыворотки, составило 13 голов в расчете на 100 голов.

Экономический эффект от применения сыворотки гипериммунной против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят с профилактической целью установили по формуле:

$$\mathbf{П_У = C}\text{тзд}\ \mathbf{x\ M},\ \text{где}$$

$П_У$ – предотвращенный ущерб, руб;

Стзд - стоимость одного новорожденного теленка в трехдневном возрасте, руб;

М – количество дополнительно сохраненных телят.

$$\mathbf{Э_В = П_У – З_В;\ Э_Р = Э_В : З_В},\ \text{где}$$

$Э_В$ – экономический эффект, руб;

$З_В$ – затраты на ветеринарные мероприятия, руб;

$Э_Р$ - экономическая эффективность ветеринарных мероприятий на 1 рубль затрат;

$П_У$ = 9405 х 13 = 122265 руб.

$Э_В$ = 122265 – 9323,2 = 112941,8 руб.

$Э_Р$ = 122265 : 9323,2 = 13,1 руб.

Основные исходные данные при определении экономической эффективности применения гипериммунной сыворотки с профилактической целью представлены в таблице 10. Данные таблицы показывают, что использование гипериммунной сыворотки с профилактической целью в расчете на 100 голов позволяет предотвратить потери продукции на сумму 122265 руб., при этом получить экономический эффект 11294 руб. за счет предотвращения потерь от падежа животных. Экономический эффект при этом составляет 13,1 руб. на 1 руб. затрат.

Таблица 10 – Показатели экономической эффективности применения гипериммунной сыворотки с профилактической целью

Показатель	В расчете на 100 гол.
Рыночная цена 1 л сыворотки (с учетом НДС), руб.	1500
Стоимость израсходованной сыворотки на 100 голов, руб.	9000
Оплата труда ветработников за 1 чел.-час, руб.	55,8
Затраты на оплату труда, руб.	223,2
Дополнительные затраты на ветеринарные мероприятия, руб.	100
Всего затрат на ветеринарные мероприятия, руб.	9323,2
Себестоимость сыворотки на 1 голову, руб.	90
Предотвращенный ущерб, тыс. руб.	122,265
Экономический эффект, тыс. руб.	112,941
Экономический эффект на 1 руб. затрат, руб.	13,1

Экономическую эффективность применения гипериммунной сыворотки с лечебной целью определяли опытным путем, сравнивая показатели сохранности телят в опытной и контрольной группах. При этом в опытной группе для лечения телят применяли внутримышечно гипериммунную сыворотку в дозе 2,5 см^3 на 1 кг массы тела в сочетании с антибиотиком (гентамицином), а в контрольной – только гентамицин в той же дозе, что и животным опытной группы.

Экономический эффект от применения сыворотки с лечебной целью установили по тем же формулам, что и при расчетах по определению экономического эффекта от применения сыворотки с профилактической целью.

Основные исходные данные при определении экономической эффективности применения гипериммунной сыворотки с лечебной целью представлены в таблице 11.

Таблица 11 – Показатели экономической эффективности применения гипериммунной сыворотки с лечебной целью

Показатели	В расчете на 100 гол.
Рыночная цена 1 л сыворотки (с учетом НДС), руб.	1500
Стоимость израсходованной сыворотки на 100 голов, руб.	13448
Оплата труда ветработников за 1 чел.-час, руб.	55,8
Затраты на оплату труда, руб.	223,2
Дополнительные затраты на ветеринарные мероприятия, руб.	3000
Всего затрат на ветеринарные мероприятия, руб.	16448
Себестоимость сыворотки на 1 голову, руб.	131,25
Предотвращенный ущерб, тыс. руб.	336,699
Экономический эффект, тыс. руб.	320,251
Экономический эффект на 1 руб. затрат, руб.	20,47

$П_У$ = 9405 х 35,8 = 336699 руб.

$Э_В$ = 336699 – 16448 = 320251 руб.

$Э_Р$ = 336699 : 16448 = 20,47 руб.

Данные таблицы 11 показывают, что использование гипериммунной сыворотки с лечебной целью в расчете на 100 голов позволяет предотвратить потери продукции на сумму 336699 руб., при этом получить экономический эффект 320251 руб. за счет предотвращения потерь от падежа животных. Экономический эффект при этом составляет 20,47 руб. на 1 руб. затрат.

Таким образом, использование гипериммунной сыворотки против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи с лечебно-

профилактической целью в стационарно неблагополучных хозяйствах позволяет добиваться высокой экономической эффективности за счет снижения заболеваемости и повышения сохранности новорожденных телят.

На основании результатов проведенных исследований для внедрения в ветеринарную практику предложена «Полиспецифическая гипериммунная сыворотка против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят» (Патент РФ на изобретение № 2523389 от 23.05.2014 г.). Разработаны нормативные документы, регламентирующие изготовление, контроль и применение данного биопрепарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Повышение уровня выхода молодняка сельскохозяйственных животных, обеспечение его благополучного роста и развития это не только насущная необходимость для мобилизации резервов производства, но и решающий фактор эффективного ведения животноводства, позволяющий удовлетворить потребности людей в продуктах питания, промышленности – в сырье.

По данным отечественных исследователей ежегодно на молочно-товарных фермах Российской Федерации заболевают 70-90 % новорожденных телят и при этом около трети заболевших гибнут в первые дни жизни вследствие острых гастроэнтеритов с явлениями диареи [22,24,38,81,102,114]. Это подтверждается и результатами наших исследований. Изучение особенностей эпизоотического процесса при смешанных формах инфекционной диареи показало, что заболевание охватывает от 40 до 100% новорожденных телят, смертность среди больных животных достигает до 30-50%. Заболевание характеризуется стационарностью, затяжной и тяжелой формой течения.

В последние годы отмечается возрастающее значение бактерий *Clostridium perfringens* и их ассоциаций с другими видами энтеробактерий, в частности с *E.coli* [89,107,148,172,242].

Нами изучена этиологическая структура желудочно-кишечных заболеваний молодняка крупного рогатого скота в 57 сельскохозяйственных предприятиях, расположенных в Приволжском Федеральном округе. Установлено, что причиной их в 75,4% случаев являются энтеропатогенные штаммы *E.coli*, в 43,8% случаев – бактерии *Cl. perfringens*, в 42,1% случаев – бактерии рода *Streptococcus*, в 17,5% случаев – *Proteus vulgaris*, в 7,1% случаев – *Klebsiella* и в 3,5% случаев – *Pseudomonas aeroginosa*.

Эшерихиозная диарея диагностирована в 43 (75,4%) хозяйствах, анаэробная энтертоксемия – в 25 (43,8%) хозяйствах. При этом смешанную анаэробную энтеротоксемию и эшерихиозную диарею наблюдали в 18

(31,8%) хозяйствах. Анаэробная энтеротоксемия в 17 (68%) хозяйствах была вызвана бактериями *Cl. perfringens* серотипа А, в 7 (28%) хозяйствах – бактериями *Cl. perfringens* серотипа Д и в 1 (4%) хозяйстве - бактериями *Cl. perfringens* серотипа С.

Следовательно, анаэробная энтеротоксемия и эшерихиозня диарея телят имеют широкое распространение в Приволжском Федеральном округе и для успешной борьбы с ними необходимо иметь эффективные лечебно-профилактические препараты, в частности ассоциированную вакцину и гипериммунную лечебно-профилактическую сыворотку.

Специфическая защита новорожденных телят в первые дни жизни осуществляется путем активной иммунизации матерей с тем, чтобы стмулировать у них образование антител и обеспечить передачу их с молозивом потомству.

В ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» разработана ассоциированная вакцина против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят на основе инактивированных антигенов бактерий *Cl. perfringens* (серотипы А, С, Д) и *E.coli*, синтезирующих адгезивные антигены К99, А20, а также их ТЛ- и ТС-анатоксинов (Патент РФ № 2428202). Вакцина предназначена для иммунизации глубокостельных коров и нетелей с целью создания колострального иммунитета у потомства через материнское молозиво, а также для иммунизации молодняка 18-20-и дневного возраста, полученных от иммунизированных маток. Специфические антитела, поступающие в организм телят с молозивом матери, обеспечивают защиту их от заболеваний до тех пор, пока у них не выработаются собственные механизмы иммунитета. Однако, некоторые животные после рождения не получают в необходимом количестве эту естественную защиту, что связано с недостаточным поступлением антител с молозивом матери, несвоевременным и недостаточным получением молозива или нарушением механизма абсорбции иммуноглобулинов молозива кишечником новорожденных. В этой связи разработка полиспецифической лечебно-профилактической гипериммунной

сыворотки против бактерий *Cl. perfringens* и *E. coli* является весьма актуальной. Изготавливаемые биопредприятиями РФ гипериммунные сыворотки для специфической профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний телят не содержат специфических антител против *Cl. perfringens*, что значительно снижает их лечебно-профилактическую эффективность.

Поэтому разработка гипериммунной сыворотки против анаэробной энтеротоксемии телят является весьма актуальной. В этой связи нами разработана сыворотка гипериммунная против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят. Гипериммунную сыворотку получали на быках-продуцентах живой массой 350-400 кг. На первом этапе нами изыскана оптимальная схема гипериммунизации животных-продуцентов антигенами бактерий *Cl. perfringens* и *E.coli*, так как большое влияние на уровень антителогенеза оказывает концентрация, доза антигена и схема иммунизации. При этом руководствовались общепринятыми положениями, касающимися методов введения антигенов, количества инъекций и интервалов между ними.

Для гипериммунизации быков-продуцентов использовали инактивированные антигены *Cl. perfringens* серотипов А, С, Д в культуральной среде и антигены *E. coli*, содержащие соматические, адгезивные (К99, А20) антигены и ТЛ-, ТС-анатоксины. Антигены вводили подкожно с интервалом 14 дней в нарастающих дозах в область шеи: с правой стороны антиген *Cl. perfringens*, с левой – антиген *E. coli*.

Испытаны 4 схемы гипериммунизации быков-продуцентов. При этом оптимальной признана четвертая схема, при которой антигены вводятся четырехкратно с интервалом 14 дней в дозах: в 1 раз – вирусный антиген вводится внутривенно в дозе 90, бактериальный - подкожно в дозе 10 см^3, во 2 раз – 120 и 20 см^3; в 3 раз – 135 и 24 см^3 и в 4 раз – 135 и 24 см^3 соответственно.

Эта схема позволяет получать полиспецифическую гипериммунную сыворотку с титрами специфических антител к антигенам *Cl. perfringens* типа А - 1:22080±7010, типа С – 1:20480±3505, тип Д – 1: 20480±3505 в ИФА; к антигенам *E. coli* К99 – 1:3840±715,5, А20 - 4480±876,3 в РА; к ТС-токсину *E. coli* – 1:25,6±4,38, к ТЛ – токсину *E. coli* – 1:19,2±3,57 в РДП.

Проводили определение оптимальной лечебной и профилактической доз гипериммунной сыворотки для новорожденных телят. Опыты проводили на молочно-товарной ферме, стационарно неблагополучной по анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят. С этой целью были сформированы 8 опытных и 2 контрольные группы новорожденных телят по 10 голов в каждой. Телятам опытной группы с лечебной и профилактической целью гипериммунную сыворотку вводили внутримышечно в область ягодицы в различных дозах, телятам контрольной группы сыворотка не вводилась.

Установлено, что полиспецифическая гипериммунная сыворотка оказывает выраженное лечебное действие при анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи. Применение сыворотки в дозах 1,5 и 2,0 см^3 на 1 кг массы теленка позволило вылечить 70 и 80% больных телят, соответственно.

При применении сыворотки в дозах 2,5 и 3,0 см^3, выздоровление больных телят составило 100%, тогда как в контрольной группе, где в качестве лечебного средства применялся только антибиотик гентамицин, сохранность составила лишь 60%. Следовательно, оптимальной, экономически оправданной лечебной дозой сыворотки для новорожденных телят признана 2,5 см^3 на 1 кг массы тела.

Установлено, что полиспецифическая гипериммунная сыворотка обладает выраженными профилактическими свойствами по отношению к бактериям *Cl. perfringens* (серотипы А, С, Д) и эшерихиям коли (К99, А20). Так, в группах телят, обработанных гипериммунной сывороткой соответственно в дозах 2,0 и 2,5 см^3 на 1 кг массы тела, заболело 20%, тогда

как в контрольной (интактной) группе все телята (100%) заболели диареей, из которых 5 (50%) пали. Сохранность новорожденных телят в 3-ей и 4-ой опытных подгруппах достигала 100% против 50% в контрольной группе, т.е. применение сыворотки с профилактической целью позволило повысить сохранность новорожденных телят в 2 раза. Установлено, что наиболее оптимальной дозой гипериммунной сыворотки для профилактики анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи новорожденных телят является 2,0 см^3 на 1 кг массы тела. При увеличении ее дозы до 2,5 см^3 достоверного повышения эффективности сыворотки не наблюдалось, а при дозах 1,0 и 1,5 см^3 – желаемый профилактический эффект не достигался.

Таким образом, оптимальной профилактической дозой сыворотки для новорожденных телят является 2,0 см^3 на 1 кг массы тела.

Одним из основных параметров оценки гипериммунных сывороток при инфекционных заболеваниях является их лечебно-профилактическая активность [81,101,131,133]. С этой целью проводили оценку специфической активности гипериммунной лечебно-профилактической сыворотки в производственных условиях на базе в 2-х крупных комплексов по производству молока (ООО «Ак Барс Агро» Арского и КФХ Сулейманова А.И. Нурлатского районов РТ) и 1-ой молочно-товарной ферме (ООО «Среднее Девятово» Лаишевского района РТ), неблагополучных по анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят.

Профилактические свойства гипериммунной сыворотки изучали на 349 новорожденных телятах, при этом 299 телят служили контролем. Сыворотку телятам вводили внутримышечно в первые сутки после рождения в дозе 2,0 см^3 на 1 кг массы тела. За животными ввелось клиническое наблюдение в течение 30 дней. В результате исследований установили, что из 349 пассивно иммунизированных животных переболели диареей 86 (24,6%), пало 18 (5,2%) телят. В контрольной группе, не подвергавшихся профилактической обработке полиспецифической гипериммунной

сывороткой, заболели диареей 245 (81,9%) телят, пало 54, сохранность телят в контрольной группе составила 81,9%.

Лечебные свойства сыворотки изучали на 238 больных телятах 2-10-дневного возраста. С лечебной целью гипериммунную сыворотку вводили внутримышечно в дозе 2,5 $см^3$ на 1 кг массы тела. При тяжелом течении болезни сыворотку вводили повторно через 1-3 дня в тех же дозах. Суточную лечебную дозу сыворотки вводили в 2 приема с интервалом 6 часов. Кроме сыворотки для лечения телят как опытной, так и контрольной групп применяли антибиотики (гентамицин, тетрациклин) в лечебных дозах. Результаты испытания сыворотки в ООО «Среднее Девятово» Лаишевского, ООО «Ак Барс Агро» Арского и КФХ Сулейманова А.И. Нурлатского районов РТ показали, что из 238 животных, подвергнутых лечению гипериммунной сывороткой, клиническое выздоровление наступило у 223 (93,7%) телят, 15 (6,3%) телят погибли. В то время как из 196 животных контрольной подгруппы, лечение которых проводилось антибиотиками, наблюдали выздоровление лишь у 156 (79,6%) телят, пало 40 (20,4%) телят.

Таким образом, гипериммунная сыворотка против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят обладает выраженными лечебными и профилактическими свойствами. При применении ее в стационарно неблагополучных хозяйствах с профилактической целью повышается сохранность новорожденных телят на 12,9%, с лечебной целью – на 14,1%.

Положительные результаты производственного испытания полиспецифической гипериммунной сыворотки позволяют рекомендовать ее к внедрению в ветеринарную практику с лечебно-профилактической целью при анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят.

За период с 2010 по 2017 гг. в лаборатории по изучению болезней молодняка изготовлено 215 л гипериммунной сыворотки против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят. Лечебно-профилактическая эффективность сыворотки подтверждена испытанием ее в 3 хозяйствах

Республики Татарстан, стационарно-неблагополучных по инфекционным диареям новорожденных телят. Применение полиспецифической сыворотки в комплексе с ветеринарно-санитарными мероприятиями обеспечивало сохранность новорожденных телят в этих хозяйствах до 91,2 - 95,7%.

На основании результатов проведенных исследований были получены следующие результаты:

1. Установлено, что основными бактериальными агентами, вызывающими диарею новорожденных телят в Приволжском Федеральном округе, являются в 75,4% случаев энтеропатогенные штаммы *E.coli*, в 43,8% случаев – *Cl. perfringens*, в 42,1% случаев – бактерии рода *Streptococcus*, в 17,5% случаев – *Proteus vulgaris*, в 7,1% случаев – *Klebsiella* и в 3,5% случаев – *Pseudomonas aeroginosa*. Эшерихиозная диарея диагностирована в 75,4% хозяйствах, анаэробная энтертоксемия – в 43,8%. При этом смешанную анаэробную энтеротоксемию и эшерихиозную диарею наблюдали в 18 (31,8%) хозяйствах. Анаэробная энтеротоксемия в 17 (68%) хозяйствах была вызвана бактериями *Cl. perfringens* серотипа А, в 7 (28%) хозяйствах – бактериями *Cl. perfringens* серотипа Д и в 1 (4%) хозяйстве - бактериями *Cl. perfringens* серотипа С.

2. На основании результатов изучения этиологии желудочно-кишечных заболеваний телят научно обоснована целесообразность и перспективность разработки и внедрения в ветеринарную практику сыворотки гипериммунной против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи, предназначенной для специфической профилактики и иммунотерапии смешанных форм желудочно-кишечных болезней молодняка крупного рогатого скота.

3. Впервые в РФ разработан технологический регламент производства, контроля и применения «Сыворотки гипериммунной против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят».

4. Изыскана оптимальная схема гипериммунизации быков-продуцентов антигенами бактерий *Cl. perfringens* и *E.coli*, позволяющая получение

гипериммунной сыворотки с титрами специфических антител к бактериям *Cl. perfringens* типа А - 1:22080±7010, типа С – 1:20480±3505, тип Д – 1: 20480±3505 в ИФА; к антигенам *E. coli* К99 – 1:3840±715,5, А20 - 4480±876,3 в РА; к ТС-токсину *E. coli* – 1:25,6±4,38, к ТЛ – токсину *E. coli* – 1:19,2±3,57 в РДП.

5. Применение гипериммунной сыворотки с профилактической целью в стационарно неблагополучных хозяйствах по желудочно-кишечным болезням молодняка крупного рогатого скота обеспечивает сохранность животных в опытных группах до 94,8% против 81,9% в контрольной группе. Лечебная эффективность сыворотки составила 93,7%, тогда как в контрольной группе, где применялось только симптоматическое лечение, этот показатель не превышал 79,6%.

6. Экономическая эффективность применения полиспецифической гипериммунной сыворотки на 1 рубль затрат составляет при профилактической обработке 13,1 руб, а при лечебной – 20,4 рублей.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПРОИЗВОДСТВУ

На основании результатов проведенных исследований для внедрения в ветеринарную практику предложена «Сыворотка гипериммунная против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят» (Патент РФ № 2523389 от 23.05.2014 г). Применение ее в стационарно неблагополучных пунктах позволяет значительно снизить заболеваемость и гибель молодняка крупного рогатого скота, тем самым повысить их сохранность.

Разработаны нормативные документы, регламентирующие изготовление, контроль и применение данного биопрепарата, в частности:

– Технические условия на «Сыворотку гипериммунную против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят»», ТУ 9384-003-00492374-2015 (утверждены директором ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», согласованы с ГУВ КМ РТ 12.02.2015 г.);

– Инструкция по применению «Сыворотки гипериммунной против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят» (утверждена директором ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», согласована с ГУВ КМ РТ 12.02.2015 г.);

– Инструкция по изготовлению и контролю «Сыворотки гипериммунной против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят» (утверждена директором ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» 03.02.2015 г.).

СПИСОК СОКРАЩЕННЫХ ТЕРМИНОВ

А/ф - агрофирма

АГ-АТ – антиген-антитело

БАСК – бактерицидная активность сыворотки крови

ГОА – гидрат окиси алюминия

ГУВ – Главное управление ветеринарии

ЕД – единица действия

ИФА – иммуноферментный анализ

КББ – карбонатно-бикарбонатный буфер

КРС – крупный рогатый скот

м.к. – микробные клетки

МПА – мясо-пептонный агар

МПБ – мясо-пептонный бульон

МППБ – мясо-пептонный печеночный бульон

$ОП_{492}$ - оптическая плотность

РА – реакция агглютинации

РБ – Республика Башкортостан

РГА – реакция гемагглютинации

РДП – реакция диффузной преципитации

РМЭ – Республика Марий Эл

РН – реакция нейтрализации

РТ – Республика Татарстан

РФ – Российская Федерация

ТЛ – термолабильный

ТС – термостабильный

ФБР – фосфатно-буферный раствор

ЧР – Чувашская Республика

шт. – штамм

Cl. perfringens – Clostridium perfringens

E. coli – Escherichia coli

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абукова, В.В. Выявление потенциально-патогенных штаммов эшерихий в клиническом материале. Люди, с.-х. животные и объекты внешней среды / В.В. Абукова, М.И. Габрилович, И.М. Габрилович и др. // Материалы науч.-практ. конф. Кабард.-Балк. гос. с.-х. акад. – Нальчик, 1995. – Ч. 1. – С. 175-176.

2. Азарян, С.Л. Изучение реактогенности и иммуногенности противопастереллезных вакцин с различными адъювантами на лабораторных животных / С.Л. Азарян // Диагностика, профилактика и меры борьбы с инфек. и инваз. болезнями с.-х. животных и птиц на Сев. Кавказе. – Сб. науч. тр. – Новочеркасск. – 1990. – С. 64-69.

3. Алешкевич, В.Н. Совершенствование специфической профилактики анаэробной энтеротоксемии телят/ В.Н. Алешкевич // Автореф. дис. канд. вет. наук. Витебск, 1992. -19с.

4. Алиев ,А.А. Справочник ветеринарного фельдшера / А.А. Алиев, Н.Л. Андреева, Н.Б. Баженова и др. – СПб.: Изд-во «Лань», 2007. – 896 с.

5. Андреев, Г.М. Справочник ветеринарного врача / Г.М. Андреев, В.У. Давыдов, В.С. Злобин и др. – СПб.: Изд-во «Лань», 2000. – 896 с.

6. Андросик, Н.Н. Этиологическая роль энтеротоксигенных штаммов *Clostridium perfringens* типа А в заболевании телят энтеротоксемией / Н.Н. Андросик, К.В. Москалев // Известия Академии аграрных наук Республики Беларусия. - 1999.- №2.- С. 73-76.

7. Антонов, Б.И. Ветеринарные лаборатории на страже здоровья животных / Б.И. Антонов; О.А. Тугаринов; К.Ф. Киржаев; Л.Л. Погребняк; С.В. Николаев; С.С. Яковлев; Н.Н. Осипов; Е.А. Хабарова; С.Г. Африкантов // Специфич. профилактика и диагностика инфекц. болезней животных. – 1986. – С. 87-90

8. Апатенко, В.М. Смешанные инфекции сельскохозяйственных животных / В.М. Апатенко // Урожай. – Киев, 1990. – С. 176.

9. Асонов, Н.Р. Микробиология / Н.Р. Асонов // – М.: Колос, 1997. – 352 с.

10. Ахметсадыков, Н.Н. Адгезивные антигены эшерихий и их морфологические особенности / Н.Н. Ахметсадыков, К.К. Муканов // Актуал. пробл. патологии животных и человека. – Барнаул, 1996. – С. 16-18.

11. Бакулин, И.Н. Энтеропатогенный фактор *Cl. perfringens* типа А (выделение штаммов, получение энтеротоксина, разработка методов его обнаружения) / И.Н. Бакулин // Автореф. дис. …кандид. биол. наук. – М., – 1982. – 21 с.

12. Бакулов, И.А. Рекомендации по методике эпизоотического исследования / И.А. Бакулов, Г.Г. Юрков, А.П. Песковацков; под. ред. И.А.Бакулова. – Покров. – 1975. – С. 75.

13. Бессарабов, Б.Ф. Инфекционные болезни животных / Б.Ф. Бессарабов, А.А. Вашутин, Е.С. Воронин и др. – М.: КолосС, 2007. - С. 92-99.

14. Бехтерев, С.И. К вопоросу о заявке на изобретение, относящееся к штаммам микроорганизмов / С.И. Бехтерев, А.Я. Самуйленко // Метер. межд. науч.-прак. конф. – Щелково. – 2005. – С. 405-407.

15. Борисович, Ю.Ф Ветеринарные препараты: Справочник / Ю.Ф.Борисович, Л.В.Кириллов, Д.Ф. Осидзе. - М.: Колос, 1981. – С. 278-283.

16. Брюсова М.Б. Идентификация и дифференциация энтерогеморрагических *E.coli* методом ПЦР / М.Б. Брюсова, И.Л. Обухов, О.А. Тугаринов, М.К. Пирожков, А.Н. Панин // Ветеринария. – 2008. – №12. – С. 45-48.

17. Бургасов, П.Н. Эволюция клостридиозов / П.Н. Бургасов, С.Н. Румянцев - М.: «Медицина», 1974. – С. 46-52.

18. Бурико, Б.Ю. Этиологическое значение клостридий при инфекционных заболеваниях крупного рогатого скота / Б.Ю. Бурико, А.В. Капустин // Тезисы доклады международной научной конференции. – М., 2011. – С. 47-48.

19. Бусол, В. Анаеробна ентеротоксемія тварин. Епізоотологічні аспекти проблеми в Україні протягом останніх десятиріч / В. Бусол, П. Бойко, М. Павленко // Вет. медицина України, 2001. -N 5. - С. 16-18.

20. Васильев Д.А. Щербаков А.А., Карпунин Л.В., Золотухин С.Н. Методы частной бактериологии // Ульяновск. – 2004. – С. 18-26.

21. Волков, Г.К. Гигиена выращивания здорового молодняка / Г.К. Волков // Ветеринария. – 2003. - №1. – С. 3-6.

22. Волков, Г.К. Проблемы выращивания здорового молодняка / Г.К. Волков, В.Д. Баранников // Ветеринария. – 1997. - №2. – С. 7-10.

23. Гаффаров, Х.З. Полиспецифическая гипериммунная сыворотка против рота-, корона-, герпесвирусной и эшерихиозной диареи новорожденных телят / Х.З. Гаффаров, М.А. Ефимова, Г.Н. Спиридонов, М.В. Шакиров // Ветеринарный врач, – 2000. – №3. – С. 31-37.

24. Гаффаров, Х.З. Моно- и смешанные инфекционные диареи новорожденных телят и поросят / Х.З. Гаффаров, А.В. Иванов, Е.А. Непоклонов и др. – Казань: Изд-во «Фэн», 2002. – 592 с.

25. Головко, А.Н. Антигенная вариабельность фимбриальных адгезинов E. coli / А.Н. Головко, Е. Самофалова // Ветеринария. – 1997. – №8. – С. 23-25.

26. Головко, А.Н. Фимбриальные адгезины энтеротоксигенных эшерихий / А.Н. Головко // Ветеринария. – 1993. – №9. – С. 31-32.

27. Горковенко, Н.Е. Острые кишечные расстройства новорожденных телят бактериальной этиологии / Н.Е. Горковенко, Ю.А. Макаров, А.М. Кузьменко, В.А. Серебряков // Труды ВИЭВ. – Т. 76. – М.: ВИЭВ, 2011. – С. 179-181.

28. Джупина, С.И. Методы эпизоотологического исследования и теория эпизоотического процесса / С.И. Джупина. Новосибирск: Наука, 1991. – 144 с.

29. Дереза, А.Ф. Анаэробная энтеротоксемия телят, обусловленная энтеротоксином Кл. перфрингенс типа А / А.Ф. Дереза, В.А. Ленькова //

Соврем. пробл. профилактики зооноз. болезней и пути их решения. Минск, 1987. – С. 154-155.

30. Дереза, А.Ф. Совершенствование лабораторной диагностики анаэробной энтеротоксемии сельскохозяйственных животных / А.Ф. Дереза, В.А. Ленькова // Соврем. пробл. профилактики зооноз. болезней и пути их решения. Минск, 1987. – с. 154.

31. Дереза, А.Ф. Этиопатогенная роль *Closrtidium perfringens* при желудочно-кишечных заболеваниях телят / А.Ф. Дереза, В.А. Ленькова // Микроорганизмы в сельском хозяйстве. – Минск, 1983. – с. 80.

32. Дереза, А.Ф. О развитии иммунитета у крупного рогатого скота к токсинам Кл. перфрингенс типов А,В,С,Д / А.Ф. Дереза, В.Н. Алешкевич, А.А. Солоненко // Вет. наука. Минск, 1992 Т.Вып.30. – С. 77-84.

33. Дереза, А.Ф. Совершенствование лабораторной диагностики анаэробной энтеротоксемии сельскохозяйственных животных / А.Ф. Дереза // Соврем. пробл. профилактики зооноз. болезней и пути их решения. Минск, 1987.-С. 154.

34. Джупина, С.И. Колитоксикобактериоз – инфекция факторная / С.И. Джупина // Ветеринария Сибири. – 2001. – №5. – С. 14-17.

35. Джупина, С.И. Этиология и профилактика желудочно-кишечных болезней телят / С.И. Джупина // Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях. – Воронеж, 2002. – С. 8-11.

36. Емельяненко, П.А. Ентеротоксины кишечных бактерий / П.А. Емельяненко // Ветеринария. – 2000. – № 2. – С. 25-27.

37. Жукова, Е.В. Профилактика желудочно-кишечных болезней новорожденных телят / Е.В. Жукова, Г.И. Устинова // Труды ВИЭВ. – Т. 76. – М.: ВИЭВ, 2011. – С. 46-50.

38. Зароза, В.Г. Возбудители колибактериоза животных и их лабораторная идентификация / В.Г. Зароза, Г.А. Бурова, В.Г. Буров // Ветеринария. – 2008. – №3. – С. 29-32.

39. Зароза, В.Г. Эшерихиоз телят. - М.: "Агропромиздат". – 1991. – 238 с.

40. Зароза, В.Г. Энтеротоксемия крупного рогатого скота, вызываемая *Cl. perfringens* / В.Г. Зароза // Сельское хозяйство за рубежом. – 1984. – Т.8. – С. 51-53.

41. Зелютков, Ю.Г. Идентификация адгезивных антигенов у патогенных эшерихий / Ю.Г. Зелютков // Учен. зап. Витеб. гос. акад. вет. медицины, 1995. – Т.32. – С. 108-110.

42. Зелютков, Ю.Г. Эффективность одновременной иммунизации коров против ротавирусной инфекции и анаэробной энтеротоксемии / Ю.Г. Зелютков, В.Н. Алешкевич // Учен. зап. Витеб. гос. акад. вет. медицины, 1994. – Т. 31. – С. 116-117.

43. Земсков, А.М. Некоторые механизмы действия адъювантов / А.М. Земсков // Иммунология. – 1982. - №1. – С. 6-13.

44. Золотухин, С.Н. Неспецифическая профилактика смешанной кишечной инфекции телят и поросят / С.Н. Золотухин, Л.П. Пульчеровская, Л.С. Каврук // Практик. – 2006. – №6. – С. 72-76.

45. Иванов, А.А. Результаты испытания вакцины ассоциированной против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят на лабораторных животных. / А.А. Иванов, Г.Н. Спиридонов, Х.Н. Макаев, А.Г. Спиридонов // Ветеринарный врач. – 2012. – №2. – С. 10 – 12.

46. Иванов, А.В. Методические рекомендации по диагностике, профилактике и лечению желудочно-кишечных болезней новорожденных телят / А.В. Иванов, Папуниди К.Х., Тремасов М.Я., Макаев Х.Н., Закирова Г.Ш., Степанов В.И., Хазипов Н.Н., Чурин С.И., Камалов Б.В., Ахметоа Ф.Г., Аглямов Р.Н. // – Казань. – 2011. – 39 с.

47. Инамалиев, М.И. Иммунопрофилактика колибактериоза телят / М.И. Инамалиев, Е.С. Самойленко, К. Абдыкеримов // Тр. Киргизского НИВИ. – 1987. – Т.1. – С. 60-64.

48. Инструкция по применению сывороток антитоксических Клостридиум перфрингенс типов А, С, Д. Утверждена зам. Руководителя Россельхознадзора 29.12.06 г. – М.: 2006. – 2 с.

49. Йоханссон А. Выживание *Cl. perfringens* при транспортировании и стабильности некоторых ее плазмидных генов токсинов в аэробных условиях / А. Йоханссон, Б.Е. Энгстрем, Дж. Фрей, К.Е. Йоханссон, В. Баверад // Российский ветеринарный журнал. – 2007 – №3. – С. 6-8.

50. Исмаилов, Э.И. Биохимические и патоморфологические изменения при гастроэнтеритах телят / Э.И. Исмаилов // Ветеринария. – 2007. – №4. – С. 13-14.

51. Казимир, А.Н. Эпизоотология, этиология, фаготерапия и специфическая профилактика анаэробной энтеротоксемии телят в хозяйствах Ульяновской области : автореф. дис…канд.вет.наук / А.Н. Казимир. – Казань, 1997. – 22 с.

52. Караев Я.М. Протективные и иммуногеные свойства эшерихиозного антигена: автореф. дис…канд.вет.наук / Я.М. Караев. – Краснодар, 2008. – 25 с.

53. Кафтырева, Л.А. Использование молекулярно-генетических методов для уточнения этиологической роли и серотипирования эшерихий / Л.А. Кафтырева, М.А. Макарова // Молекулярная диагностика: Сб. науч. трудов. – Т.2. – М., 2010. – С. 345-347.

54. Кириллов, Л.В. Инфекционная анаэробная энтеротоксемия животных / Л.В. Кириллов, З.Х. Межиева // Российский ветеринарный журнал. – 2007 – №3. – с. 4-9.

55. Кириллов, Л.В. Предупреждение инфекционных болезней анаэробной этиологии / Л.В. Кириллов // Ветеринария, 2001. – №1 – С. 16-19.

56. Кисленко, В.Н. Возбудители инфекционной анаэробной энтеротоксемии / В.Н. Кисленко, Н.М. Колычев, О.С. Суворина // Ветеринарная микробиология и иммунология. – М.: КолосС, 2007. – С. 64-67.

57. Ковалев, А.С. Некоторые особенности специфической профилактики колибактериоза телят / А.С. Ковалев // Современные аспекты профилактики инфекционных болезней молодняка. – Кишинев, 1989. – С. 60-62.

58. Колычев, Н.М. Ветеринарная микробиология и иммунология / Н.М. Колычев, Р.Г. Госманов. – 3-е изд., перераб. и доп. – М.: КолосС, 2003. – С. 289- 294

59. Коляков, Я.Е. Колибактериоз телят / Я.Е. Коляков, С.С. Гительсон, Л.С. Каврук // М.: КолосС, 1970. – 223 с.

60. Компанченко, А.С. Некоторые аспекты эпизоотологии желудочно-кишечных болезней телят в Ростовской области / А.С. Компанченко // Современные проблемы устойчивого развития агропромышленного комплекса России. – п. Персиановский, 2003. – С. 56-57.

61. Кондрахин, И.П. Методы ветеринарной клинической лабораторной диагностики / И.П. Кондрахин, А.В. Архипов, В.И. Левченко, Г.А. Таланов, Л.А. Фролова, В.Э. Новиков. – М.: Колос, 2004. – С. 89-91.

62. Коновалова, Т.А. Результаты применения методов амплификации нуклеиновых кислот для выявления диарогенных *E.coli* / Т.А. Коновалова, А.В. Бондарева, А.Т. Подколзин, Е.М. Костенко, Т.В. Хорошилова, Н.М. Юдицкая // Молекулярная диагностика: Сб. науч. трудов. – Т.2. – М., 2010. – С. 348-351.

63. Конопаткин, А.А. Эпизоотология и инфекционные болезни / А.А. Конопаткин, Б.Т. Артемов, И.А. Бакулов и др. – 2-е изд., перераб. и доп. – М.: КолосС, 1993. – С. 553-564.

64. Красильников, А.П. Микробиологический словарь-справочник / А.П. Красильников, Т.Р. Романовская. – 2-е изд., доп. и перераб. – Мн.: «Асар», 1999. – С. 169, 287, 388-389.

65. Куликовский, А.В. Токсигенные эшерихии – актуальная проблема ветеринарии и медицины / А.В. Куликовский, А.Н. Панин, В.В. Соснина // Ветеринария. – 1997. – №3. – С. 25-27.

66. Куриленко, А.Н. Бактериальные и вирусные болезни молодняка сельскохозяйственных животных / А.Н. Куриленко, В.Л. Крупальник, Н.В. Пименов. – М.: КолосС, 2006. – 296 с.

67. Курлович, Д.В. Разработка и апробация вакцины ассоциированной против колибактериоза и анаэробной энтеротоксемии телят / Д.В. Курлович, В.К. Карпович, Н.В. Москалева // Вет. наука. Минск, 2001 Т.Вып.35.-с. 108-113.

68. Лазарева, Д.Н. Стимуляторы иммунитета / Д.Н. Лазарева, Е.К. Алехин. – М.: Медицина, 1985. – 256 с.

69. Лосякина, Н.В. Индикация энтеротоксигенных штаммов клостридиум перфрингенс методом встречного иммуноэлектрофореза / Н.В. Лосякина, А.Ф. Дереза // Вет. наука. Минск, 1992 Т.Вып.30. – С. 84-88.

70. Макаев, Х.Н. Методические рекомендации по применению селимакцида при желудочно-кишечных заболеваниях животных / Х.Н. Макаев, А.И. Никитин, Г.Х. Муртазина, К.Х.. Папуниди, Г.Н. Спиридонов, Р.М. Потехина, Р.Н. Аглямов, В.И. Дорожкин // - Казань. – 2016. – 28 с.

71. Макаров, В.В. Сапронозы, факторные и оппортунистические инфекции (к истории этиологических воззрений в отечественной эпидемиологии и эпизоотологии) / В.В. Макаров // Ветеринарная патология. – 2008. - №1.-с. 7-17.

72. Малахов, Ю.А. Специфическая профилактика и диагностика бактериальных болезней животных / Ю.А. Малахов, Р.В. Душук // Ветеринария. – 2001. – №1. – С. 35-38.

73. Малахов, Ю.А. Специфическая профилактика эшерихиоза животных / Ю.А. Малахов, О.А. Тугаринов, М.К. Пирожков, Т.И. Исхаков // Ветеринария – 1995. – №8. – 5 с.

74. Малахов, Ю.А. Специфическая профилактика эшерихиоза животных / Ю.А. Малахов, О.А. Тугаринов, М.К. Пирожков и др. // Ветеринария. – 1993. – №8. – С. 5-7

75. Манасян, А.В. Активность ферментов пищеварительной системы у телят при диспепсии / А.В. Манасян, Г.Р. Петоян, А.М. Шахбазян // Ветеринария. – 2003. - №7. – С. 39-40.

76. Мансурова, Е.А. Изучение механизма действия токсина энтеробактерий // Е.А. Мансурова, Е.М. Ленченко // Ветеринария. – 2008. - №8. – С. 60-64.

77. Мельников, В.Н. Основы профилактики анаэробных инфекций. / В.Н. Мельников, Н.И. Мельников, У.С. Еникеева – Уфа, 1971. – С. 57-70.

78. Методические указания по бактериологической диагностике колибактериоза (эшерихиоза) животных. Утверждены ГУВ МСХ СССР.- М.: 1981. – 10 с.

79. Методические указания по лабораторной диагностике инфекционной энтеротоксемии и анаэробной дизентерии ягнят. Утверждены ГУВ МСХ СССР.- М.: 1984. – 4 с.

80. Методические указания диагностике профилактике и лечению колибактериоза телят и поросят с применением средств, полученных на основе бионанотехнологии. Утверждены отделением ветеринарной медицины Россельхозакадемии.- М.: 2013. – 26 с.

81. Мищенко, В.А. Меры борьбы с диареями новорожденных телят / В.А. Мищенко, Н.А. Яременко, Д.К. Павлов, О.И. Гетманский, А.В. Савин // Ветеринария. – 2002. - №4. – С. 16-19.

82. Мищенко, В.А. Особенности диарейных болезней крупного рогатого скота / В.А. Мищенко, Н.А. Яременко, О.И. Гетманский, Д.К. Павлов, А.В. Савин // Ветеринария. - 2001. - №5. – С. 5-7.

83. Москалева, Н.В. Диагностика анаэробной энтеротоксемии, вызываемой энтеротоксигенными штаммами *Cl. perfringens* типа А, в реакции встречного иммуноэлектроосмофореза (ВИЭОФ) / Н.В. Москалева // Известия Академии аграрных наук Республики Беларусь. - 2001- №2. – С. 85-89.

84. Моторыгин, А.В. Количественно-качественная характеристика энтеробактерий при желудочно-кишечных болезнях телят / А.В. Моторыгин, Е.М. Левченко // Ветеринария. – 2010. - №8. – С. 29-33.

85. Моторыгин, А.В. Определение качественного и количественного состава микроорганизмов при дисбактериозе кишечника у телят / А.В. Моторыгин, Е.М. Ленченко // Сельскохозяйственная биология. – 2011. – №2. – С. 103-107.

86. Мусаева, М.Н. Инфекционные диареи новорожденных телят в условиях Дагестана (эпизоотология, профилактика, лечение) / М.Н. Мусаева // Автореф. дис. …кандид.вет. наук. – Краснодар. – 2010. – 24 с.

87. Насертдинов, Д.Д. Экономическая эффективность применения сыворотки гипериммунной против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят / Насертдинов Д.Д., Спиридонов А.Г., Махмутов А.Ф., Спиридонов Г.Н., Макаев Х.Н. // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. – том 226 (II). – Казань, 2016. – С. 120-123.

88. Нестеров, И.А. Эмерджентная эволюция перфрингенза (инфекционной анаэробной энтеротоксемии) животных в зоне Северного Кавказа / И.А. Нестеров // Ветеринарная патология. - 2005. - №2.- С. 35- 41.

89. Нестеров, И.А. Эмерджентные преобразования перфрингенеоза животных на Северном Кавказе / И.А. Нестеров // Актуал. проб. инфек. патолог. и иммун. животных. – Москва, 2006. – С. 103-107.

90. Овод, А.С. Профилактика диарей новорожденных телят пробиотиками /А.С. Овод, В.В. Мосейчук // Ветеринария. – 2007. - №2. – С. 6-7.

91. Олейник, А.В. Расстройство желудочно-кишечного тракта у телят раннего возраста / А.В. Олейник // Ветеринария. – 2009. – №1. – С. 6-8.

92. Онищенко, И.С. Распространение, биологические свойства и эпидемиологическое значение кишечной палочки серотипа O157:H7, циркулирующего среди сельскохозяйственных животных / И.С. Онищенко,

Н.А. Шкиль, В.Ю. Коптев и др. // Мат. Межд.научно-практ. конф. – Краснообск, 2010. – С. 75-83.

93. Панин, А.П. Основные требования к производственным и контрольным штаммам микроорганизмов / А.П. Панин, Н.Т. Татаринцев // Ветеринария. – 1993. - №4. – С. 28-29.

94. Папуниди, К.Х. Болезни желудочно-кишечного тракта и печени у животных / К.Х. Папуниди, В.А. Игнаткина, В.А. Горшков // Учебное пособие. – Чебоксары, 2003. – 54 с.

95. Папуниди, К.Х. Влияние пробиотиков на микрофлору желудочно-кишечного тракта новорожденных телят / К.Х. Папуниди, Г.Ш. Закирова / Ветеринарный врач. – 2006. – №4. – С. 29-30.

96. Паршин, П.А. Клинико-морфологические изменения при гастроэнтеритах у молодняка / А.П. Паршин, С.М. Сулейманов // Ветеринария. – 2004. – №2. – С. 42-45.

97. Патент Российской Федерации. Вакцина ассоциированная против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят / Г.Н. Спиридонов, А.А. Иванов, Х.Н. Макаев, М.Т. Хурамшина, А.Г. Спиридонов, Э.Р. Галиуллина; заявитель ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности». - № 2428202; опубл. 10.09.2011, Бюл. №25.

98. Патент Российской Федерации. Способ получения гипериммунной сыворотки против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят / А.В. Иванов, Г.Н. Спиридонов, А.А. Иванов, Д.Д. Насертдинов, А.Г. Спиридонов, А.Ф. Махмутов; заявитель ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности». - № 2523389; опубл. 20.07.2014, Бюл. № 20.

99. Патента РФ № 2625031 от 11.07.17 г. Иммуноферментная тест-система для серологической диагностики анаэробной энтеротоксемии животных и контроля напряженности поствакцинального иммунитета /А.Г. Спиридонов, А.И. Никитин, Г.Н. Спиридонов, А.Н. Чернов, Х.Н. Макаев;

заявитель и патентообладатель ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности». - №2016133320; заявл. 11.08.2016; опубл. 11.07.2017, Бюл. №20.

100. Петров, А.М. Формирование колострального иммунитета у животных / А.М. Петров // Ветеринария, №8, 2006. – С. 35-41.

101. Петрянкин, Ф.П. Иммунобиология комплекса «мать-плод-новорожденный» у животных / Ф.П. Петрянкин. – Чебоксары, 2008. – 72с.

102. Пирожков, М.К. Вакцина против эшерихиоза сельскохозяйственных животных (Коли-Вак К88, К99, 987Р, F41, ТЛ и ТС-анатоксины) / М.К. Пирожков, Ю.А. Малахов, О.А. Тугаринов // Сб. науч. тр. – Т. 62. – М.: ВГНКИ, 2001. – С. 75-82.

103. Пирожков, М.К. Диагностика, специфическая профилактика и лечение и бактериальных болезнях животных / М.К. Пирожков, С.В. Ленев, Е.В. Викторова, С.А. Стрельченко, Л.И. Тихонов, О.Д. Скляров // Ветеринария. – 2011. – №1. – С. 24-28.

104. Плитов, И.С. Определение чувствительности энтеробактерий к антибиотикам и дезинфицирующим средствам / И.С. Плитов // Ветеринария. – 2010. – №12. – С. 42-45.

105. Попов, Е.М. Новый антиген адгезии эшерихий – возбудителей колидиареи телят / Е.М. Попов, Е.А. Светоч // Совершенствование методов гос. контроля вет. преп.: Тез. докл. Всесоюз. науч. конф. – М., 1991. – С. 210-211.

106. Радионова, К.П. Клостридиозы сельскохозяйственных животных / К.П. Радионова, О.В. Карабанова // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2010 - №9. - с. 12-14.

107. Салимов, В.А. Патологоанатомическая и дифференциальная диагностика эшерихиозов, сальмонеллезов, пастереллезов, анаэробных энтеротоксемий, кандидамикоза, их ассоциаций и осложнений у молодняка сельскохозяйственных животных / В.А. Салимов – М.: Колос, 2001. - 75 с.

108. Самуйленко, А.Я. Зависимость уровня специфического и гуморального иммунитета у вакцинированного крупного рогатого скота от компонентного состава инактивированных противоящурных вакцин / А.Я. Самуйленко // Акт. проблемы вет. вирусологии. – Владимир. – 1983. – С. 93-95.

109. Сапего, В.И. Биологически активные вещества и естественная резистентность телят / В.И. Сапего, Е.В. Берник // Ветеринария. – 2002. – №5. – С. 44-45.

110. Светоч, Э.А. Факторы патогенности возбудителей эшерихиозов сельскохозяйственных животных // Автореф. дис. на соискание уч. степени д.в.н., М. – 1992. – С. 10-12.

111. Селиванов, А.В. Требования к штаммам микроорганизмов для изготовления биопрепаратов / А.В. Селиванов, Л.В. Кириллов, Ю.Ф. Борисович // Ветеринария. – 1980. – №4. – С. 33-35.

112. Семенов, Л.В. Ассоциированная вакцина против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиоза поросят: автореф. дис…биол. наук / Л.В. Семенов. – М., 1999. – 25 с.

113. Сергеева, Т.И. Перспективы разработки методов лабораторной диагностики и иммунопрофилактики кишечных клостридиозов сельскохозяйственных животных / Т.И. Сергеева, И.Н. Бакулин, В.П. Земляницкая, В.М. Алчинбаева // Соврем. пробл. профилактики зооноз. болезней и пути их решения. Минск, 1987. - с. 155-156.

114. Сидоров М.А. Иммунный статус и инфекционные болезни новорожденных телят и поросят /М.А. Сидоров, Ю.Н. Федоров, О.М. Савич // Ветеринария. – 2006. – №11. – С. 3-5.

115. Сидоров М.А., Полякова О.И. О профилактике колибактериоза новорожденных телят // Ветеринария. – 1974. – № 3. – С. 53-55.

116. Скородумов, Д.И. Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных / Скородумов Д.И. и др. // М.: ИзографЪ, 2005. – 653 с.

117. Скулябина, З.А. Профилактика желудочно-кишечных болезней телят / З.А. Скулябина, А.П. Горбунова // Труды ВИЭВ. – Т. 76. – М.: ВИЭВ, 2011. – С. 585-687.

118. Соколова, Н.А. Адгезивные антигены и энтеротоксины эшерихий, патогенных для молодняка сельскохозяйственных животных / Н.А. Соколова, Н.И. Евглевская, Т.К. Курашвили, Ю.С. Кабанков, Г.Л. Дворкин // Ветеринария. – 1989. – №5. – С. 33-35.

119. Соколова, Н.Л. Перспективы диагностики и специфической профилактики желудочно-кишечных болезней новорожденных животных / Н.Л. Соколова // Труды ВИЭВ. – Т. 75. – М.: ВИЭВ, 2010. – С. 112-114.

120. Спиридонов, А.Г. Анаэробная энтеротоксемия телят в регионе Среднего Поволжья и Предуралья / А.Г. Спиридонов, А.Ф. Махмутов, М.Т. Хурамшина // Лекарственные препараты для животных (разработка, производство, эффективность и качество): Тезисы докл. Междунар. науч. конф. – М., 2011. – С. 62 – 63.

121. Спиридонов, А.Г. Специфическая профилактика анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят / А.Г.Спиридонов, Х.Н.Макаев, Г.Н.Спиридонов // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. – 2012. –Т. 209. – С. 284-289.

122. Спиридонов, А.Г. Разработка и оценка эффективности вакцины ассоциированной против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят: автореф. дис…канд.биол.наук / А.Г. Спиридонов. – Казань, 2008. – 19 с.

123. Спиридонов, А.Г. Лечебно-профилактическая эффективность гипериммунной сыворотки против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят / А.Г. Спиридонов, Д.Д. Насертдинов Махмутов А.Ф., Спиридонов Г.Н., Макаев Х.Н. // Материалы научно-практ. конф. «Актуальные проблемы современной ветеринарной науки и практики», посвящ. 70-летию Краснодарского научно-исслед. ветеринарного института, 22-23 июня 2016 г. Краснодар. – 2016. – С. 335-338.

124. Спиридонов, Г.Н. Желудочно-кишечные заболевания новорожденных телят в условиях промышленных комплексов и разработка лечебно-профилактических мероприятий / Г.Н.Спиридонов // Ветеринарный врач. – 2007. – С. 26-29.

125. Спиридонов, Г.Н. Инфекционные болезни новорожденных телят и их иммунопрофилактика в современных условиях / Г.Н. Спиридонов // Матер. межд. конф., посвященной 80-летию Самарской НИВС Россельхозакадемии. – Самара. – 2009. – С. 434-438.

126. Спиридонов, Г.Н. Инфекционная энтеротоксемия молодняка сельскохозяйственных животных в регионе Среднего Поволжья и Предуралья / Г.Н. Спиридонов, А.Ф. Махмутов, М.Т. Хурамшина, А.Г. Спиридонов // Актуальные вопросы ветеринарной медицины Сибири: Матер. науч.-практ. конф. – Краснообск, 2010. – С. 134-139.

127. Спиридонов, Г.Н. Результаты испытания вакцины ассоциированной против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят в производственных условиях / Г.Н. Спиридонов, А.А. Иванов, А.Г. Спиридонов, Х.Н. Макаев // Ветеринарна медицина. – Міжвідомчий тематичний науковий збірник. – Харків. – 2013. - випуск 97. – С. 543-544.

128. Спиридонов, Г.Н. Специфическая профилактика инфекционных болезней новорожденных телят, поросят и инфекционого кератоконъюнктивита крупного рогатого скотаа: автореф. дис…док. биол. наук / Г.Н. Спиридонов. – Казань, 2014. – 45 с.

129. Стрельченко, С.А. Тест-системы для выявления веротоксинов *E.coli* и антител к ним в сыворотке крови животных / С.А. Стрельченко, М.К. Пирожков // Ветеринария. – 2010. – №4. – С. 54-57.

130. Субботин, В.В. Биологические аспекты бактериопрофилактики и терапии инфекционных болезней желудочно-кишечного тракта / В.В. Субботин // Инфекционные и протозойные болезни сельскохозяйственных животных, рыб и пчел: Труды ВИЭВ. – Т. 73. – М.: ВИЭВ, 2003. – С. 178-183.

131. Субботин, В.В. Основные элементы профилактики желудочно-кишечной патологии новорожденных животных / В.В. Субботин, М.А. Сидоров // Ветеринария. – 2004. – №1. – С. 3-6.

132. Субботин, В.В. Профилактика желудочно-кишечных болезней новорожденных животных с симптомами диареи / В.В. Субботин, М.А. Сидоров // Ветеринария. – 2001. – №4. – С. 3-7.

133. Сюрин, В.Н. Состояние и проблемы ветеринарной микробиологии и биотехнологии / В.Н. Сюрин, Э.А. Шегидевич // Мат. Научной конференции. – Москва. - 1998. – №3. – С. 24.

134. Татаринцев, Н.Т. Основные показатели качества оценки анатоксинов и инактивированных вакцин против бактериальных и вирусных болезней животных / Н.Т. Татаринцев, М.В. Нестифорова // Сб. науч. тр. ВГНКИ. – 1996. – Т. 59. – С. 13-18.

135. Техника сбора и транспортирования биоматериалов в микробиологические лаборатории // Методическое указание МУ 4.2.2039-05. М. – 2006. – 12 с.

136. Тугаринов, О.А. Колибактериоз (эшерихиоз) животных / О.А. Тугаринов, М.К. Пирожков, Ю.А. Малахов // Сб. науч. тр. – Т. 62. – М.: ВГНКИ, 2001. – С. 68-75.

137. Тугаринов, О.А. Колибактериоз телят и ягнят // Справочник: Инф. болезни животных – М. «Агропромиздат», 1987. – С. 204-207.

138. Урбан, В.П. Болезни молодняка в промышленном животноводстве / В.П. Урбан, И.Л. Наймонов // М.: КолосС, 1984. – 184 с.

139. Урбан, В.П. Практикум по эпизоотологии и инфекционным болезням с ветеринарной санитарией. / В.П. Урбан, М.А. Сафин, А.А. Сидорчук и др. – М.: КолосС, 2002. – С. 175-178.

140. Ургуев, К.Р. Иммуногенез при вакцинации овец полианатоксином против клостридиозов / К.Р. Ургуев // Пробл. ветеринарной иммунологии. – 1987. – С. 98-101.

141. Ургуев, К.Р. Клостридиозы животных / К.Р. Ургуев. – М.: Россельхозиздат, 1987. – 183 с.

142. Хайруллин, И.Н. выделение и биологические свойства бактериофага кл. перфрингенс типа С / И.Н. Хайруллин, М.А. Сафин // Вопросы инфекционной патологии животных. – Казань, - 1994. – С. 73-75.

143. Хурамшина, М.Т. Инфекционная энтеротоксемия молодняка сельскохозяйственных животных / М.Т. Хурамшина, Г.Н. Спиридонов, А.Ф. Махмутов // Биотехнология: токсикологическая, радиационная и биологическая безопасность: Матер. междунар. науч.-практ. конф. – Казань, 2010. – С. 502 – 507.

144. Чулков, Н.В. Совершенствование специфической профилактики колибактериоза телят с использованием бивалентных вакцин и гипериммунной сыворотки, изготовленных на основе аттенуированных адгезивных штаммов *E.coli*: автореф. дис. ..канд.вет.наук / Н.В. Чулков. – Новосибирск, 2004. – 27 с.

145. Шахов, А.Г. Энтеротоксемия телят и поросят/ А.Г. Шахов, А.И Ануфриев, Ю.Н. Бригадиров, П. Ануфриев // Животноводство России. – 2006. – С. 49-50.

146. Шахов, А.Г. Этиология и профилактика желудочно-кишечных и респираторных болезней телят и поросят / А.Г. Шахов // Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях: Матер. Межд. научн.-практ. конф. – Воронеж, 2002. – С. 3-8.

147. Шажко, Л.Ф. Сравнительная оценка иммуногенности противоящурных формолвакцин, приготовленных с гидратом окиси алюминия и фосфатом кальция / Л.Ф. Шажко, М.Г. Удалых // Ящур: мат. науч. конф. – Владимир. – 1970. – С 56-57.

148. Шевченко, А.А. Профилактика и мероприятия по профилактике анаэробной энтеротоксемии крупного рогатого скота / А.А. Шевченко, Л.В. Шевченко, Д.Ю. Зеркалов, О.Ю. Черных, Г.А. Джаилиди // Учебное пособие. – Краснодар, 2013. –10 с.

149. Шевченко, А.А. Инфекционные болезни крупного рогатого скота в Краснодарском крае и усовершенствование профилактики / А.А. Шевченко, О.Ю. Черных, Л.В. Шевченко, О.В. Двадненко // Актуальные вопросы контроля инфекционных болезней животных: Матер. Междунар. науч.-практ. конф. – Покров, 2014. – С. 338-342.

150. Шкиль, Н.А. Мониторинг бактериальных агентов, являющихся этиологическими факторами желудочно-кишечных болезней молодняка / Н.А. Шкиль, М.Н. Шадрина, В.Ю. Коптев, Н.В. Чупахина // Состояние и перспективы обеспечения ветеринарного благополучия Восточной Сибири: Матер. Междунар. науч.-практ. конф. – Чита, 2008. – С. 466-470.

151. Шуба, Г.М. //Основы медицинской бактериологии, вирусологии и иммунологии. Москва «Логос», 2003. – С. 123-125

152. Щербаков, П.Н. Профилактика и лечение при желудочно-кишечных и респираторных болезнях телят / П.Н. Щербаков, А.Г. Гусев // Ветеринария. – 2002. –№3. – С. 15-16.

153. Эль Ганам М.Л. Токсичность и патогенность эшерихий / М.Л. Эль Ганам, М.А. Сидоров // Ветеринария. – 1986. – №2. – С. 66-67.

154. Abutarbush M.A. Jejunal hemorrhage syndrome in 2 Canadian beef cows / M.A. Abutarbush, L.J. Carmalt, G.D. Wilson, P.B. O’Connor, G.E. Clark, M.J. Naylor // Can. Vet. J. – 2004. – 45 – P. 48-50.

155. Abutarbush S.M. Jejunal hemorrhage syndrome in dairy and beef cattle: 11 cases (2001 to 2003) / S.M. Abutarbush, O.M. Radostits // Can. Vet. J. – 2005. – 46 – P. 711-715.

156. Acres S.D. Acute undifferentiated neonatal diarrhea in beef calves I. Occurrence and distribution of infectious agents / S.D. Acres, C.J. Laing, J.R. Saunders, O.M. Radostits // Can. J. comp. med. – 1975. – 39 – P. 116-132.

157. Acres S.D. Immunization of calves against Enterotoxigenic Colibacillosis by vaccinating dams with purified K99 antigen and whole cell bacterins // S.D. Acres, R.E. Isaacson, L.A. Babiuk, R.A. Kapitany // Infection and Immunity. – 1979. – 25 – 1 – P. 121-126.

158. Acres S.D. The efficacy of a modified live Reo-like virus vaccine and an E.cole bacterin for prevention of acute undifferentiated neonatal diarrhea of beef calves / S.D. Acres, O.M. Radostits // Can. Vet. Journal. – 1976. – 17 – 8 – P. 197-212.

159. Adamson R.H. Clostridium perfringens Epsilon-Toxin increases permeability of single perfused microvessels of rat mesentery / R.H. Adamson, J.C. Ly, M.E. Fernandez-Miyakawa, S. Ochi, J. Sakurai, F. Uzal, F.E. Curry // Infection and Immunity. – 2005. – 73 – 8 – P. 4879-4887.

160. Aidar L. Subtypes of intimin among non-toxigenic Escherichia coli from diarrheic calves in Brazil / L. Aidar, A.S. Penteado, L.R. Trabulsi, J.E. Blanco, M. Blanco, J. Blanco, A.F. Pestana de Castro // Can.J.Vet.Research. – 2000. – 64 – P. 15-20.

161. Alexa P.; Faecal shedding of verotoxigenic Escherichia coli in cattle in the Czech Republic / P. Alexa, L. Konstantinova, Z. Sramkova-Zajacova // Veter. Med. - 2011. - Vol.56. - N 4. - P. 149-155.

162. All-Charrakh A. Prevalence of verotoxine-producing Escherichia coli (VTEC) in a survey of dairy cattle in Najaf, Iraq / A. All-Charrakh, A. All-Muhana // Iranian journal of Microbiology. – 2010. – 2 – 3 – P. 130-136.

163. Antao Esther-Maria Adhesive threads of extraintestinal pathogenic Escherichia coli / Esther-Maria Antao, L.H. Wieler, C. Ewers // Gut Pathogens. – 2009. – 1 – 22 – P. 1-12.

164. Bannam T.L. Clostridium perfringens-Escherichia coli shuttle vectors that carry single antibiotic resistance determinants / T.L. Bannam, J.I. Rood // Plasmid. – 1993. – 29 – P. 233-235.

165. Bardiau M. Putative adhesins of enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli of serogroup O26 isolated from humans and cattle / M. Bardiau, S. Labrozzo, J.G. Mainil // Journal of Clinical Microbiology. – 2009. – 47 – 7 – P. 2090-2096.

166. Barth H. Binary bacterial toxins: Biochemistry, Biology, and applications of common Clostridium and Bacillus proteins / H. Barth, K. Aktories,

M.R. Popoff, B.G. Stiles // Microbiol. & Mol. Biol. Rev. – 2004. – 68 – 3 – P. 373-402.

167. Bellamy J.E.C. A comparison of histopathological changes in calves associated with $K99^-$ and $K99^+$ strains of enterotoxigenic Escherichia coli / J.E.C. Bellamy, S.D. Acres // Can J. comp. med. – 1983. – 47- P. 143-149.

168. Blocker D. Cellular uptake of the Clostridium perfringens binary iota-toxin / D. Blocker, J. Behlke, K. Aktories, H. Barth // Infect. Immun. – 2001. – 69 – P. 2980-2987.

169. Burgess M.N. Biological evaluation of a methanol-soluble, heat-stable Escherichia coli enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits and calves / M.N. Burgess, R.J. Bywater, C.M. Cowley, N.A. Mullan, P.M. Newsome // Infection and Immunity. – 1978. – 21 – 2 – P. 526-531.

170. Canard B. Genomic diversity and organisation of virulence genes in the pathogenic anaerobe Clostridium perfringens / B. Canard, B. Saint-Joanis, S.T. Cole // Mol. Microbiol. – 1992. – 6 – P. 1421-1429.

171. Ceci L. Haemorrhagic bowel syndrome in dairy cattle: possible role of Clostridium perfringens type A in the disease complex / L. Ceci, P. Paradies, M. Sasanelly, D. de Caprariis, F. Guarda // J. Vet. Med. – 2006. – 53 – P. 518-523.

172. Chen J. Epsilon-Toxin production by Clostridium perfringens type D strain CN3718 is dependent upon the age operon but not the VirS/VirR two-component regulatory system / J. Chen, J.I. Rood, B.A. McClane // mBio. – 2011. – 2 – 6 – P. 1-11.

173. Coddens A. Erythrocyte and Porcine Intestinal Glycosphingolipids Recognized by F4 Fimbriae of Enterotoxigenic *Escherichia coli* / A. Coddens, E. Valis, J. Benktander et al. // PLoS One. – 2011. – 6(9). – P. 2330.

174. Dastmalchi S.H. Characterization of shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) in feces of healthy and diarrheic calves in Urmia region, Iran / S.H. Dastmalchi, N. Ayremlou // Iranian journal of microbiology. – 2012. – 4 – 2 – P. 63-69.

175. Daube G. Typing Clostridium perfringens by in vitro amplification of toxin genes / G. Daube, B. China, P. Simon, K. Hvala, J. Mainil // J. Appl. Bacteriol. – 1994. – 77 – P. 650-655.

176. de Verdier K. Antimicrobial resistance and virulence factors in Escherichia coli from Swedish dairy calves / K. de Verdier, A. Nyman, C. Greko, B. Bengtsson // Acta Veter. Scandinavica. – 2012. – 54 – 2 – P. 1-10.

177. Dennison A.C. Hemorrhagic bowel syndrome in dairy cattle: 22 cases (1997-2000) / A.C. Dennison, D.C. VanMetre, R.J. Callan, P. Dinsmore, G.L. Mason, R.P. Ellis // J. Am Vet. Med. Assoc. – 2002. – 221 – P. 686-689.

178. Donaldson S.C. Molecular epidemiology of Ceftiofur-Resistant Escherichia coli isolates from dairy calves / S.C. Donaldson, B.A. Straley, N.V. Hegde, A.A. Sawant, C.DebRoy, B.M. Jayarao // Applied and Environmental Microbiology. – 2006. – 72 – 6 – P. 3940-3948.

179. Dupuy B. Clostridium perfringens urease genes are plasmid borne / B. Dupuy, G. Daube, M.R. Popoff, S.T. Cole // Infection and Immunity. – 1997. – 65 – 6 – P. 2313-2320.

180. Ewoldt J.M. Determination of the effect of single abomasal or jejunal inoculation of Clostridium perfringens type A in dairy cows / J.M. Ewoldt, D.E. Anderson // Can. Vet. J. – 2005. – 46 – P. 821-824.

181. Fernandez-Miyakawa M.E. Both Epsilon-Toxin and Beta-Toxin are important for the lethal properties of Clostridium perfringens type B isolates in the mouse intravenous injection model / M.E. Fernandez-Miyakawa, D.J. Fisher, R. Poon, S. Sayeed, V. Adams, J.I. Rood, B.A. McClane, F.A. Uzal // Infection and Immunity. – 2007. – 75 – 3 – P. 1443-1452.

182. Fernandez-Miyakawa M.E. Development and application of an oral challenge mouse model for studying Clostridium perfringens type D infection / M.E. Fernandez-Miyakawa, S. Sayeed, D.J. Fisher, R. Poon, V. Adams, J.I. Rood, B.A. McClane, J. Saputo, F.A. Uzal // Infection and Immunity. – 2007. – 75 – 9 – P. 4282-4288.

183. Fernandez-Miyakawa M.E. Lethal effects of Clostridium perfringens epsilon toxin are potentiated by alpha and perfringolysin-O toxins in a mouse model / M.E. Fernandez-Miyakawa, B.H. Jost, S.J. Billington, F.A. Uzal // NIP-PA Author Manuscript. – 2009. – 127 – P. 379-385.

184. Ferrarezi M.C. Genotyping of Clostridium perfringens isolated from calves with neonatal diarrhea / M.C. Ferrarezi, T.C. Cardoso, I.S. Dutra // Anaerob. – 2008. – 14 – P. 328-331.

185. Fisher D.J. Association of beta2 toxin production with Clostridium perfringens type A human gastrointestinal disease isolates carrying a plasmid enterotoxin gene / D.J. Fisher, K. Miyamoto, B. Harrison, S. Akimoto, M.R. Sarker // Mol. Mocrobiol.- 2005. – 56 – P. 747-762.

186. Francis D.H. Effect of Sodium Acetate on expression of K99 pili by Escherichia coli / D.H. Francis, C.J. Ryan, J.D. Fritzemeier // Infection and Immunity. – 1983. – 41 – 3 – P. 1368-1369.

187. Francis D.H. Production of K88, K99, and 987P antigens by Escherichia coli cultured on synthetic and complex media / D.H. Francis, G.A. Remmers, P.S. DeZeeuw // Journal of clinical microbiology. – 1982. – 15 – 1 – P. 181-183.

188. Gaastra W. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic Escherichia coli strains / W. Gaastra, F.K. de Graaf // Microbiological Reviews. – 1982. – 46 – 2 – P. 129-161.

189. Girard F. Interactions of typical and atypical enteropathogenic Escherichia coli strains with the calf intestinal Mucosa Ex vivo / F. Girard, F. Dziva, M.P. Strevens, G. Frankel // Applied and Environmental Microbiology. – 2009. – 75 – 18 – P. 5991-5995.

190. Glock D. Sudden death of feedlot cattle / D. Glock, D. DeGroot // J. Anim. Sci. – 1998. – 76 – P. 315-319.

191. Goldstein J. Clostridium perfringens Epsilon Toxin increases the small intestinal permeability in mice and rats / J. Goldstein, W.E. Morris, C.F.

Loidl, C. Tironi-Farinatti, B.A. McClane, F.A. Uzal, M.E. Fernandez-Miyakawa // Plos ONE. – 2009. – 4 – 9 – P. 1-11.

192. Gurjar A. Characterization of Toxin Plasmids in Clostridium perfringens type C isolates / A. Gurjar, J. Li, B.A. McClane // Infection and Immunity. – 2010. – 78 – 11 – P. 4860-4869.

193. Gurjar A.A. Expression, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of recombinant Clostridium perfringens β2-toxin / A.A. Gurjar, N.H. Yennawar, H.P. Yennawar, K.R. Rajashankar, N.V. Hegde, B.M. Jayarao // Acta Cryst. – 2007. – 63 – P. 484-487.

194. Gurtner C. Rapid cytopathic effects of Clostridium perfringens Beta-Toxin on porcine endothelial cells / C. Gurtner, F. Popescu, M. Wyder, E. Sutter, F. Zeeh, J. Frey, C. von Schubert, H. Posthause // Infection and Immunity. – 2010. – 78 – 7 – P. 2966-2973.

195. Hadad J.J. The role of K antigens of Enteropathogenic Escherichia coli in colonization of the small intestine of calves / J.J. Hadad, C.L. Gyles // Can.J.comp. Med. – 1982. – 46 – P. 21-26.

196. Hariharan H. Antibiotic resistance among enterotoxigenic Escherichia coli from piglets and calves with diarrhea / H. Hariharan, M. Coles, D. Poole, Page // Can. vet. J. – 2004. – 45 – P. 605-606.

197. Hariharan H. Resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole of Escherichia coli isolated from pigs and calves with diarrhea / H. Hariharan, J.W. Bryenton, J.St. Onge, J.R. Long, M.O. Ojo // Can. Vet. J. – 1989. – 30 – P. 348-349.

198. Hatheway C.L. Toxigenic Clostridia / C.L. Hatheway // Clin. Microb. Rev. – 1990. – 3 – 1 – P. 77-81.

199. Hatheway C.L. Toxigenic Clostridia / C.L. Hatheway // Clin. Microbiol. Rev. – 1990. – 3 – P. 66-98.

200. Holland R.E. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals / R.E. Holland // Clinical Microbiology Reviews. – 1990. – 3 – 4 – P. 345-375.

201. Hornitzky M.A. Virulence properties and serotypes of Shiga toxin-producing Escherichia coli from healthy Australian cattle / M.A. Hornitzky, B.A. Vanselow, K. Walker, K.A. Bettelheim, B. Corney, P. Gill, G. Bailey, S.P. Djordjevic // Applied and Environmental Microbiology. – 2002 – 68 – 12 – P. 6439-6445.

202. Hunter S.E. Cloning and nucleotide sequence analysis of the Clostridium perfringens epsilon-toxin gene and its expression in Escherichia coli / S.E. Hunter, I.N. Clarke, D.C. Kelly, R.W. Titball // Infect. Immun. – 1992. – 60 – P. 102-110.

203. Ivany J. Determination of the role of Clostridium perfringens type A in intraluminal intestinal hemorrhage syndrom in dairy cows / J. Ivany, D.E. Anderson, M.D. Miesner // Can. Vet. J. – 2001. – 14 – 3 – P. 2341-2348.

204. Jelinski M. The relationsgip between the presence of Helicobacter pylori, Clostridium perfringens type A, Campylobacter spp., or fungi and fatal abomasal ulcers in unweaned calves / M. Jelinski, R. Carl, M. Chirino-Trejo, E. Janzen // Can. Vet. J. – 1995. – 36 – P. 379-382.

205. Jelinski M.D. The relationship between the presence of Helicobacter pylori, Clostridium perfringens type A, Campylobacter spp, or fungi and fatal abomasal ulcers in unweaned beef calves / M.D. Murray, C.S. Ribble, M. Chirino-Trejo, E.G. Clark, E.D. Janzen // Can. Vet. J. – 1995. – 36 – P. 379-382.

206. Johnson A.M. Heat-Labile Enterotoxin Promotes *Escherichia coli* Adherence to Intestinal Epithelial Cells / A.M. Johnson, R.S. Kaushik, D.H. Francis et al. // J. Bacteriol. – 2009. – 191(1). – P. 178-186.

207. Jordi B.J. Sensitivity of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) strains for colicins under different experimental conditions / B.J. Jordi, K. Boutaga, C.M.V. Heeswijk // FEMS Microbiol. Lett. – 2001. – 204. – P. 329-334.

208. Karmali M.A. Infection by Verocytotoxin-Producing Escherichia coli^{+} / M.A. Karmali // Clinical Microbiology Reviewes. – 1989. – 2 – 1 – P. 15-38.

209. Katayama S.B. Genome mapping of Clostridium perfringens strains with I-CeuI shows many virulence genes to be plasmid-borne / S.B. Katayama, B. Dupuy, T. Garnier, S.T. Cole // Mol. Gen. Genet. – 1996. – 251 – P. 720-726.

210. Kirkpatrick M.A. Jejunal hemorrhage syndrome of dairy cattle / M.A. Kirkpatrick, L.L. Timms, K.W. Kersting, J.M. Kinyon // Bovine Pract. – 2001. – 35 – P. 104-116.

211. Lebrun M. The expression of Clostridium perfringens consensus beta2-toxin is associated with bovine entrotoxaemia syndrome / M. Lebrun, P. Filee, B. Mousset, D. Desmecht, M. Galleni / Vet. Microbiol. – 2007. – 120 – P. 151-157.

212. Leslie D. Phoshpolipase C and hemolytic activities os Clostridium perfringens alpha-toxin cloned in Escherichia coli sequence and homology with a Baccillus cereus phospholipase C / D. Leslie, N. Fairweather, D. Pickard, G. Dougan, M. Kehoe // Mol. Microbiol. – 1989. – 3 – P. 383-392.

213. Li J. Sialidases affect the host cell adherence and epsilon toxin-induced cytotoxicity of Clostridium perfringens type D strain CN3718 / J. Li, S. Sayeed, S. Robertson, J. Chen, B.A. McClane // Plos ONE. – 2011. – 7 – 12 – P. 1-20.

214. Lindstrom M. Novel insights into the epidemiology of Clostridium perfringens type A food poisoning / M. Lindstrom, A. Heikinheimo, P. Lahti, H. Korkeala // Food Microbiol. – 2011. – 28 – P. 192-198.

215. Lofstedt J. Comparison of efficacy of sulbactam: Ampicillin to ampicillin and saline for treatment of experimentally induced Escherichia coli diarrea in neonatal calves / J. Lofstedt, L. Miller, G. Duizer, J. Daley // Can J Vet Rec. – 1996. – 60 – P. 210-215.

216. Lorenz I. Calf health from birth to weaning. Management of diarrhoea in pre-weaned calves / I. Lorenz, J. Fagan, S.J. More // Irish Veterinary Journal. – 2011. – 64 – 9 – P. 1-6.

217. Ma M. The VirS/VirR two-component system regulates the anaerobic cytotoxicity, intestinal pathogenicity, and enterotoxemic lethality of Clostridium

perfringens type C isolate CN3685 / M. Ma, J. Vidal, J. Saputo, B.A. McClane, F. Uzal // mBio. – 2011. – 2 – 1 – P. 1-9.

218. MacLennan J.D. The histotoxic Clostridial infections of man / J.D. MacLennan // Infection and Immunity. – 1962. – 26 – P. 177-184.

219. Manteca C. A role for the Clostridium perfringens beta-2 toxin in bovine enterotoxemia / C. Manteca, G. Daube, T. Jauniaux // Vet. Microbiol. – 2002. – 86 – P. 191-202.

220. Matsushita O. Purification and characterization of a Clostridium perfringens 120-kilodalton collagenase and nucleotide sequence of the corresponding gene / O. Matsushita, K. Yoshihara, S. Katayama, J. Minami,. Okabe // J. Bacteriol. – 1994. – 176 – P.149-156.

221. Montgomerie R.F. Clostridium perfringens (Cl. Welchii) enterotoxaemia in the ruminant / R.F. Montgomerie // Can. Vet. Jour. – 1961. – 2 – 12 – P. 439-450.

222. Morin M. Pathological and microbiological observations made on spontaneous cases of acute neonatal calf diarrhea / M. Morin, S. Lariviere, R. Lallier // Can. J. comp. Med. – 1976. – 40 – P. 228-240.

223. Mouricout M.A. Pilus-mediated binding of bovine enterotoxigenic Escherichia coli to calf small intestinal mucins / M.A. Mouricout, R.A. Julien // Infection and Immunity. – 1987. – 55 – 5 – P. 1216-1223.

224. Moxley R.A. Natural and experimental infection with an attaching and effacing strain of Escherichia coli in calves / R.A. Moxley, D.H. Francis // Infection and Immunity. – 1986. – 53 – 2 – P. 339-346.

225. Murinda S.E. Evaluation of colicins for inhibitory activity against diarrheagenic *Escherichia coli* strains, including serotype O157:H7 / S.E. Murinda, R.F. Roberts, R.A. Wilson // Appl. Environ. Microbiol. – 1996. – 62. – P. 3196-3202.

226. Nagahama M. Binding component of Clostridium perfringens iota-toxin induces endocytosis in Vero cells / M. Nagahama, K. Nagayasu, K. Kobayashi, J. Sakurai // Infect. Immun. – 2002. – 70 – P. 1909-1914.

227. Nagahama M. Biological activities and pore formation of Clostridium perfringens beta toxin in HL 60 cells / M. Nagahama, S. Hayashi, S. Morimitsu, J. Sakurai // J. Biol. Chem. – 2003. – 278. – P. 36934-36941.

228. Nagahama M. Characterization of the enzymatic component of Clostridium perfringens Iota-Toxin / M. Nagahama, Y. Sakaguchi, K. Kobayashi, S. Ochi, J. Sakurai // Jour. Bacter. – 2000. – 182 – 8 – P. 2096-2103.

229. Nagahama M. Clostridium perfringens beta-toxin is sensitive to thiol-group modification but djes not require a thiol group for lethal activity / M. Nagahama, A. Kihara, T. Miyawaki, M. Mukai, Y. Sakaguchi // Biochim. Biophys. Acta. – 1999. – 1454 – P. 97-105.

230. Nagahama M. Clostridium perfringens Iota-Toxin b induces rapid cell necrosis / M. Nagahama, M. Umezaka, M. Oda, K. Kobayashi, S. Tone, T. Suda, K. Ishidoh, J. Sakuria //Infect. Immun. – 2011. – 79 – 11 – P. 4353-4360.

231. Naylor J.M. Severity and nature of acidosis in diarrheic calves over and under one week of age / J.M. Naylor // Can Vet J.- 1987. – 28 – 4 – P. 168-173.

232. Nguyen T.D. Virulence factors in Escherichia coli isolated from calves with diarrhea in Vietnam / T.D. Nguyen, T.T. Vo, H. Vu-Khac // Journal of veterinary science. – 2010. – 12 – 2 – P. 159-164.

233. Niilo L. Bovine Enterotoxemia. Experimental reproduction of the disease / L. Niilo, R.E. Moffatt, R.J. Avery // Can. Vet. Journal. – 1963. – 4 – 11 – P. 288-298.

234. Niilo L. Bovine Enterotoxemia. Factors affecting the stability of the toxins of Clostridium perfringens type A, C and D / L. Niilo // Can. Vet. Journal. – 1965. – 6 – 2 – P. 38-42.

235. Niilo L. Clinical and antibody responses to Clostridium perfringens type A enterotoxin in experemental sheep and calves / L. Niilo, H.J. Cho // Can. J. Comp. Med. – 1985. – 49 – P. 145-148.

236. Niilo L. Clostridium perfringens in animal disease: A reveiew of current knowledge / L. Niilo // Can. Vet. J. – 1980. – 21 – 5 – P. 141-148.

237. Niilo L. Clostridium perfringens type C enterotoxemia / L. Niilo // Can. Vet. Journal. – 1988. – 29 – P. 658-664.

238. Niilo L. Enterotoxigenic Clostridium perfringens type A isolated from intestinal contents of cattle, sheep and chickens / L. Niilo // Can. J. comp. Med. – 1978. – 42 – P. 357-363.

239. Niilo L. Measurement of biological activities of purified and crude enterotoxin of Clostridium perfringens / L. Niilo // Infect. Immunit. – 1975. – 12 – 2 – P. 440-442.

240. Niilo L. Toxigenic characteristics of Clostridium perfringens type C in enterotoxemia of domestic animals / L. Niilo // Can. J. Vet. Res. – 1987. – 51 – P. 224-228.

241. Nillo L. Clostridium perfringens type C in hemorrhagic enterotoxemia of neonatal calves in Alberta / L. Niilo, W.N. Harries, G.A. Jones // Can. Vet. Jour. – 1974. – 15 – 8 – P. 224-226.

242. Nowell V.J. Genome sequencing and analysis of a type A Clostridium perfringens isolate from a case of bovine Clostridial Abomasitis / V.J. Nowell, A.M. Kropinski, J.G. Songer, J.I. Maclnnes, V.R. Parreira, J.F. Prescott // PloS ONE. – 2012 – 7 – 3 – P. 1-8.

243. OgilvieT.H. Laboratory diagnosis of enteropathogenic Escherichia coli in calves / T.H. Ogilvie, R.A. Curtis, D.G. Butler, G.K. Macleod // Can Vet J. – 1982. – 23 – P. 307.

244. Oswald E. Typing of Intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic Escherichia coli: characterization of a new intimin variant / E. Oswald, H. Schmidt, S. Morabito, H. Karch, O. Marches, A. Caprioli // Infection and Immunity. – 2000. – 68 – 1 – P. 64-71.

245. Percival D.A. Anti-Idiotypic antibody-induced protection against Clostridium perfringens type D / D.A. Percival, A.D. Shuttleworth, E.D. Williamson, D.C. Kelly // Infect. Immun. – 1990. – 58 – 8 – P. 2487-2492.

246. Petit L. Cl.perfringens toxinotype and genotype /L. Petit, M. Gibert, M.R. Popoff //Trends Microb.-1999.-7.-P. 104-110.

247. Petit L. Clostridium perfringens Epsilon-Toxin acts on MDCK cells by forming a large membrane complex / L. Petit, M. Gibert, D. Gillet, C. Laurent-Winter, P. Boquet, M.R. Popoff // Journal of Bacteriology. – 1997. – 179 – 20 – P. 6480-6487.

248. D. 0157:H7 and 0104:H4 vero/shiga toxin-producing Escherichia coli outbreaks: respective role of cattle and humans / D. Pierard, H.D. Greve, F. Heasebrouck, J. Mainil // Veterinary Research. – 2012. – 43 – 13 – P. 1-12.

249. Pons J.L. Esterase electrophoretic polymorphism of human and animal strains of Clostridium perfringens / J.L. Pons, B. Picard, P. Niel, G. Leluan, P. Goullet // Applied and Enviromental Microb. – 1993. – 59 – 2 – P. 496-501.

250. Roeder B.L. Isolation of Clostridium perfringens from neonatal calves with ruminal and abomasal tympany, abomasitis and abomasal ulceration / B.L. Roeder, M.M. Chengappa, T.G. Nagaraja, T.B. Avery, G.A. Kennady // J. Am Vet. Med. Assoc. – 1987. – 190 – P. 1550-1555.

251. Rood J.I. Molecular genetics and pathogenesis of Clostridium perfringens / J.I. Rood, S.T. Cole // Microb. Rev. – 1991. – 55 – 4 – P. 621-648.

252. Rood J.I. Virulence genes of Clostridium perfringens / J.I. Rood // Annu. Rev. Microbiology. – 1998. – 52 – P. 333-360.

253. Rooney A.P. Analysis of core housekeeping and virulence genes reveals cryptic lineages of Clostridium perfringens that are associated with distsinct disease presentations / A.P. Rooney, J.L. Swezey, R. Friedman, D.W. Hecht, C.W. Maddox // Genetics Society of America. – 2006. – 172 – P. 2081-2092.

254. Sakurai J. Clostridium perfringens Iota-Toxin: structure and function / J. Sakurai, M. Nagahama, M. Oda, H. Tsuge, K. Kobayashi // MDPI. J. – 2009. – 1 – P. 208-228.

255. Sakurai J. Purification of Beta-Toxin from Clostridium perfringens type C / J. Sakurai, C.L. Duncan // Infect. Immun. – 1977. – 18 – 3 – P. 741-745.

256. Savic B. Enteritis associated with Clostridium perfringens type A in 9-month-old calves / B. Savic, R. Prodanovic, V. Ivetic, O. Radanovic, J. Bojkovski // Can. Vet. J. – 2012. – 53 – P. 174-176.

257. Sayeed S. Characterization of virulence plasmid diversity among Clostridium perfringens type B isolates / S. Sayeed, J. Li, B.A. McClane // Infection and Immunity. – 2010. – 78 – 1 – P. 495-504.

258. Schumann F.J. Risk factors for mortality from diarrhea in beef calves in Alberta / F.J. Schumann, H.G.G. Townsend, J.M. Naylor // Can. J. Vet. Rec. – 1990. – 54 – P. 366-372.

259. Sears C.L. Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion / C.L. Sears, J.B. Kaper // Microbiol. Rev. – 1996. – 60. – P. 167-215.

260. Sengupta N. Comparative proteomic analysis of extracellular proteins of Clostridium perfringens type A and type C strains / N. Sengupta, S.I. Alam, B. Kumar, R.B. Kumar, V. Gautam, S. Kumar, L. Singh // Infection and Immunity. – 2010. – 78 – 9 – P. 3957-3968.

261. Shaw D.J. Shedding patterns of verocytotoxin-producing Escherichia coli strains in a cohort of calves and their dams on a Scottish beef farm / D.J. Shaw, C. Jenkins, M.C. Pearce, T. Cheasty, G.J. Gunn, G. Dougan, H.R. Smith, M.E.J. Woolhouse, G. Frankel // Applied and Environmental Microbiology. – 2004. – 70 – 12 – P. 7456-7465.

262. Shere J.A. Longitudinal study of Escherichia coli O157:H7 dissemination on four dairy farms in Wisconsin / J.A. Shere, K.J. Bartlett, C.W. Kaspar // Applied and environmental Microbiology. – 1998. – 64 – 4 – P. 1390-1399.

263. Sherman D.M. Protection of calves against fatal enteric colibacillosis by orally administered Escherichia coli K99-specific monoclonal antibody / D.M. Sherman, S.D. Acres, P.L. Sadowski, J.A. Springer, B. Bray, T.J.G. Raybould, C.C. Muscoplat // Infection and Immunity. – 1983. – 42 – 2 – P. 653-658.

264. Sivaswamy G. The prevalence of enterotoxigenic Escherichia coli in the feces of calves with diarrhea / G. Sivaswamy, C.L. Gyles // Can.J. comp.Med. – 1976. – 40 – P. 241-246.

265. Slavic D. Antimicrobial susceptibility of Clostridium perfringens isolates of bovine, chicken, porcine, and turkey origin from Ontario / D. Slavic, P. Boerlin, M. Fabri, K.C. Klotins, J.K. Zoethout, P.E. Weir, D. Bateman // Can. Jour. Vet. Res. – 2011. – 75 – P. 89-97.

266. Smedly J.G. The enteric toxins of Clostridium perfringens / J.G. Smedly, D.J. Fisher, S. Sayeed, G. Chakrabarti, B.A. McClane // Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. – 2004. – 152 – P. 183-204.

267. Songer J.G. Clostridial abomasitis in calves: Case report and review of the literature / J.G. Songer, D.W. Miskimins // Anaerob. – 2005. – 11 – P. 290-294.

268. Songer J.G. Clostridial enteric diseases of domestic animals / J.G. Songer // Clin. Microbiol. Rev. – 1996. – 9 – P. 216-234.

269. Songer J.G. Enteric Clostridia / J.G. Songer, C.L. Gyles, J.F. Prescott, C.O. Thoen // Pathogenesis of bacterial infection in animals. – 2010. – 4. – P. 211-218.

270. Songer J.G. Histotoxic Clostridia / J.G. Songer, C.L. Gyles, J.F. Prescott, C.O. Thoen // Pathogenesis of bacterial infection in animals. – 2010. – 4. – P. 203-204.

271. Stiles B.G. Purification and characterization of Clostridium perfringens Iota toxin: Dependence on two nonlinked proteins for biological activity / B.G. Stiles, T.D. Wilkins // Infect. Immun. – 1986. – 54 – 3 – P. 683-688.

272. Sylvia L. A retrospective diagnostic laboratory survey of antimicrobial resistance in fecal Escherichia coli isolated from spring calves in western Canada / L. Sylvia, R.J. Campbell, C.L. Waldner, P.M. Dowling, M. Chirino-Trejo // CVJ. – 2010. – 51 – P. 1283-1286.

273. Thornton J.R. Studies on diarrhea in neonatal calves: The plasma proteins of normal and diarrheic calves during the first ten days of age / J.R.

Thornton, R.A. Willoughby, B.J. McSherry // Can.J.comp. Med. – 1972. – 36 – P. 17-25.

274. Titball R.W. Molecular cloning and nucleotide sequence of the Alpha-Toxin (Phospholipase C) of Clostridium perfringens / R.W. Titball, S.E.C. Hunter, K.L. Martin, B.C. Morris, A.D. Shuttleworth, T. Rubidge, D.W. Anderson, D.C. Kelly // Infect. Immun. – 1989. – 57 – 2 – P. 367-376.

275. Titball R.W. The Clostridium perfringens alpha-toxin / R.W. Titball, C.E. Naylor, A.E. Basak // Anaerobe. – 1999. – 5 – P. 51-64.

276. Uzal F.A. Development and application of new mouse model to study the pathogenesis of Clostridium perfringens type C enterotoxemias / F.A. Uzal, J. Saputo, S. Sayeed, J.E. Vidal, D.J. Fisher, R. Poon, V. Adams, M.E. Fernandez-Miyakawa, J.I. Rood, B.A. McClane // Infection and Immunity. – 2009. – 77 – 12 – P. 5291-5299.

277. Uzal F.A. Recent progress in understending the pathogenesis of Clostridium perfringens type C infections / F.A. Uzal, B.A. McClane // Vet. Microbiol. – 2011. – 153 – P. 37-43.

278. Van Kruiningen H.J. Clostridial abomasal disease in Connecticut dairy calves / H.J. Van Kruiningen, C.A. Nyaoke, I.F. Sidor, J.J. Fabis, L.S. Hinckley, K.A. Lindell // CVJ. – 2009. – 50 – P. 857-860.

279. Vance H.N. Clostridium perfringens as a pathogen of cattle: a literature review / H.N. Vance // Can. J. comp. Med. Vet. Sci. – 1967. – 31 – P. 248-250.

280. Varshney B.C. Development of a monoclonal antibody-based co-agglutination test to detect enterotoxigenic Escherichia coli isolated from diarrhetic neonatal calves / B.C. Varshney, N.M. Ponnanna, P.A. Sarkar, P. Rehman, J.H. Shah // Journal of veterinary science. – 2007. – 8 – 1 – P. 57-64.

281. Vidal J.E. Contact with enterocyte-like Caco-2 cells induces rapid upregulation of toxin production by Clostridium perfringens type C isolates / J.E. Vidal, K. Ohtani, T. Shimizu, B.A. McClane // NIP-PA Author Manuscript. – 2009. – 11 – P. 1306-1328.

282. Vidal J.E. Effects of Clostridium perfringens Beta-Toxin on the rabbit small intestine and colon / J.E. Vidal, B.A. McClane, J. Saputo, J. Parker, F.A. Uzal // Infection and Immunity. – 2008. – 76 – 10 – P. 4396-4404.

283. Wilson J.B. A case-control study of selected pathogens including verocytotoxigenic Echerichia coli in calf diarrhea on an Ontario Veal Farm / J.B. Wilson, S.A. McEwen, R.C. Clarke, K.E. Leslie, D. Waltner-Toews, C.L. Gyles // Dep. of Veter. Microb. and Immunology. – 1991. – 56 – P. 184-188.

284. Yoo H.S. Molecular typing and epidemological survay of prevalence of Clostridium perfringens types by multiplex PCR / H.S. Yoo, S.U. Lee, K.Y. Park, Y.H. Park // J. Clin Microbiol. – 1997. – 35 – P. 228-232.

285. Zhang W. Genetic Fusions of Heat-Labile (LT) and Heat-Stable (ST) Toxoids of Porcine Enterotoxigenic *Escherichia coli* Elicit Neutralizing Anti-LT and Anti-STa antibodies / W. Zhang, C. Zhang, D.H. Francis et al. // Infect. Immun. – 2010. – 78(1). – P. 316–325.

СПИСОК ИЛЛЮСТРИРОВАННОГО МАТЕРИАЛА

Таблицы:

1. Результаты бактериологического исследования патологического материала от телят, больных желудочно-кишечными заболеваниями (с. 54).

2. Схема гипериммунизации быков-продуцентов антигенами бактерий *Cl. perfringens* и *E. coli* (с. 62).

3. Специфическая активность гипериммунных сывороток, полученных разными схемами иммунизации быков-продуцентов антигенами *Cl. perfringens* и *E. coli* (с. 63).

4. Показатели специфической активности экспериментальных серий полиспецифической сыворотки (с. 64).

5. Превентивные свойства гипериммунной сыворотки на белых мышах по отношению к бактериям *Cl. perfringens* и *E. coli* (с. 66).

6. Оптимальные лечебные дозы полиспецифической гипериммунной сыворотки (с. 68).

7. Оптимальные профилактические дозы полиспецифической гипериммунной сыворотки (с. 69).

8. Показатели эффективности применения сыворотки гипериммунной против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят с профилактической целью в производственных условиях (с. 72).

9. Показатели эффективности применения сыворотки гипериммунной против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят с лечебной целью в производственных условиях (с. 73).

10. Показатели экономической эффективности применения гипериммунной сыворотки с профилактической целью (с. 76).

11. Показатели экономической эффективности применения гипериммунной сыворотки с лечебной целью (с. 77).

Рисунки:

1. Геморрагическое воспаление слизистой оболочки кишечника (с. 51).
2. Сычуг после вскрытия, содержит большое количество свернувшегося молозива (с. 51).
3. Инфильтраты в почке (с. 52).
4. Незначительное увеличение селезенки (с. 52).

ПРИЛОЖЕНИЕ

Приложение А

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2523389

СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ГИПЕРИММУННОЙ СЫВОРОТКИ ПРОТИВ АНАЭРОБНОЙ ЭНТЕРОТОКСЕМИИ И ЭШЕРИХИОЗНОЙ ДИАРЕИ ТЕЛЯТ

Патентообладатель(ли): ***Федеральное государственное бюджетное учреждение "Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности" (ФГБУ "ФЦТРБ-ВНИВИ") (RU)***

Автор(ы): ***см. на обороте***

Заявка № **2013124364**

Приоритет изобретения **27 мая 2013 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации ***23 мая 2014 г.***

Срок действия патента истекает **27 мая 2033 г.**

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности

Б.П. Симонов

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ (РОСПАТЕНТ) ОГРН 1047730015200 ИНН 7730176088 КПП 773001001

Продолжение приложения А

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 523 389** (13) **C1**

(51) МПК
A61K 39/08 (2006.01)
A61K 39/108 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

(12) ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

(21)(22) Заявка: **2013124364/15, 27.05.2013**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
27.05.2013

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: **27.05.2013**

(45) Опубликовано: **20.07.2014** Бюл. № **20**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **RU 2428202 C1,10.09.2011. RU 2001134232 A, 27.07.2003. UA 30128 U, 11.02.2008. WO 1996010420 A1, 11.04.1996. ГАФФАРОВ Х.З. Решение проблемы защиты новорожденных телят и поросят от инфекционнойдиареисмешаннойэтиологии. Слагаемые эффективного агробизнеса: обобщение опыта и рекомендации / Татар. ин-т сел. хоз-ва. - Казань, 2006; Ч. 2; Кормопроизводство и животноводство. - С. 223-229**

Адрес для переписки:
420075, г.Казань, Научный городок, 2, ФГБУ "ФЦТРБ-ВНИВИ", Ученому секретарю Степанову В.И.

(72) Автор(ы):
Иванов Аркадий Васильевич (RU),
Спиридонов Геннадий Николаевич (RU),
Иванов Александр Аркадьевич (RU),
Насертдинов Динар Дамирович (RU),
Спиридонов Антон Геннадьевич (RU),
Махмутов Айдар Фаритович (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Федеральное государственное бюджетное учреждение "Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности" (ФГБУ "ФЦТРБ-ВНИВИ") (RU)

RU 2523389 C1

(54) СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ ГИПЕРИММУННОЙ СЫВОРОТКИ ПРОТИВ АНАЭРОБНОЙ ЭНТЕРОТОКСЕМИИ И ЭШЕРИХИОЗНОЙ ДИАРЕИ ТЕЛЯТ

(57) Формула изобретения

Способ получения гипериммунной сыворотки против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят, включающий гипериммунизацию быков-продуцентов инактивированными антигенами C1. perfringens, содержащими анатоксины и соматические антигены бактерий серотипов А, С и Д в культуральной среде при следующем соотношении компонентов на 1 л антигена:

анатоксин и соматический антиген штамма №28 (тип А) в культуральной среде с концентрацией 10^{12}·(9-10) м.к. в 1 $см^3$, $см^3$ - 300,0-350,0;

анатоксин и соматический антиген штамма №392 (тип С) в культуральной среде с концентрацией 10^{12}·(9-10) м.к. в 1 $см^3$, $см^3$ - 300,0-350,0;

анатоксин и соматический антиген штамма №213 (тип Д) в культуральной среде с концентрацией 10^{12}·(9-10) м.к. в 1 $см^3$, $см^3$ - 300,0-350,0;

Продолжение приложения А

формалин, $см^3$ - 4,0-5,0,

проводят дополнительную гипериммунизацию быков-продуцентов инактивированными антигенами E.coli, содержащими соматические и адгезивные антигены К99, А20 в физиологическом растворе, ТЛ-, ТС-анатоксины E.coli в среде культивирования при следующем соотношении компонентов на 1 л антигена:

соматический и адгезивный антиген штамма КВ-1 (К99) в физиологическом растворе с концентрацией 10^{12}·(14-15) м.к. в 1 $см^3$, $см^3$ - 300,0-350,0;

соматический и адгезивный антиген штамма ПЗ-3 (А20) в физиологическом растворе с концентрацией 10^{12}·(14-15) м.к. в 1 $см^3$, $см^3$ - 300,0-350,0;

формалин, $см^3$ - 4,0-5,0;

термостабильные и термолабильные анатоксины штаммов E. coli КВ-1 и ПЗ-3 в культуральной среде с титрами в РДП 1:8-1:16, л - до 1, а гипериммунизацию быков-продуцентов проводят четырехкратно путем подкожного введения дозы в область шеи с одной стороны антигена C1. perfringens и в область шеи с другой стороны - дозы антигена E.coli по следующей схеме: в первый день - по 8 $см^3$, через 14 дней - по 10 $см^3$, через 28 дней - по 15 $см^3$ и через 42 дня - по 20 $см^3$ с последующим взятием крови, затем отделяют сыворотку и консервируют.

RU 2523389 C1

Приложение Б

СОГЛАСОВАНО:
Начальник Главного управления ветеринарии КМ РТ

_____ А.Г. Хисамутдинов
«12» февраля 2015г.

УТВЕРЖДАЮ:
Директор ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», чл.-корр. РАН, профессор

_____ А.В. Иванов
«03» февраля 2015 г.

СЫВОРОТКА ГИПЕРИММУННАЯ ПРОТИВ АНАЭРОБНОЙ ЭНТЕРОТОКСЕМИИ И ЭШЕРИХИОЗНОЙ ДИАРЕИ ТЕЛЯТ

ТЕХНИЧЕСКИЕ УСЛОВИЯ
ТУ 9384-003-00492374-2015

Срок введения с «___» _____20__ г.

Казань – 2015

Продолжение на следующем листе

Продолжение приложения Б

Продолжение титульного листа

Технические условия
ТУ-9384-003-00492374-2015

Разработчики:

Директор ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»,
чл.-корр. РАН, профессор

_____А.В. Иванов
«03» февраля 2015 г.

Старший научный сотрудник
лаборатории ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»,
кандидат биологических наук

_____А.Г. Спиридонов
«03» февраля 2015 г.

Директор научно-исследовательского
института «Био и нанотехнологии»,
доктор биологических наук

_____А.А. Иванов
«03» февраля 2015 г.

Зав. лабораторией по изучению болезней
молодняка ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»,
доктор биологических наук

_____Г.Н. Спиридонов
«03» февраля 2015 г.

Зам. зав. отделом биобезопасности
ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», доктор
биологических наук, профессор

_____Х.Н. Макаев
«03» февраля 2015 г.

Младший научный сотрудник
лаборатории ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»

_____Д.Д. Насертдинов
«03» февраля 2015 г.

Приложение В

СОГЛАСОВАНО:
Начальник Главного управления ветеринарии КМ РТ
_____ А.Г. Хисамутдинов
«12» февраля 2015г.

УТВЕРЖДАЮ:
Директор ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», чл.-корр. РАН, профессор
_____ А.В. Иванов
«03» февраля 2015 г.

ИНСТРУКЦИЯ
по применению сыворотки гипериммунной против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят

(Организация-разработчик: ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» г. Казань)

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Международное непатентованное наименование: Сыворотка гипериммунная против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят.

2. Лекарственная форма: жидкость для инъекций.

Сыворотка изготовлена путем гипериммунизации клинически здоровых быков-продуцентов концентрированными антигенами бактерий Cl. perfringens серотипов А, С, Д и E. coli, продуцирующими адгезивные антигены К99, А20.

По внешнему виду сыворотка представляет собой слегка опалесцирующая жидкость желтовато-красного цвета. На дне флаконов, особенно при длительном хранении, может наблюдаться выпадение незначительного белкового осадка, легко разбивающегося при взбалтывании.

Сыворотка расфасована по 100 и 200 см^3 в стеклянные флаконы соответствующей вместимости, укупоренные резиновыми пробками, укрепленными алюминиевыми колпачками.

3. Флаконы с сывороткой упакованы в картонные коробки с разделительными перегородками, обеспечивающими их целостность. В каждую коробку вложена инструкция по применению сыворотки.

Срок годности сыворотки 24 месяца с даты выпуска при соблюдении условий хранения и транспортирования.

Запрещено использовать сыворотку по истечении срока годности.

4. Сыворотку хранят и транспортируют в сухом темном месте при температуре от 2^{0}С до 8^{0}С.

5. Сыворотку следует хранить в местах, недоступных для детей.

Продолжение приложения В

6. Сыворотку во флаконах без этикеток, с истекшим сроком годности, с нарушением целостности и/или герметичности укупорки, с измененным цветом и/или консистенции, с наличием посторонних примесей, а также остатки сыворотки, не использованные в течение 4 часов после вскрытия флаконов, бракуют и утилизируют.

II. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

7. Сыворотка вызывает формирование пассивного иммунитета у крупного рогатого скота к возбудителям анаэробной энтеротоксемии – бактериям Cl. perfringens серотипов А, С, Д и эшерихиоза - бактериям E. coli, продуцирующим адгезивные антигены К99, А20, через сутки после введения продолжительностью 12-14 дней.

Сыворотка безвредна, обладает лечебными и профилактическими свойствами.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

8. Сыворотка предназначена для профилактики и лечения анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят в угрожаемых и стационарно неблагополучных хозяйствах.

9. С профилактической целью сыворотку вводят однократно внутримышечно в дозе 2 см^3 на 1 кг массы тела.

С лечебной целью сыворотку вводят внутримышечно в дозе 2,5 см^3 на 1 кг массы тела. При тяжелом течении болезни сыворотку вводят повторно через 1-3 дня в тех же дозах внутрибрюшинно. Суточную лечебную дозу сыворотки следует вводить в 2-3 приема с интервалом 3-4 часа, что обеспечивает лучший терапевтический эффект.

Перед применением сыворотку подогревают на водяной бане до температуры 37-38°С.

Сыворотку вводят с соблюдением правил асептики и антисептики, для введения используют стерильные материалы и инструменты. Для каждого животного используют отдельную иглу. Место инъекции обрабатывают 70%-ным раствором этилового спирта.

10. Наряду с применением сыворотки необходимо проводить в хозяйстве ветеринарно-санитарные мероприятия, направленные на уничтожение инфекционного начала.

11. При применении сыворотки в соответствии с настоящей инструкцией побочных явлений и осложнений, как правило, не отмечается.

12. Рекомендуется применение сыворотки с лечебной целью в сочетании с антибактериальными препаратами.

IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

13. При работе с сывороткой необходимо соблюдать общие правила

Продолжение приложения В

личной гигиены и техники безопасности, предусмотренные при работе с лекарственными средствами ветеринарного назначения.

Все лица, участвующие в проведении лечения животных с сывороткой должны быть одеты в спецодежду (резиновые сапоги, халат, брюки, головной убор, резиновые перчатки) и обеспечены очками закрытого типа. В местах работы должна быть аптечка первой доврачебной помощи.

14. В случае попадания сыворотки на кожу и/или слизистые оболочки их рекомендуется немедленно промыть с большим количеством чистой воды.

При случайном введении сыворотки человеку необходимо место укола обработать 70%-ным раствором этилового спирта и обратиться в медицинское учреждение.

15. Организация-производитель ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности».

420075, Россия, г. Казань, Научный городок 2, тел/факс (843) 239-71-73

16. Инструкция по применению сыворотки гипериммунной против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят разработана в ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности».

420075, Россия, г. Казань, Научный городок 2, тел/факс (843) 239-71-73

Приложение Г

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ДЕПАРТАМЕНТ ВЕТЕРИНАРИИ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ КОНТРОЛЯ,СТАНДАРТИЗАЦИИ И СЕРТИФИКАЦИИ ВЕТЕРИНАРНЫХ ПРЕПАРАТОВ (ВГНКИ)

123022,г.Москва, Д-22
Звенигородское шоссе,5
тел/факс 253 - 14 - 91
18.07.2001г.№ 1150/15

на №_____ от _____ г.

Федеральному институту
промышленной собственности

Россия,121853,Москва,
Бережковская наб.,30

С П Р А В К А
о депонировании энтеротоксигенного штамма "ПЗ-3"
Escherichiae coli -возбудителя эшерихиозной диареи телят

Авторы: Спиридонов Г.Н.,Гаффаров Х.З.(Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт,420075,г.Казань, Научный городок-2).

Эпителиотропный энтеротоксигенный штамм "ПЗ-3" *Escherichiae coli* - возбудителя эшерихиозной диареи выделен в 1992г. из тонкого отдела кишечника больных новорожденных телят из хозяйства "Приволжье" Зеленодольского района Республики Татарстан

По морфологическим,тинкториальным,ферментативным и антигенным свойствам штамм отнесен к сем. *Enterobacteriaceae*,роду *Escherichiae*, виду *Escherichiae coli* .Штамм имеет высокую антигенную активность в РА, имеет группоспецифический и видоспецифический антигены,синтезирует адгезивный антиген А20,инфекционная активность на белых мышах $10^{6,0}$ м.к. $ЛД_{50}$ в лиофилизированном и $10^{5,0}$ м.к. $ЛД_{50}$ в нативном материалах.Штамм производственный,предложен для изготовления вакцины.

Штамм депонирован 28 ноября 2000г.

Регистрационный номер(ссылка) - штамм "ПЗ-3 *Escherichiae coli* - ВНИВИ(г.Казань)-ДЭП" возбудителя эшерихиозной диареи телят во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов,используемых в ветеринарии и животноводстве(Россия,123022,Москва,Звенигородское шоссе,5,ВГНКИ).

Местом хранения штамм "ПЗ-3 *Escherichiae coli* -ВНИВИ(г.Казань)-ДЭП" возбудителя эшерихиозной диареи телят определена Коллекция микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института(Россия,420075,г.Казань,Научный городок-2).

Директор института,
доктор ветеринарных наук,профессор Панин А.Н.

Заместитель заведующего отдела
госконтроля,канд.вет.наук Козырев Ю.А.

Приложение Д

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
ДЕПАРТАМЕНТ ВЕТЕРИНАРИИ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ КОНТРОЛЯ,СТАНДАРТИЗАЦИИ И СЕРТИФИКАЦИИ ВЕТЕРИНАРНЫХ ПРЕПАРАТОВ (ВГНКИ)

123022,г.Москва, Д-22
Звенигородское шоссе,5
тел/факс 253 - 14 - 91
19.07.2001г. № 1156/15

на № _____ от _____ г.

Федеральному институту
промышленной собственности
Роспатента

Россия,121853,Москва,
Бережковская наб.,30

СПРАВКА
о депонировании энтеротоксигенного штамма
Escherichia coli "КВ-I",возбудителя
эшерихиозной диареи поросят

Авторы: Спиридонов Г.Н.,Гаффаров Х.З.(Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт,420075,г.Казань, Научный городок-2).

Эпителиотропный энтеротоксигенный штамм "*Escherichia coli* КВ- возбудителя эшерихиозной диареи выделен в 1996г. из тонкого отдела кишечника больных диареей новорожденных поросят хозяйства "Калининский" Высокогорского района Республики Татарстан.

По морфологическим,тинкториальным,культуральным,ферментативным и антигенным свойствам штамм отнесен к сем. *Enterobacteriaceae* ,роду *Escherichiae* ,виду *Escherichia coli* ;имеет высокую антигенную активность в РА,имеет группоспецифический и видоспецифический антиге ны,синтезирует адгезивный антиген К99.Инфекционная активность на белых мышах -$ЛД_{50}$ $10^{5,0}$ м.к.

Штамм депонирован 28 декабря 2000г.

Регистрационный номер(ссылка) -энтеротоксигенный штамм *Escherich coli* КВ-I-ВНИВИ(г.Казань)-ДЕП" возбудителя эшерихиозной диареи поросят во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов,используемых в ветеринарии и животноводстве(Россия,123022,Москва Звенигородское шоссе,5,ВГНКИ).

Местом хранения энтеротоксигенного штамма "*Escherichia coli* КВ-I ВНИВИ(г.Казань)-ДЕП" возбудителя эшерихиозной диареи поросят определена Коллекция микроорганизмов Всероссийского научно-исследовательского ветеринарного института(Россия,420075,г.Казань,Научный городок 2).

Директор института,
доктор ветеринарных наук,профессор,
академик РАСХН — Панин А.Н.

Заместитель заведующего отдела
госконтроля,канд.вет.наук — Козырев Ю.А.

Приложение Е

Министерство сельского хозяйства РФ
Департамент научно-технологической политики и образования
Федеральное государственное учреждение
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ И РАДИАЦИОННОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ЖИВОТНЫХ
(ФГУ "ФЦТРБ-ВНИВИ")

420075, г. Казань, Научный городок-2 тел. (843) 239-53-20, 239-53-11
тел./факс: (843) 239-71-73, 239-71-33. e-mail: vnivi@tnpko.ru ИНН – 1660022161, КПП – 1660010

"26" 05 2010 № 349 на №_____

П А С П О Р Т
на штамм Escherichia coli «ПЗ-3»

1.Наименование штамма, № или условное обозначение	«ПЗ-3» Escherichia coli, рода Escherichiae, семейства Enterobacteriaceae, синтезирующий адгезивный антиген А20.
2. Кем, когда и от какого животного получен данный штамм	Спиридоновым Г.Н. в 1999 году от больного диареей новорожденного теленка из колхоза «Приволжье» Зеленодольского района РТ
3. Из какого учреждения получен данный штамм и дата получения	
4. Производственный штамм в данное время или музейный	Производственный
5.Примененный способ хранения штамма в учереждении (t, пит. среда)	В лиофилизированном под вакуумом состоянии при – 40 -50^{0}С и нативном в полужидком МПА под вазелиновым маслом при температуре + 4 - 6^{0}С
6. Периодичность пересевов на питательных средах	Один раз в год лиофилизированного, один раз в месяц нативного
7. Культурально-биохимические свойства	Типичные для вида Escherichia coli, рода Escherichiae, семейства Enterobacteriaceae
8.Серологические свойства	Имеет высокую антигенную активность в РА
9.Биологические свойства на лабораторных животных (патогенность)	Естественно восприимчивые: новорожденные телята; лабораторные - белые мыши. LD_{50} для белых мышей составляет 10^5 м. к.
10. Пассажирование через животных соответственного штамму вида (кол-во и дата)	При снижении инфекционной активности (титра) проводят пассажирование штамма на белых мышах
11. На какой среде высылается штамм, количество и род укупорки	Закрытая под вакуумом стеклянная ампула в кол-ве 5шт. Состав среды высушивания: обезжиренное стерильное коровье молоко, pH среды 7,2-7,4
12. Дополнительные сведения о штамме	Стерилен в отношении посторонних патогенных бактерий, грибков и вирусов - контаминантов

Директор ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»,
профессор А.В.Иванов

Приложение Ж

Министерство сельского хозяйства РФ
Департамент научно-технологической политики и образования
Федеральное государственное учреждение
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ И РАДИАЦИОННОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ЖИВОТНЫХ
(ФГУ "ФЦТРБ-ВНИВИ")

420075, г. Казань, Научный городок-2 тел. (843) 239-53-20, 239-53-11
тел./факс: (843) 239-71-73, 239-71-33. e-mail: vnivi@mail.ru ИНН – 1660022161, КПП – 166001(

"24" 11 2010г. № 804 на №_____

П А С П О Р Т
на штамм Escherichia coli «КВ-1»

1.Наименование штамма, № или условное обозначение	«КВ-1» Escherichia coli, рода Escherichiae, семейства Enterobacteriaceae, синтезирующий адгезивный антиген К99.
2. Кем, когда и от какого животного получен данный штамм	Спиридоновым Г.Н. в 1996 году от больного диареей новорожденного теленка из совхоза «Калининский» Высокогорского района РТ
3. Из какого учреждения получен данный штамм и дата получения	
4. Производственный штамм в данное время или музейный	Производственный
5.Примененный способ хранения штамма в учереждении (t, пит. среда)	В лиофилизированном под вакуумом состоянии при – 40 -50^{0}С и нативном в полужидком МПА под вазелиновым маслом при температуре + 4 - 6^{0}С
6. Периодичность пересевов на питательных средах	Один раз в год лиофилизированного, один раз в месяц нативного
7. Культурально-биохимические свойства	Типичные для вида Escherichia coli, рода Escherichiae, семейства Enterobacteriaceae
8.Серологические свойства	Имеет высокую антигенную активность в РА
9.Биологические свойства на лабораторных животных (патогенность)	Естественно восприимчивые: новорожденные телята, поросята; лабораторные - белые мыши. LD_{50} для белых мышей составляет 10^5 м. к.
10. Пассажирование через животных соответственного штамму вида (кол-во и дата)	При снижении инфекционной активности (титра) проводят пассажирование штамма на белых мышах
11. На какой среде высылается штамм, количество и род укупорки	Закрытая под вакуумом стеклянная ампула в кол-ве 5шт. Состав среды высушивания: обезжиренное стерильное коровье молоко, pH среды 7,2-7,4
12. Дополнительные сведения о штамме	Стерилен в отношении посторонних патогенных бактерий, грибков и вирусов - контаминантов

Директор ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»,
профессор А.В.Иванов

Приложение 3

Министерство сельского хозяйства РФ
Департамент научно-технологической политики и образования
Федеральное государственное учреждение
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ И РАДИАЦИОННОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ЖИВОТНЫХ
(ФГУ "ФЦТРБ-ВНИВИ")

420075, г. Казань, Научный городок-2 тел. (843) 239-53-20, 239-53-11
тел./факс: (843) 239-71-73, 239-71-33. e-mail: vnivi@mail.ru ИНН – 1660022161, КПП – 166001001

"26" 05 200 10 г. № 380 на №_____

В Федеральную службу по
интеллектуальной собственности,
патентам и товарным знакам

Бережковская наб.,30, корп. 1,
Москва, Г – 59, ГСП - 5, 123995

СПРАВКА

о депонировании штаммов № 392 возбудителя Clostridium perfringens тип С, № 28 возбудителя Clostridium perfringens тип А, № 213 возбудителя Clostridium perfringens тип D, полученные в 1987 году из ВГНКИ.

1. Наименование организации и адрес депозитора – Федеральное Государственное Учереждение «Федеральный Центр токсикологической и радиационной безопасности – Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт» ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», по адресу 420075, г. Казань, Научный городок – 2.
2. Семейство, род, вид и назначение депонируемых штаммов:
- Bacillaceae, Clostridium, perfringens, тип С № 392;
- Bacillaceae, Clostridium, perfringens, тип А № 28;
- Bacillaceae, Clostridium, perfringens, тип D № 213;

штаммы производственные, предложены для изготовления ассоциированной вакцины против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят.
3. Дата депонирования и регистрационные номера присвоенные штаммам:
- № 392 тип С - 24 мая 2010 года , регистрационный номер № 5;
- № 28 тип А - 24 мая 2010 года , регистрационный номер № 6;
- № 213 тип D - 24 мая 2010года , регистрационный номер № 7;
- ДЕП. в лаборатории музей штаммов микроорганизмов ООБ ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» г. Казань.

Местом хранения штаммов определена лаборатория музей штаммов микроорганизмов ООБ ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», 420075, г. Казань, Научный городок – 2.

Директор ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»,
д.б.н., профессор **А.В.ИВАНОВ**

Приложение И

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Департамент научно-технологической политики и образования
Федеральное государственное учреждение
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ И РАДИАЦИОННОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ЖИВОТНЫХ
(ФГУ "ФЦТРБ-ВНИВИ")

420075, г. Казань, Научный городок-2 тел. (843) 239-53-20, 239-53-11
тел./факс: (843) 239-71-73, 239-71-33. e-mail: vnivi@tnpko.ru ИНН – 1660022161, КПП – 16600100

"____"_____200__г. №_____ на №_____

П А С П О Р Т
Clostridium perfringens типа А №28

1.Наименование штамма, № или условное обозначение	Clostridium perfringens типа А №28
2. Кем, когда и от какого животного получен данный штамм	Штамм США
3. Из какого учреждения получен данный штамм и дата получения	ВГНКИ, 12 февраля 1987 г.
4. Производственный штамм в данное время или музейный	производственный
5.Примененный способ хранения штамма в учреждении (t, пит. среда)	В лиофилизированном под вакуумом состоянии при – 40 -50^{0}С и нативном в среде Китта-Тароцци при температуре + 4 - 6^{0}С
6. Периодичность пересевов на питательных средах	Один раз в год лиофилизированного, один раз в месяц нативного
7. Культурально-биохимические свойства	Типичные для Clostridium perfringens
8.Серологические свойства	-
9.Биологические свойства на лабораторных животных (патогенность)	Токсичен для белых мышей
10. Пассажирован через животных соответственного штамму вида (кол-во и дата)	Пассажирован через белых мышей 11.02.09 г. и 17.03.10 г.
11. На какой среде высылается штамм, количество и род укупорки	Запаянные под вакуумом стеклянные ампулы в количестве 5шт. Состав среды высушивания: 3% желатины, 2% пептона и 10% сахарозы, pH среды 7,2-7,4
12. Дополнительные сведения о штамме	При сохранении целостности и наличия вакуума содержимое ампулы растворить 2-3 см^3 МПБ и сделать посев на МППБ, МПБ и МПА

Директор ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»
профессор А.В.Иванов

Приложение К

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Департамент научно-технологической политики и образования
Федеральное государственное учреждение
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ И РАДИАЦИОННОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ЖИВОТНЫХ
(ФГУ "ФЦТРБ-ВНИВИ")

420075, г. Казань, Научный городок-2 тел. (843) 239-53-20, 239-53-11
тел./факс: (843) 239-71-73, 239-71-33. e-mail: vnivi@tnpko.ru ИНН – 1660022161, КПП – 16600100

"____"_____200__г. №_____ на №_____

П А С П О Р Т
Clostridium perfringens типа С № 392

1.Наименование штамма, № или условное обозначение	Clostridium perfringens типа С №392
2. Кем, когда и от какого животного получен данный штамм	Читинской обл. вет. бак. лабораторией в 1948 г. от овцы
3. Из какого учреждения получен данный штамм и дата получения	ВГНКИ, 12 февраля 1987 г.
4. Производственный штамм в данное время или музейный	производственный
5.Примененный способ хранения штамма в учреждении (t, пит. среда)	В лиофилизированном под вакуумом состоянии при – 40 -50^{0}С и нативном в среде Китта-Тароцци при температуре + 2-4^{0}С
6. Периодичность пересевов на питательных средах	Один раз в год лиофилизированного, один раз в месяц нативного
7. Культурально-биохимические свойства	Типичные для Clostridium perfringens
8.Серологические свойства	-
9.Биологические свойства на лабораторных животных (патогенность)	Токсичен для кроликов, белых мышей
10. Пассажирован через животных соответственного штамму вида (кол-во и дата)	Пассажирован через белых мышей 11.02.09 г. и 17.03.10 г.
11. На какой среде высылается штамм, количество и род укупорки	Запаянные под вакуумом стеклянные ампулы в количестве 5шт. Состав среды высушивания: 3% желатины, 2% пептона и 10% сахарозы, pH среды 7,2-7,4
12. Дополнительные сведения о штамме	При сохранении целостности и наличия вакуума содержимое ампулы растворить 2-3 см^3 МПБ и сделать посев на МППБ, МПБ и МПА

Директор ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»
профессор А.В.Иванов

Пиложение Л

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Департамент научно-технологической политики и образования
Федеральное государственное учреждение
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ И РАДИАЦИОННОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ЖИВОТНЫХ
(ФГУ "ФЦТРБ-ВНИВИ")

420075, г. Казань, Научный городок-2 тел. (843) 239-53-20, 239-53-11
тел./факс: (843) 239-71-73, 239-71-33. e-mail: vnivi@tnpko.ru ИНН – 1660022161, КПП – 16600100

"____"_____200__г. №_____ на №_____

П А С П О Р Т
Clostridium perfringens типа Д № 213

1.Наименование штамма, № или условное обозначение	Clostridium perfringens типа Д № 213
2. Кем, когда и от какого животного получен данный штамм	Парижским Пастеровским институтом, от овцы
3. Из какого учреждения получен данный штамм и дата получения	ВГНКИ, 12 февраля 1987 г.
4. Производственный штамм в данное время или музейный	производственный
5.Примененный способ хранения штамма в учреждении (t, пит. среда)	В лиофилизированном под вакуумом состоянии при – 40 -50^{0}С и нативном в среде Китта-Тароцци при температуре + 2 - 4^{0}С
6. Периодичность пересевов на питательных средах	Один раз в год лиофилизированного, один раз в месяц нативного
7. Культурально-биохимические свойства	Типичные для Clostridium perfringens
8.Серологические свойства	-
9.Биологические свойства на лабораторных животных (патогенность)	Токсичен для белых мышей
10. Пассажирован через животных соответственного штамму вида (кол-во и дата)	Пассажирован через белых мышей 11.02.09 г. и 17.03.10 г.
11. На какой среде высылается штамм, количество и род укупорки	Запаянные под вакуумом стеклянные ампулы в количестве 5шт. Состав среды высушивания: 3% желатины, 2% пептона и 10% сахарозы, pH среды 7,2-7,4
12. Дополнительные сведения о штамме	При сохранении целостности и наличия вакуума содержимое ампулы растворить 2-3 см^3 МПБ и сделать посев на МППБ, МПБ и МПА

Директор ФГУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»
профессор А.В.Иванов

Приложение М

УТВЕРЖДАЮ:
Директор ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности»,
чл.-корр. РАСХН, профессор

_____А.В.Иванов
«11» июня 2013 г.

АКТ

о производственном испытании гипериммунной сыворотки против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят

от 07 июня 2013 г.

Мы нижеподписавшиеся зав. отделом биобезопасности ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» Чернов А.Н., главный ветеринарный врач ООО «Среднее Девятово» Руслов А.Н., заведующий лабораторией по изучению болезней молодняка ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» Спиридонов Г.Н., главный зоотехник ООО «Среднее Девятово» Щёкотова И.Д., заведующая МТФ Сарбаева И.Г., младший научный сотрудник лаборатории по изучению болезней молодняка ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» Насертдинов Д.Д. составили настоящий акт в том, что нами в период с января по июнь 2013 г. в ООО «Среднее Девятово» Лаишевского района РТ проведено производственное испытание эффективности гипериммунной сыворотки против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят, полученной в условиях хозяйства путем гипериммунизации быков-продуцентов инактивированными антигенами Cl. perfringens (серотипы А, С, Д) и E. coli, синтезирующими адгезивные антигены К99, А20, а также их ТЛ- и ТС-анатоксинами по разработанной в лаборатории схеме гипериммунизации.

Продолжение приложения М

ООО «Среднее Девятово» является стационарно неблагополучным пунктом по анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят. Впервые диагноз на анаэробную энтеротоксемию был поставлен в 2006 г. республиканской ветеринарной лабораторией, позднее он был подтвержден исследованиями сотрудников лаборатории по изучению болезней молодняка ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». Заболевание вызывали бактерии Cl. perfringens серотипа А. Кроме того из патологического материала павших телят были изолированы энтеротоксигенные штаммы E. coli, синтезирующие адгезивные антигены А20.

Учитывая эпизоотическую ситуацию в хозяйстве, нами было принято решение об изготовлении в условиях хозяйства гипериммунной сыворотки против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи и применении ее для пассивной иммунопрофилактики и лечения телят. С этой целью нами получены 2 экспериментальные серии полиспецифической сыворотки в объеме 17 л с титрами специфических антител к Cl. perfringens 1:12800-1:25600 в ИФА и E. coli – 1:3200-1:6400 в РА. Испытание лечебно-профилактических свойств сыворотки проводили на 85 новорожденных телятах, при этом 63 теленка служили в качестве контроля.

С профилактической целью телятам опытной группы сыворотку вводили внутримышечно дозе 2 см^3, с лечебной целью - в дозе 2,5 см^3 на 1 кг массы тела. При тяжелом течении болезни сыворотку вводили повторно через 1-3 дня в тех же дозах внутрибрюшинно. Суточную лечебную дозу сыворотки вводили в 2 приема с интервалом 6 часов. Для лечения больных телят контрольной группы применяли антибиотики и сульфаниламидные препараты согласно инструкции по их применению.

Результаты производственного испытания показали, что гипериммунная сыворотка обладает выраженными лечебно-профилактическими свойствами. Так, в группе телят, обработанной гипериммунной сывороткой, заболело 22 теленка (25,9%), пало 2 (2,35%),

Продолжение приложения М

тогда как в контрольной (интактной) группе заболело 51 (81,0%), 9 (14,3%) пало.

Таким образом, гипериммунная сыворотка против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят обладает выраженными лечебно-профилактическими свойствами. Применение ее с лечебно-профилактической целью в стационарно неблагополучном пункте позволило сохранить 97,6% больных телят, тогда как в контрольной группе, где в качестве лечебных средств применялись антибиотики и сульфаниламидные препараты, сохранность телят составила лишь 85,7%. Следовательно, применение гипериммунной сыворотки позволило повысить сохранность новорожденных телят на 11,9%.

Зав. отделом биобезопасности А.Н.Чернов

Главный ветврач А.Н. Руслов

Заведующий лабораторией Г.Н. Спиридонов

Главный зоотехник И.Д. Щёкотова

Заведующий МТФ И.Г. Сарбаева

Младший научный сотрудник Д.Д.Несертдинов

Приложение Н

Министерство экономики РТ
Республиканский совет общества изобретателей
и рационализаторов РТ

РЕСПУБЛИКА ОИР ТАТАРСТАН

ДИПЛОМ

Лауреата

ежегодного Республиканского конкурса
«Лучшее изобретение года»

Номинация: **«Медицина и ветеринария»**

Награждается авторский коллектив:

**Иванов А.В., Спиридонов Г.Н., Иванов А.А.,
Насертдинов Д.Д., Спиридонов А.Г., Махмутов А.Ф.**

за изобретение:

**«Способ получения гипериммунной сыворотки против анаэробной энтероксимии и эшерихиозной диареи телят»
(патент №2523389)**

Председатель оргкомитета,
Лауреат Госпремии РТ
в области науки и техники Л.Г. Гайсин

Казань 2015 г.