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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата ветеринарных наук

Казань-2018

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (г. Казань)

Научный руководитель	**Спиридонов Геннадий Николаевич** доктор биологических наук, заслуженный ветеринарный врач РТ
Официальные оппоненты	**Порываева Антонина Павловна** доктор биологических наук, ведущий сотрудник отдела мониторингат и прогнозирования инфекционных болезней ФГБНУ «Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр Уральского отделения Российской академии наук»
	Агольцов Валерий Александрович доктор ветеринарных наук, профессор, профессор кафедры «Болезни животных и ветеринарно-санитарная экспертиза» ФГБОУ ВО «Саратовский государственный аграрный университет имени Н.И. Вавилова»
Ведущая организация	ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук»

Защита состоится 28 февраля 2019г. в 12^{00} часов на заседании диссертационного совета Д 220.034.01 при ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» (420029, г. Казань, ул. Сибирский тракт, 35)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана», на сайтах http://www.vak.ed.gov.ru и http:www.казветакадемия.рф

Автореферат разослан «___» _____2019 года

Ученый секретарь
диссертационного совета Галия Расыховна Юсупова

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Выживаемость молодняка крупного рогатого скота является одним из наиболее важных факторов поддержания высокого качества ведения животноводства. Однако рост поголовья крупного рогатого скота сдерживается из-за широкого распространения болезней, особенно среди телят постнатального периода. В структуре заболеваемости новорожденных телят особое место занимают желудочно-кишечные болезни бактериальной и вирусной этиологии, которые чаще всего протекают в виде смешанной инфекции и являются одной из основных причин гибели молодняка в первые дни жизни. По данным отечественных исследователей (Митюшина В.В., 1989; Волкова К.Г., Баранникова В.Д., 1997; Сидорова М.А., Субботина В.В., 1998) 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.

В этиологии этих болезней многими отечественными и иностранными авторами отмечается возрастающее значение бактерий *Clostridium perfringens* и их ассоциаций с другими видами энтеробактерий (Салимов В.А. и соавт., 2002; Нестеров И.А., 2006; Шевченко А.А. и соавт., 2013; Chen J. et all., 2011; Nowell V.J. et all., 2012). Исследованиями сотрудников лаборатории бактерийных инфекций ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» установлено, что анаэробная энтеротоксемия и эшерихиозная диарея широко распространены в скотоводческих хозяйствах Приволжского федерального округа. Часто эти инфекции протекают в смешанной форме (Спиридонов Г.Н., 2010). Для специфической профилактики анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят в ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» разработана ассоциированная вакцина (пат. РФ № 2428202, 2011). Применение вакцины бывает не всегда эффективна по причине того, что по различным причинам 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.

В настоящее время биопредприятиями Российской Федерации выпускаются несколько видов гипериммунных сывороток для специфической профилактики и лечения желудочно-кишечных заболеваний животных, но они в своем составе не содержат специфических антител к бактериям *Cl. perfringens*.

В связи с вышеизложенным, изыскание гипериммунной сыворотки для специфической профилактики и лечения смешанной инфекции – анаэробной

энтеротоксемии и эшерихиозной диареи у телят является актуальной задачей ветеринарной науки и практики.

Степень разработанности проблемы. В настоящее время в нашей стране для специфической прфилактики анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи молодняка сельскохозяйственных животных применяются различные моно- и ассоциированые вакцины отечественного и зарубежного производства (Зароза В.Г. и соавт., 2008; Спиридонов Г.Н. и соавт., 2013). Разработаны и внедрены в производство гипериммунные лечебно-профилактические сыворотки против эшерихиозной диареи. Для лечения анаэробной энтеротоксемии применяются различные антибиотики и химиотерапевтические препараты, которые бывают не всегда эффективны. Есть опыт применения на ранней стадии болезни антитоксической сыворотки в сочетании с антибиотиками. При анаэробной энтеротоксемии телят, вызванной *Cl. perfringens* типа А, используют противогангренозную медицинскую сыворотку. Однако следует отметить, что в этой сыворотке отсутствуют антитела против энтеротоксинов и поэтому ее эффекивность не высока (К.Р. Ургуев, 1987).

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 энтеротоксигенные штаммы *E. coli*, синтезирующие адгезивные антигены К99 и А20, бактерии *Cl. perfringens* и др.

Установлено, что 71,8% патогенных изолятов *E. coli*, вызывающих эшерихиозы новорожденных животных, продуцируют различные адгезивные

антигены. Наиболее часто у больных новорожденных телят до 10-дневного возраста встречаются возбудители с адгезивными антигенами А20 и К99.

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

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

Установлены оптимальные профилактическая и лечебная дозы сыворотки для новорожденных телят. Подтверждена ее эффективность 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» ФГОУ ВПО «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);
- 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 «Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК», посвященной 100-летию Орловской биофабрики (Орел, 2018);

- Международной научно-практической конференции «Перспективы Российской ветеринарной науки», посвященной 60-летию ФГБУ «ВНИИЗЖ» (Владимир, 2018).

Публикация результатов исследований. По теме диссертации опубликовано 11 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.

2 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы исследований

В процессе выполнения работы по разработке гипериммунной лечебно-профилактической сыворотки были использованы:

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. 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.

5. 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 см^3.

Клинико-эпизоотологическому обследованию подвергнуто поголовье крупного рогатого скота в 57 сельскохозяйственных предприятиях, расположенных в регионе Среднего Поволжья, из них 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 неблагополучных хозяйствах проводили согласно рекомендациям, разработанными Бакуловым И.А. и соавт. (1975).

Бактериологическому исследованию подвергнуто 796 проб клинического и патологического материала, полученного от больных и павших телят.

Объектами для исследований служили 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 изучение биологических свойств культур *E. coli* проводилось в соответствии с «Методическими указаниями по бактериальной диагностике колибактериоза (эшерихиоза) животных», утвержденными ГУВ МСХ СССР 01.12.81 г. и «Временными наставлениями по применению агглютинирующих сывороток к адгезивным антигенам эшерихий К88, К99, А20, 987Р и F41», утвержденными ГУВ Госагропрома СССР 27.02.89 г. Серогрупповая принадлежность эшерихий определялась 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 19.05.98 г.

Диагностику анаэробной энтеротоксемии телят проводили согласно «Методическим указаниям по лабораторной диагностике инфекционной энтеротоксемии животных и анаэробной дизентерии ягнят», утвержденным ГУВ МСХ СССР 15.02.1984 г., в двух направлениях: обнаружение токсина *Cl. perfringens* в содержимом тонкого отдела кишечника и выделение культуры возбудителя из патологического материала с последующей проверкой ее токсичности.

Кровь у быков-продуцентов брали в убойном цехе мясокомбината при помощи закрытой системы, исключающей контакт крови с атмосферным воздухом. Отстой сыворотки проводили в холодильной камере при температуре

2-4^{0}С 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.

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

3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Этиологическая структура желудочно-кишечных болезней молодняка крупного рогатого скота в регионе Среднего Поволжья

Проводили изучение этиологической структуры желудочно-кишечных болезней телят в 57 сельскохозяйственных предприятиях Российской Федерации, расположенных в регионе Приволжского Федерального округа, из них в республиках Татарстан - 46, Чувашия – 3, 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.

Характерными признаками смешанного течения анаэробной энтеротоксемии и эшерихиоза являлись диарея, повышение температуры, учащение пульса и дыхания. Отмечались судороги, расстройство 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 ч 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. Содержимое кишечника темно-красного цвета с пузырьками газа. Брыжеечные лимфатические узлы отечны, гиперемированы. Печень незначительно увеличена, дряблая, серо-желтоватого цвета с красноватыми пятнами. Желчный

пузырь большой, часто был наполнен и растянут. Сердце переполнено кровью, имелись мелкоточечные кровоизлияния под эпикардом и на эндокарде. В почках наблюдали инфильтраты.

При бактериологическом исследовании патологического материала от больных и павших телят изолировали 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.

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.

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 процессе выполнения работы по разработке лечебно-профилактической сыворотки были использованы 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 *Escherichiae coli* выделены сотрудниками лаборатории бактерийных инфекций ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» от павших новорожденных телят. По морфологическим, тинкториальным, ферментативным и антигенным свойствам они отнесены к сем. *Enterobacteriaceae*, роду *Escherichiae*, виду *Escherichiae coli*; имеют высокую антигенную активность в РА, имеют группоспецифические и видоспецифические антигены, синтезируют адгезивные антигены. Штаммы депонированы 28 ноября 2000 г. во Всероссийской государственной коллекции штаммов микроорганизмов, используемых в ветеринарии и животноводстве (Россия, 123002, Москва,

Звенигородское шоссе, 5, ВГНКИ) под регистрационными номерами: 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

Для изготовления клостридиозных компонентов, необходимых для гипериммунизации животных, производственные штаммы *Cl.perfringens* №28, №392, №213 выращивали на мясо-печеночно-казеиновой среде с аминным коэффициентом 0,7-0,8 в реакторе в течение 8 ч при температуре 37-38^{0}С до накопления не менее 4 млрд./см^3 микробных клеток. Проверяли токсичность каждой выращенной культуры на белых мышах, используя на каждый штамм 10 животных. Для изготовления антигена использовали культуру, содержащую не менее 6000 ДЛМ/см^3 для белых мышей.

Для получения анатоксина в реактор с выращенной культурой *Cl. perfringens* добавляли формалин до 0,7%-ной конечной концентрации, выдерживали 8 сут при температуре 37-38^{0}С, затем вносили 6%-ый раствор гидроокиси алюминия из расчета 100 см^3 на 1 л культуры. Выдерживали суспензию 5 сут и удаляли 50% общего объема надосадочной жидкости, устанавливали pH 7,2-7,4.

При получении бактериальной массы *E. coli* штамм «ПЗ-3», синтезирующий адгезивный антиген А20, выращивали на мясопептонном агаре, штамм «КВ-1», синтезирующий адгезивный антиген К99, - на среде Минка в условиях термостата при температуре 37 – 38^{0}С. Через 24 ч выросшие колонии культур *E. coli* смывали 0,85%-ым стерильным раствором хлорида натрия, готовили суспензию в концентрации 14-15 млрд. м.к. в 1 см^3 бактерийному или оптическому стандарту мутности ГИСК им. Тарасевича. Инактивацию бактериальной массы осуществляли формалином. Для этого во взвесь добавляли формалин до 0,5% конечной концентрации и выдерживали 5 сут в термостате при температуре 37-38^{0}С. Затем проверяли полноту инактивации бактерий *E. coli* путем посева на соответствующие питательные среды.

Для получения анатоксина каждый штамм *E. coli* засевали отдельно в реактор с бульоном Хоттингера, выращивали 5 сут при температуре 37-38^{0}С. Определяли концентрацию ТЛ-, ТС-токсинов в реакции диффузионной преципитации (РДП). Титр ТЛ-, ТС-токсинов в культуральной жидкости составлял не менее 1:4 - 1:8.

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

Опыты по отработке оптимальной схемы гипериммунизации быков-продуцентов с целью получения полиспецифической гипериммунной сыворотки проводили в условиях ООО «Среднее Девятово» Лаишевского района Республики Татарстан. Для отработки оптимальной схемы

гипериммунизации были сформированы 4 группы быков-продуцентов живой массой 350-400 кг по 5 головы в каждой. Животным каждой группы вводили специфические антигены 4-кратно с интервалом 14 сут в дозах, указанных в таблице 2.

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

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

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

1. Антиген *Cl. perfringens:*

- анатоксин и соматический антиген штамма №28 (тип А) с концентрацией 10-11 млрд. м.к. в 1 см^3, см^3 - 300,0 – 350,0;
- анатоксин и соматический антиген штамма №392 (тип С) 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) с 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) с концентрацией 14-15 млрд. м.к. в 1 см^3, см^3 - 300,0 – 350,0;
- соматический и адгезивный антиген штамма ПЗ-3 (А20) с 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*.

Через 20 сут после последнего введения антигенов от животных брали кровь и исследовали в ее сыворотке содержание специфических антител. Титры антител к *Cl. perfringens* определяли в реакции иммуноферментного анализа (ИФА), к *E. coli* - в реакции агглютинации (РА), к ТЛ- и ТС-токсинам *E. coli* – в реакции диффузной преципитации. Результаты этих исследований представлены в таблице 3.

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

Из данных таблицы 3 видно, что наиболее оптимальной схемой гипериммунизации быков-продуцентов является четвертая, которая позволяет получать полиспецифическую гипериммунную сыворотку с высоким содержанием специфических антител к антигенам *Cl. perfringens* и *E. coli* с наименьшим расходом антигенов и без осложнений у животных после введения иммуногенов. При пятой схеме иммунизации у животных отмечены также высокие титры специфических антител, но они достоверно не отличались от таковых животных четвертой группы. Следует также отметить, что у животных пятой группы после заключительного этапа иммунизации отмечались осложнения через 5-10 мин после введения антигенов в виде учащенного дыхания, одышки, слюнотечения.

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

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 представлены в таблице 4.

Из данных таблицы 4 следует, что четвертая схема гипериммунизации позволяет получать гипериммунную лечебно-профилактическую сыворотку от быков-продуцентов со стабильным высоким содержанием специфических антител к антигенам бактерий *Cl. perfringens* и *E. coli*.

3.2.4 Оценка безвредности, стерильности 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 на 10 белых мышах живой массой 14-16 г, которым вводили подкожно полиспецифическую сыворотку в дозе 0,5 см^3 в область лопаток и на 3 телятах с живой массой 40-45 кг, которым вводили сыворотку в четыре точки внутримышечно в дозе 100 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.

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. Сывороткой не обработана.	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

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.

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		Сохранность, %
		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. Следовательно, оптимальной, экономически оправданной лечебной дозой сыворотки для новорожденных телят является 2,5 см^3 на 1 кг массы тела.

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

Группа телят	Доза сыворотки, кг/см^3	Заболело		Пало		Сохранность, %
		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

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.

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, во 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

Производственное испытание профилактических и лечебных свойств экспериментальных серий гипериммунной сыворотки проводили в 2-х крупных комплексах по получению 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 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%.

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

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.

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.

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%. 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%.

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;

Расчетным путем установили, что использование гипериммунной сыворотки с профилактической целью в расчете на 100 голов позволило 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 составил 13,1 руб. на 1 руб. затрат.

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. При этом установили, что использование гипериммунной сыворотки с лечебной целью в расчете на 100 голов позволило 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 составил 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

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» (Патент РФ на изобретение №2523389 от 23.05.2014 г.).

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 при профилактической обработке на 1 рубль затрат составляет 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 ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, включенные в перечень научных изданий ВАК для опубликования результатов исследований

1. Спиридонов, А.Г. Способ получения лечебно-профилактической сыворотки против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят / А.Г. Спиридонов, Р.Х. Юсупов, **Д.Д. Насертдинов,** Г.Н. Спиридонов, А.Ф. Махмутов // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2014. – Т. 220. – С. 208-212.

2. Спиридонов, А.Г. Современные подходы к специфической профилактике и лечению анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят / А.Г. Спиридонов, **Д.Д. Насертдинов**, Х.Н. Макаев, Г.Н. Спиридонов // Ветеринарный врач. – 2015. - №.6 – С. 12-15.

3. **Насертдинов, Д.Д.** Экономическая эффективность применения сыворотки гипериммунной против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят / Д.Д. Насертдинов**,** А.Г. Спиридонов, А.Ф. Махмутов, Г.Н.

Спиридонов, Х.Н. Макаев // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – Казань, 2016. – Т. 226 (II). – С. 120-123.

Патент РФ на изобретение

4. 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.

Статьи, опубликованные в журналах, материалах и сборниках конференций

5. **Насертдинов, Д.Д.** Определение этиологической структуры инфекционной диареи новорожденных телят / Д.Д. Насертдинов, А.Г. Спиридонов, А.Ф. Махмутов и др. // Биотехнологии в решении экологических проблем природы, общества и человека в Евразии: Взгляд молодых ученых и специалистов: Матер. междунар. науч.-прак. конф. молодых уч. и спец. – Казань, 2013. – С. 106-108.

6. **Насертдинов, Д.Д.** Этиологическая структура желудочно-кишечных болезней новорожденных телят / Д.Д. Насертдинов, А.Г. Спиридонов, А.Ф. Махмутов, Х.Н. Макаев // Современные достижения ветеринарной медицины и биологии – в сельскохозяйственное производство: Материалы II Всеросс. науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения профессора Х.В.Аюпова 21-22 февраля, Уфа. - 2014. - С.99-102.

7. Спиридонов, Г.Н. Разработка и изучение эффективности гипериммунной сыворотки против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят / Г.Н. Спиридонов, А.Ф. Махмутов, А.Г. Спиридонов, **Д.Д. Насертдинов** // Современные достижения ветеринарной медицины и биологии – в сельскохозяйственное производство: Материалы II Всеросс. науч.-практ. конф., посвящ. 100-летию со дня рождения профессора Х.В. Аюпова 21-22 февраля, Уфа. – 2014. - С.116-118.

8. Спиридонов, А.Г. Специфическая профилактика и лечение анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят / А.Г. Спиридонов, **Д.Д. Насертдинов**, Х.Н. Макаев, Г.Н. Спиридонов // Актуальные задачи ветеринарии, медицины и биотехнологии в современных условиях и способы их решения. - Матер. регион. научн.-практ. конф. – Самара. - 2015. – С. 156-159.

9. Спиридонов, А.Г. Лечебно-профилактическая эффективность гипериммунной сыворотки против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят / А.Г. Спиридонов, **Д.Д. Насертдинов**, Г.Н. Спиридонов, Х.Н. Макаев, А.Ф. Махмутов // Актуальные проблемы современной ветеринарной

науки и практики, посвященной 70-летию Краснодарского НИВИ. - Матер. научн. -практ. конф. – Краснодар. - 2016. – С. 335-338.

10. Спиридонов, А.Г. Разработка средств специфической профилактики и лечения анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят / А.Г. Спиридонов, **Д.Д. Насертдинов** // Эколого-биологические проблемы использования природных ресурсов в сельском хозяйстве. - Матер. Всеросс. научн.-практ. конф. молодых ученых и специалистов. – Екатеринбург. – 2017. - С. 132-135.

11. Спиридонов, Г.Н. Изыскание средств специфической профилактики и лечения анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят / Г.Н. Спиридонов, Х.Н. Макаев, А.Г. Спиридонов, **Д.Д. Насертдинов** // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – Т. XXVI. Владимир. - С. 191-204.