

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной
медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»

На правах рукописи

КРАМЕР Юлия Николаевна

**ПОЛИВАЛЕНТНЫЙ АНАТОКСИН *CLOSTRIDIUM*
PERFRINGENS И ЕГО ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРИ
АНАЭРОБНОЙ ЭНТЕРОТОКСЕМИИ 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, профессор
Пименов Николай Васильевич

Москва – 2020

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ.....	4
ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1 Историко-нозологические сведения об анаэробной энтеротоксемии живот- ных в различных странах.....	12
1.2 Этиологические и эпизоотологические аспекты. Характеристика возбу- дителя <i>Clostridium perfringens</i> и устойчивость.....	20
1.3 Особенности культивирования <i>Clostridium perfringens</i>	24
1.4 Основные факторы патогенности возбудителя и патогенез заболева- ния.....	25
1.5 Клинико-морфогенетическая характеристика анаэробной энтеротоксемии крупного рогатого скота.....	28
1.6 Вакцинные препараты против анаэробной энтеротоксемии крупного рога- того скота.....	30
1.7 Основные направления лечебной стратегии.....	38
1.8 Заключение по обзору литературы.....	39
ГЛАВА 2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	41
2.1 МАТЕРИАЛЫ и МЕТОДЫ.....	41
2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	52
2.2.1 Эпизоотологические данные по заболеванию анаэробной энтеротоксеми- ей крупного рогатого скота в России.....	52
2.2.2 Особенности клинико-морфологического проявления анаэробной энте- ротоксемии у крупного рогатого скота.....	53
2.2.3 Характеристика культуральных, морфологических и биологических свойств выделенных изолятов <i>Clostridium perfringens</i>	66

2.2.4 Антибиотикорезистентность патогенных штаммов <i>C. perfringens</i>	72
2.2.5 Обоснование разработки поливалентного анатоксина против анаэробной энтеротоксемии телят.....	73
2.2.6 Подбор штаммов для изготовления поливалентного анатоксина <i>Clostridium perfringens</i> против анаэробной энтеротоксемии телят.....	74
2.2.7 Изготовление лабораторной серии поливалентного анатоксина <i>Clostridium perfringens</i> против анаэробной энтеротоксемии телят.....	79
2.2.8 Определение оптимальной иммунизирующей дозы анатоксина на лабораторных животных.....	86
2.2.9 Определение оптимальной иммунизирующей дозы анатоксина для телят, стельных коров и нетелей.....	88
2.2.10 Показатели качества, безвредности и антитоксической активности поливалентного анатоксина <i>Clostridium perfringens</i> против анаэробной энтеротоксемии телят.....	90
2.2.11 Специфическая эффективность поливалентного анатоксина в производственных условиях.....	92
2.2.12 Сравнительная оценка антигенной активности поливалентного анатоксина <i>Clostridium perfringens</i> против анаэробной энтеротоксемии телят и вакцины «Клостбовак-8» на восприимчивых животных.....	99
ГЛАВА 3. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	103
ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	114
4.1 Выводы.....	114
4.2 Практическое использование полученных научных результатов.....	116
4.3 Рекомендации по использованию научных выводов.....	116
ГЛАВА 5. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	117
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	142

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ, УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ, СИМВОЛОВ, ЕДИНИЦ И ТЕРМИНОВ

АЕ – антитоксические единицы

АПК – агропромышленный комплекс

д.д./мин – дыхательные движения в минуту

D_{lm} – минимальная летальная доза

ЕД – единица действия

ЕС – единица связывания

ЗАО – закрытое акционерное общество

МЕ – международные единицы

мкр. кл. – микробных клеток

млрд. мкр. кл./мл – миллиард микробных клеток в 1 миллилитре

МПА – мясопептонный агар

МПБ – мясопептонный бульон

МППБ – мясопептонный печеночный бульон

МТФ – молочно-товарная ферма

ОАО – открытое акционерное общество

ООО – общество с ограниченной ответственностью

об./мин – оборотов в минуту

РН – реакция нейтрализации

рН – уровень водородных ионов

РФ – Российская Федерация

соавт. – соавтор

СПК – сельскохозяйственный производственный кооператив

СПП – сельскохозяйственное производственное предприятие

уд./мин – ударов в минуту

ФГБУ «ВГНКИ» – Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов»

ФГБОУ ВО «МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина» – Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»

ФКП «Курская биофабрика-фирма «БИОК» – Федеральное казенное предприятие «Курская биофабрика-фирма «БИОК»

ч. – часы

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Болезни органов пищеварительного аппарата молодняка крупного рогатого скота в настоящее время занимают одно из ведущих мест в структуре заболеваемости и летальности животных. Среди заболеваний, сопровождающихся поражением кишечного канала, одно из ведущих мест занимает анаэробная энтеротоксемия, широко распространенная на территории Российской Федерации и за рубежом (Глотова Е.В., 1937; Воробьев А.А., 1965; Beer I., 1968; Бургасов П.Н., 1974; Дереза А.Ф., 1987; Алешкевич В.Н., 1992; Асонов Н.Р., 1997; Казимир А.Н., 1997; Бублов А.В., 2000; Емельяненко П.А., 2000; Kirkpatrick M.A., 2001; Dennison A.C., 2002; Болоцкий И.А., 2009; Горковенко Н.Е., 2009; Буриков Б.Ю., 2011; Капустин А.В., 2019) [1, 3, 9, 10, 11, 12, 16, 17, 23, 30, 38, 40, 59, 60, 68, 166, 171, 186]. Несмотря на то, что заболевание, преимущественно проявляется энзоотически и спорадически, случаи его возникновения имеют четкое постоянство. Инфекция носит стационарный характер и характеризуется высокой смертностью, что приводит к ощутимым экономическим потерям (Размазин М.И., 1948; Муромцев С.Н., 1958; Глушкова А.И., 1967; Ургуев К.Р., 1987; Москалева Н.В., 2001; Ewoldt J.M., 2005; Бессарабов Б.Ф., 2007; Спиридонов Г.Н., 2011; Savić B., 2012, Капустин А.В., 2017; Девришов Д.А., 2019) [7, 18, 50, 67, 95, 97, 101, 109, 116, 119, 134, 149, 172, 213].

Проблема анаэробной энтеротоксемии крупного рогатого скота остаётся актуальной, особенно в хозяйствах племенного направления, и требует комплексного решения с организацией общесанитарных и специфических мероприятий. Специфическая профилактика клостридиозов крупного рогатого скота обеспечена рядом ассоциированных иммунобиологических препаратов зарубежного и двумя – отечественного производства, предназначенных для вакцинации животных с 1,5-месячного возраста и имеющих широкий антигенный состав.

Для вакцинации стельных коров с целью создания колострального иммунитета у новорожденных телят против актуальных для молодняка инфекционных болезней целесообразно применение вакцин против определенных видов возбудителей, эпизоотическое благополучие по которым является условным. Протективная активность таких препаратов превышает активность ассоциированных вакцин с громоздкими антигенными комбинациями (Bosworth T.I., 1943; Griesemer R.A., 1953; Mac Lennan J.D., 1962; Леньков В.И., 1965; Дереза А.Ф., 1992; Нестеров И.А., 2011; Спиридонов Г.Н., 2018; Капустин А.В., 2019) [31, 46, 55, 68, 83, 96, 99, 111, 168, 174, 190]. В настоящее время целевых иммунопрепаратов против анаэробной энтеротоксемии у молодняка раннего постнатального периода не зарегистрировано. В связи с этим обоснование и разработка иммунобиологического средства для профилактики анаэробной энтеротоксемии у телят является актуальным вопросом.

Степень разработанности темы. Применение в стационарно неблагополучных хозяйствах поливалентных анатоксин-вакцин для профилактики анаэробной энтеротоксемии обосновано, так как обеспечивает протективную активность против конкретного возбудителя в особых условиях иммунного статуса молодняка. Рост антибиотикорезистентности возбудителя, реальная эпизоотическая ситуация требуют совершенствования специфических подходов в профилактике анаэробной энтеротоксемии телят и создания отсутствующих на рынке целевых препаратов.

Цель и задачи исследований. Целью работы являлось создание поливалентного анатоксина на основе штаммов *Clostridium perfringens* эпизоотически актуальных типов и изучение его эффективности против анаэробной энтеротоксемии телят. Для достижения поставленной цели были определены следующие задачи:

1. Изучить случаи анаэробной энтеротоксемии в скотоводческих хозяйствах с определением видовой и серотиповой принадлежности возбудителя;

2. Изучить биологические свойства, патогенность и токсигенность выделенных клостридий, а также антибиотикорезистентность возбудителя анаэробной энтеротоксемии телят;

3. Изучить иммуногенную активность полученных штаммов *Clostridium perfringens* в сравнении с производственными штаммами;

4. Разработать состав и технологию изготовления поливалентного анатоксина *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят;

5. Определить оптимальную дозу и схему применения поливалентного анатоксина *Clostridium perfringens* на лабораторных и целевых моделях;

6. Изучить показатели качества и безвредности поливалентного анатоксина *Clostridium perfringens*, его протективную эффективность в лабораторных и производственных условиях.

Научная новизна работы. В работе представлены этиопатогенетические особенности, семиотика анаэробной энтеротоксемии молодняка крупного рогатого скота.

Впервые обоснован антигенный состав, технология изготовления поливалентного анатоксина *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят, определены оптимальные дозы и схема его применения, разработан способ контроля качества поливалентного анатоксина *Clostridium perfringens*.

Установлена высокая антигенная и иммуногенная активность разработанного анатоксина, его протективные свойства в лабораторных и производственных условиях хозяйств, условно благополучных по анаэробной энтеротоксемии крупного рогатого скота.

Научная новизна подтверждена патентом № RU 2699035 С 2 «Поливалентная вакцина против анаэробной энтеротоксемии молодняка крупного рогатого скота и способ ее применения».

Теоретическая и практическая значимость работы. Получены сведения, расширяющие знания в инфектологии анаэробной энтеротоксемии крупного рогатого скота. Применение разработанного поливалентного анатоксина

Clostridium perfringens против анаэробной энтеротоксемии телят, обеспечивающего формирование напряженного иммунитета, позволит снизить заболеваемость и летальность молодняка в следствие данной инфекции.

По материалам исследований разработаны: «Поливалентный анатоксин *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят» СТО 00507243-005-2019, «Промышленный технологический регламент на производство и контроль качества поливалентного анатоксина *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят», «Инструкция по применению поливалентного анатоксина *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят».

Методология и методы исследований. Объектами исследований являлись крупный рогатый скот, а также белые мыши, кролики, морские свинки. При создании и изучении свойств поливалентного анатоксина против анаэробной энтеротоксемии телят применяли микробиологические, эпизоотологические, иммунологические, клинические и другие биологические и биотехнологические методы исследования. Методология работы базировалась на раскрытии эпизоотологических и морфогенетических основ нозологической единицы для молодняка крупного рогатого скота и создании эффективного прототипа для целевой иммунопрофилактики.

Степень достоверности. Теория выстроена на известных данных в традиционном стиле. Исследовательская работа была выполнена на значительном объёме экспериментального материала с использованием широкого спектра классических и современных методов, обеспечивающих точность, повторяемость и контролируемость результатов. Лабораторные исследования проводили в трехкратной повторяемости для достоверности полученных данных. Обработку экспериментальных данных проводили методами статистического анализа.

Соответствие паспорту специальности. Представленная диссертационная работа содержит исследования в области частной инфектопатологии – се-

миотики, патогенеза, эпизоотического процесса анаэробной энтеротоксемии телят, посвящена активной специфической профилактике, вакцинологии и созданию средства профилактики данной инфекционной болезни.

Работа соответствует паспорту специальности 06.02.02. – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микробиология с микотоксикологией и иммунология (п. 2,3,4,5).

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на различных научных конференциях: Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы ветеринарной медицины, зоотехнии и биотехнологии» (Москва, 13.10.2015 г.) и (Москва, 10.10.2016 г.), Международной молодежной научно-практической конференции «Аграрная наука в инновационном развитии АПК» (Уфа, 15-17.03.2016 г.), Национальной научно-практической конференции «Актуальные вопросы биологии, биотехнологии, ветеринарии, зоотехнии, товароведения и переработки сырья животного и растительного происхождения» (Москва, 07.02.2019 г.).

Публикация результатов исследований. Материалы по теме диссертации опубликованы в 9 научных работах, в т.ч. в 4 изданиях, рекомендованных ВАК РФ и 1 – индексированном в SCOPUS.

Личный вклад. Диссертантом лично выполнена экспериментальная часть работы и проведен анализ полученных данных, освоены и применены многочисленные методы исследований, сформулированы выводы и рекомендации.

Объём и структура диссертации. Диссертация изложена на 171 листе и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты исследований, обсуждение полученных результатов, выводы, сведения о практическом исследовании научных выводов, рекомендации по использованию научных выводов, список литературы, состоящий из 230 источников, в том числе 67 – на иностранных языках, а также содержит

приложения на 32 листах. Работа включает иллюстрационный материал – 21 таблицу и 12 рисунков.

Основные положения, выносимые на защиту:

- эпизоотологические и клинико-морфологические особенности анаэробной энтеротоксемии у молодняка крупного рогатого скота;
- биологические свойства штаммов *C. perfringens*, эпизоотически актуальных для телят;
- состав, технология изготовления и схема применения поливалентного анатоксина *Clostridium perfringens* для профилактики анаэробной энтеротоксемии телят;
- иммуногенные свойства и безвредность применения поливалентного анатоксина *Clostridium perfringens* в лабораторных условиях;
- производственная эффективность поливалентного анатоксина для профилактики анаэробной энтеротоксемии телят.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Историко-нозологические сведения об анаэробной энтеротоксемии животных в различных странах

Анаэробная энтеротоксемия (*Entertoxaemia anaerobica*) – острая токсико-инфекция, характеризующаяся расстройством деятельности пищеварительного аппарата, общей интоксикацией организма, поражением почек и нервными явлениями. Инфекционная анаэробная энтеротоксемия – широко распространенная на всех континентах земного шара болезнь, относится к клостридиозным инфекциям. Инфицированию подвержены крупный рогатый скот, мелкий рогатый скот, свиньи и другие животные, в том числе птицы [7, 41, 71, 77, 79, 87, 89, 181, 186, 212].

Впервые клостридии описал в 1880 г. польский микробиолог Пражмовский А. Анаэробная энтеротоксемия новорожденных телят была установлена Bosworth T.I. в Англии (1932). Заболевание протекало в течение 12 часов с признаками угнетенного состояния, отсутствием аппетита, общей интоксикацией и коллапсом. На вскрытии был отмечен энтероколит, петехиальные геморрагии на эпикарде, слизистой сычуга и брыжейке. В тонком отделе кишечника содержалась жидкость коричневого цвета с примесью слизи. В мазках-отпечатках из кишечника обнаружили грамположительные палочки, напоминающие *Clostridium perfringens* [168]. Позже ученые установили, что Bosworth T.I. был выделен токсин *C. perfringens* тип Е, который встречается достаточно редко [209].

Сведения об анаэробной энтеротоксемии, обусловленной *C. perfringens* тип Е, в литературных источниках ограничены. Заболевание новорожденных телят, вызванное этим типом возбудителя, протекало молниеносно и характеризовалось появлением пенистого зловонного поноса. Такие же симптомы описывали ученые в США, Югославии, Австралии [175, 192, 200]. В Австралии вспышку анаэробной энтеротоксемии крупного рогатого скота, «энтеротоксемической желтухи», установили в 1936 г., выделили возбудителя *C. perfringens*

Rose и Edgar [191]. Ross H., Warren M., Bernes V. (1949) выделили от телят идентичный микроорганизм *C. perfringens* типа E, описанный ранее ученым Bosworth T.I [210].

Инфекционную анаэробную энтеротоксемию у телят подсосного возраста, вызванную *C. perfringens* типа A, исследовали Mac Rae D.R., Grant I.G. и Murray E.G. (1943), Griner L.A. (1951г.). Заболевание протекало в острой форме. При вскрытии отмечали точечные кровоизлияния во внутренних органах и гастроэнтерит [175, 191].

Острое заболевание анаэробной энтеротоксемией телят с признаками геморрагического энтерита, вызванное *C. perfringens* типа C, наблюдали Griner L., Bracken F. в 1953 г. в Колорадо и Поминге. Болезнь поражала телят до 10-дневного возраста с высокой смертностью среди 3-5-дневных. Заболевание характеризовалось геморрагическим энтеритом, признаками колик, тетаническими и тоническими спазмами, слабостью и прострацией. Телята погибали через 2-4 часа после первых симптомов. При вскрытии у них отмечали геморрагическое и некротическое воспаление тощей и подвздошной кишок. В кишечнике павших животных обнаружили бета-токсин [174]. Исследователи также обнаружили токсины *C. perfringens* типа C в сыворотке у 14 % клинически здоровых коров и у 24 % телят. Авторы предположили, что новорожденные телята от неиммунизированных маток заражаются *C. perfringens* типа C из внешней среды, инфицируемой взрослыми животными-бациллоносителями. В таких условиях анаэробная энтеротоксемия является постоянной угрозой для животных в данной местности [175].

В Канаде в 1955 г. Schofield F.W. и соавторы регистрировали внезапную смерть телят 6-10-недельного возраста с признаками инфекционной энтеротоксемии. В большинстве случаев характерные симптомы заболевания длились в течение 5-20 минут. Исследователи выделили культуры *C. perfringens* типа A (альфа-токсин) [215]. Также о случаях заболевания телят сообщают Niilo L. и Avery R. (1963 г.). При бактериологическом исследовании внутренних органов

павших и вынужденно убитых животных они выделили 379 штаммов *C. perfringens*, из которых 97,2 % отнесены к типу А [200, 202, 203].

Авторами Griner L.A., Aigeulman A.T., Braung W.A. в графстве Уолд в 1956 г. были выделены культуры *C. perfringens* типа D от телят 7-10-дневного возраста. Заболевали, в основном, здоровые, упитанные телята. У животных были колики, а также тремор отдельных групп мышц. Смерть наступала через 4-5 часов после проявления первых симптомов. Из содержимого тонкого отдела кишечника телят был обнаружен эpsilon-токсин [177].

Ученые из штатов Кумберланда Blood D. и Helwig D. в 1957 г. исследовали 3 одномесечных телят, павших с поражением центральной нервной системы и геморрагическим воспалением слизистой оболочки кишечного канала. В содержимом тонкого отдела кишечника они обнаружили ϵ -токсин и выделили культуры *C. perfringens* типа D [167].

Анаэробную энтеротоксемию у новорожденных телят, обусловленную *C. perfringens* типа В, описали Herple I.R. в Британии (1952) и Иванов И. с соавторами (1963), Костанев А. (1967), Бельчев Д. с соавтор. (1963) в Болгарии. Симптомы заболевания характеризовались повышением температуры тела, интоксикацией организма, диареей. Фекалии – жидкие со слизью, водянистые, темно-коричневого цвета, с примесью крови. Больные телята были угнетены, вяло реагировали на окружающее. При патологоанатомическом вскрытии авторы обнаружили кровоизлияния, изъязвления и гиперемии слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта. На эпикарде и эндокарде зафиксировали рассеянные кровоизлияния. Также исследователи характеризовали признаки: печень – увеличена, мезентериальные лимфоузлы – набухшие, на разрезе сочные, мягкой консистенции [181, 195].

Griesemer R., Krill W. в 1962 г. при анаэробной энтеротоксемии телят 6-12-месячного возраста выделили *C. perfringens* типов С и D. Авторы отмечали, что первичными признаками заболевания являлись отказ от корма, дрожание

мышц, угнетенное состояние. Затем отмечались конвульсии и подергивания глазного яблока. Гибель телят наступала через 14-18 часов [174].

Zaharija I. и Zelenka P. (1958 г.), Shirley G. (1958), Sandercock R. (1958 г.), Bozeman C., Lindley W. и Branson I. (1962 г.) описали анаэробную энтеротоксемию у взрослого поголовья крупного рогатого скота, вызываемую *C. perfringens* типа А [183, 207, 208].

В 1961 г. во Франции зарегистрировали массовый падеж крупного рогатого скота. Prevot A.R. с соавторами выделили *C. perfringens* типа А из внутренних органов павших животных [204].

Большая вспышка болезни описана в феврале-марте 1966 г. в Австралии в крупном стаде из 900 голов скота. Преимущественно заболевали телята в возрасте 7-10 дней. У них наблюдали повышение температуры, слезотечение, выделения из носа и диарею желто-оранжевого цвета. На вскрытии обнаружили кровоизлияния во внутренних органах, характерные поражения для геморрагического и некротического энтерита [205].

В том же году James E. наблюдал в США инфекционную энтеротоксемию телят до 10-14-дневного возраста, обусловленную *C. perfringens* типа В, а у молодняка более старшего возраста – типа С. Клиническая картина была характерна для токсикоинфекции: геморрагическая диарея, колики, абдоминальные судороги. Смерть наступала спустя 2-4 часа с момента проявления клинических признаков [183].

В Германии энтеротоксемию телят, вызванную *C. perfringens* типа В, описали Beer I., Khatib G. Al. и Pilz H. в 1968 г. Заболевание наблюдалось у телят до четырехнедельного возраста после перевода их из родильного помещения. Клиническая картина характеризовалась слабостью, отказом от корма, поносом, шаткой походкой. Треть животных погибли молниеносно [166].

Анаэробную энтеротоксемию, обусловленную *C. perfringens* типа А описали Khatib Al., Kohler B., Ilchman G. (1969 г.) [185].

Senf в 1988 г. (ГДР) провёл 365 опытов по определению токсина в содержимом кишечника павших телят и взрослого крупного рогатого скота. Положительный результат был получен в 203 случаях, преимущественно от телят первых дней жизни до 3-недельного возраста. По числу заболеваний также доминировала эта возрастная группа телят. Большинство проб содержали *C. perfringens* типа А (61,4 %), в 18 пробах выделили тип С (бета-токсин), в 10 пробах – тип D (эпсилон-токсин). Не были типированы 43 изолята (20 %), что автор объяснял недостаточной активностью антисывороток [216].

В Югославии в 1980 г. описали энтеротоксемию у телят 12-месячного возраста, вызванную *C. perfringens*, типом D [152]. В Болгарии инфекционная энтеротоксемия крупного рогатого скота, вызванная типами А и D, – частое явление. Болеет как взрослое поголовье, так и новорожденные телята. Из органов и тонкого отдела кишечника павших и вынужденно убитых животных выделяли также культуры *C. perfringens* типов С и В. В содержимом кишечника обнаруживали токсины, соответствующие выделенному типу культуры [119].

В нашей стране анаэробная дизентерия ягнят регистрируется с 1936 г. (Полыковский М.Д.), поросят – с 1946 г. (Щенников А.С.) [59, 114]. Анаэробную энтеротоксемию новорожденных телят, вызываемую *C. perfringens*, впервые описал Размазин М.И. в 1948 году в Приморском крае. Течение заболевания проходило в острой форме с характерными клиническими признаками интоксикации и профузного поноса. Автор выделил из содержимого тонкого отдела кишечника павших телят возбудителя данного заболевания и токсин, который не был типирован. Токсин обладал высокими летальными свойствами для белых мышей. Размазин М.И. разработал анатоксин-вакцину, которую использовал в профилактических целях на 10 стельных коровах за 3 и 10 дней до отела. После вакцинации стельных маток был получен положительный результат. Новорожденные телята, рожденные от иммунизированных коров, не заболели, а среди телят, полученных от не вакцинированных коров, заболевание продолжалось [119].

Советский ученый Голубев Н.Д. в 1964 г. изучал заболевание новорожденных телят, протекавшее с высокой смертностью и признаками расстройства функции желудочно-кишечного канала. По результатам исследования установлено, что диарея у телят была вызвана микроорганизмом *C. perfringens* [20].

В 1965 году Ургуев К.Р. наблюдал вспышку заболевания молодняка крупного рогатого скота в возрасте 12-16 месяцев. Из 172 голов животных заболели 17 и пали 11 голов. Следующая вспышка заболевания наблюдалась у телят 2-х-месячного возраста. Причина возникновения анаэробной энтеротоксеми объяснялась тем, что на пастбище, куда выгоняли телят, ранее выпасались отары овец, неблагополучные по инфекционной энтеротоксемии. В фильтрате содержимого кишечника у павших животных обнаружен токсин, который нейтрализовывался сывороткой *C. perfringens* типов С и D [146, 148, 149].

Леньков В.И. и Ленькова В.А. с соавторами в течение трех лет с 1965 по 1968 г. изучали роль *C. perfringens* в этиологии анаэробной энтеротоксемии новорожденных телят на юге Казахстана. За это время учёными было выделено 163 штамма *C. perfringens* от 232 больных и павших телят. При этом только у 4 павших телят обнаружили эпсилон-токсин и выделили чистую культуру *C. perfringens* типа D. Остальные микроорганизмы по свойствам образуемого токсина отличались от известных типов *C. perfringens*. Выделенный токсин из кишечника телят был высоко токсичен для белых мышей при внутривенном введении [82, 83, 84]. Также авторы установили биохимические свойства полученных микроорганизмов. На казеиновой среде в течение 2-3 ч. выделенные клостридии продуцировали токсин, обладающий некротическими, гемолитическими, летальными свойствами. В реакции нейтрализации ни одна антитоксическая сыворотка не нейтрализовывала данный токсин. Только при увеличении дозы в 20-25 раз выше нормы сыворотка типа А нейтрализовала токсин выделенных штаммов. Авторы сделали выводы и отнесли эти микроорганизмы к атипичным штаммам *C. perfringens* типа А [85].

Об атипичных штаммах *C. perfringens* типа А говорят также Попович М. и Форзек Z. Ученые происследовали 135 проб силоса и выделили 3 штамма *C. perfringens* (тип А), из которых один был отнесен к атипичным [206].

В Белоруссии в 1969 г. занимались изучением инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта у новорожденных телят такие ученые как Ленков В.И., Музычин С.И. и Азаренко В.С. Авторы провели эпизоотический мониторинг в 23 хозяйствах и установили, что анаэробная энтеротоксемия протекает в форме энзоотии, процент падежа молодняка составляет 10-40 %. Одной из главных причин болезни является несбалансированный рацион маточного поголовья.

Для установления диагноза было проведено бактериологическое исследование, отобран патологоанатомический материал (печень, почки, селезенка, сердце, содержимое тонкого отдела кишечника) от павших и вынужденного убитых животных, из фекалий от больных животных. В результате выделили от 98 больных и от 23 павших телят 89 культур *C. perfringens*. Полученные микроорганизмы проверили на токсичность и типирование токсина, выделенный токсин отнесли к атипичному штамму *C. perfringens* типа А [82, 84, 85, 95].

Каган Ф.И. с соавторами в 1973 г. в хозяйстве Ворошиловградской области описал массовое заболевание телят в возрасте от 1 до 42 дней. У заболевших телят отмечали мышечную дрожь, анемию слизистых оболочек, слабость конечностей, угнетенное состояние, у некоторых животных – зловонный понос, кровотечение из ротовой полости, носовых отверстий и прямой кишки. Болезнь протекала молниеносно, телята погибали после проявления первых клинических признаков спустя несколько часов, реже – через 1-2 дня. При вскрытии у них наблюдали слабое трупное окоченение, геморрагии и серозно-геморрагические инфильтраты с пузырьками газа в подкожной клетчатке, скелетных мышцах, паренхиматозных органах и серозных оболочках. При бактериологическом исследовании выделили *C. perfringens* типа А [58].

Анаэробная энтеротоксемия новорожденных телят, по данным Урбана В.П. и Нейманова И.Л. (1984 г.), возникает как эндогенная инфекция на фоне нарушений условий содержания и кормления животных [89, 115].

Зароза В.Г. (1984) утверждал, что в этиологии энтеротоксемии новорожденных телят повысилась роль *C. perfringens* типа А, и опасность заболевания может увеличиться в условиях концентрации и интенсификации животноводства, если не будут поддерживаться условия содержания и кормления [40, 41].

За 17 лет с 1985 по 2001 гг. Нестеров И.А. обследовал территории Краснодарского края, Ростовской области и некоторых прилегающих административно-хозяйственных единиц, зарегистрировал новую этиологическую структуру инфекционной анаэробной энтеротоксемии – перфрингеоза животных. В этиологии заболеваемости восприимчивых животных изоляты *C. perfringens* серотипа А на уровне 90 % и только 10 % относятся к атипичным штаммам. Ранее доминировавшие *C. perfringens* типов С и D не были выделены [99, 100].

В 2013 году Спиридоновым Г.Н. установлена анаэробная энтеротоксемия в 23 хозяйствах Республики Татарстан, в 18 случаях (78,2 %) заболевание протекало совместно с эшерихиозом, в 12 (52,1 %) – совместно с вирусной (корона-, рота-, герпесвирусной) инфекцией, в 4 (17,4 %) – совместно с псевдомонозом, в 3 (13,1 %) – с протейной инфекцией. Возбудителем анаэробной энтеротоксемии в 15 (65,2 %) случаях был признан *C. perfringens* серотипа А, в 7 (30,4 %) случаях бактерии *C. perfringens* серотипа D и в 1 (4,3 %) случае *C. perfringens* серотипа С. Серотип D выявлен в хозяйствах, где долгое время занимались разведением овец [46, 133, 134, 136, 137, 141, 142, 143].

Сведения о распространении и проявлении анаэробной энтеротоксемии у крупного рогатого скота в последнее десятилетие достаточно ограничены.

На основании доступных литературных данных можно заключить, что анаэробная энтеротоксемия крупного рогатого скота регистрируется во многих странах мира, в том числе и в Российской Федерации. Болезнь вызывается *C. perfringens* типами А, С, В, D, редко Е. В нашей стране заболевание, вызван-

ное типом Е, никем не описано. Следует отметить недостаточность глубоких, методически обоснованных обобщающих исследований по анаэробной энтеротоксемии крупного рогатого скота, вызываемой *C. perfringens* типа А. Большинство исследователей при установлении диагноза ограничивались выделением возбудителя от павших и вынужденно убитых животных и его типизацией, что является совершенно недостаточным при обнаружении *C. perfringens* типа А. Данный серотип можно выделить почти всегда из любого трупа, независимо от причин гибели животного.

По данным Бакулина И.Н, Земляницкой Е.П, Сергеевой Т.И. основное этиологическое значение при анаэробной энтеротоксемии новорожденных телят имеют штаммы, способные продуцировать энтеротоксины. Этими свойствами обладает небольшой процент штаммов *C. perfringens* [4, 42].

1.2 Этиологические и эпизоотологические аспекты

Возбудителем анаэробной энтеротоксемии являются бактерии вида *Clostridium perfringens* – крупные, неподвижные, анаэробные, спорообразующие, грамположительные палочки, которые подразделяются на шесть типов, отличающихся друг от друга вырабатываемыми токсинами и антигенной структурой. По различным литературным данным *C. perfringens* серотип А вызывает газовую гангрену, злокачественный отек, энтеротоксемию молодняка сельскохозяйственных животных: телят, поросят и ягнят; серотип С – геморрагическую энтеротоксемию телят, поросят и ягнят; серотип D – энтеротоксемию ягнят, козлят, телят и поросят; серотип В вызывает анаэробную дизентерию у ягнят; серотип Е – энтеротоксемию телят; серотип F – энтеротоксемию у голубых песцов [2, 9, 13, 21, 33, 51, 78, 79, 90, 106, 162, 194].

Возникновению анаэробной энтеротоксемии крупного рогатого скота способствует нарушение ветеринарно-санитарных и зоогигиенических правил кормления и содержания беременных коров, нетелей и телят, а также нарушение

ние кальций-фосфорного обмена, связанные с резким изменением рациона, перекормливанием или недостатком минеральных солей в кормах.

Источником возбудителя инфекции являются больные животные и бактерионосители, которые контаминируют почву, подстилку и предметы ухода. Заражение происходит алиментарным путем. Заболевание протекает спорадически, сначала отмечаются единичные случаи заболевания, затем количество больных увеличивается [1, 2, 9, 14, 16, 17, 23, 24, 90, 105, 112, 116, 118, 141, 207, 214, 217, 219, 220, 223, 230].

По данным Москалевой Н.В, Сергеева Т.И. и других анаэробная энтеротоксемия у новорожденных телят, вызванная *Clostridium perfringens* типом А, регистрируется в 2-3-дневном возрасте (31,5-38,2 %). Заболевание может возникать без заноса инфекции извне. После возникновения очага данной инфекции создаются условия её стационарности [95, 96]. Типы С и D обычно являются причиной заболевания у более старшего молодняка крупного рогатого скота (6-24-месячного) возраста, содержащихся на пастбище или откорме с высоким соотношением концентратов в рационе [37, 87, 90, 111, 113, 159, 171, 178, 195, 204]. Возбудитель анаэробной энтеротоксемии наиболее опасен для телят до образования у них рубца (первые 3-4 месяца жизни), для коров – в период после отела (вследствие повреждения полового аппарата во время отела) и во время выпаса на зараженных условно безопасных пастбищах [7, 19, 66, 67, 72, 152, 160, 224, 228].

Заболевание чаще всего регистрируется ранней весной, когда слабо укоренившаяся молодая трава выдергивается животным вместе с корневой системой и прилипшей к ней землей. Таким образом, верхний слой почвы, загрязненный микрофлорой, попадает в преджелудки [4, 7, 14, 15, 35, 36, 38, 75, 79, 95, 98, 119, 138, 164, 186, 198].

Характеристика возбудителя *Clostridium perfringens*. К числу анаэробных бактерий относят микроорганизмы разных таксономических групп. Наибольшее клиническое значение представляет семейство *Bacillaceae* род *Clostridium* вид *Clostridium perfringens*. В настоящее время известно более 240 видов клостридий. Благодаря современным методам открываются новые, ранее малоизученные, измененные и редко встречающиеся виды клостридиозной инфекции [22, 28, 34, 54, 76, 81, 89, 102, 122 153, 165, 188, 199].

Возбудитель анаэробной энтеротоксемии, крупные (4-6x1,5 мкм) палочки *C. perfringens*, располагаются одиночно, реже – цепочками и группами. Различают шесть типов *C. perfringens* – А, В, С, D, Е и F, сходные по культурально-морфологическим свойствам, но отличающиеся по патогенным особенностям и антигенной структуре образуемого ими токсина [7, 20, 60, 73, 75, 76, 79, 82, 88, 90, 151, 155, 179, 180, 182, 195, 215, 222, 229].

Биохимические свойства *C. perfringens* приведены в таблице 1.

Таблица 1 – Биохимические свойства *C. perfringens*

Наименование углеводов	Результаты ферментации
1	2
Мальтоза	+
Сахароза	+
Лактоза	+
Глюкоза	+
Инсулин	-
Галактоза	+
Левулеза	+
Дульцит	-
Глицерин	±

Таблица 1 продолжение

1	2
Салицит	-
Крахмал	+
Маннит	±
Гемолитическая активность	±
Агар с бензидином	-
Лакмусовое молоко	Коагуляция через 3-16 ч

Примечания: + - ферментирует; ± - слабое сбраживание; - - не ферментирует.

Клостридии ферментируют глюкозу, лактозу, сахарозу с образованием кислоты и газа, не ферментируют маннит и дульцит, образуют масляную кислоту при ацетобутиратном брожении и способны восстанавливать нитраты [53, 145, 152, 153, 163].

Устойчивость. В спорной форме возбудитель сохраняется в почве до четырех лет, выдерживает температуру в течение 5-9 минут, при 90 °С – 30 минут.

Вегетативные формы микроба сохраняются в почве от 10 до 35 дней, в навозе – от 3 до 5 дней. Температура 80 °С убивает микроорганизмы в вегетативной форме в течение 5 минут [6, 7, 63, 77, 79].

Химическая резистентность клостридий – высокая, и немногие дезинфектанты эффективны в отношении клостридий. Эффективные дезинфицирующие средства: 5-10 %-ный раствор формальдегида при экспозиции 15-20 минут, 10 %-ный раствор натрия гидроксида – 20 мин, 24 %-ный раствор глутарового альдегида – 30 минут, однохлористый йод с формалином (1:1) – 30 минут [65, 76], 0,4 %-ный раствор РусДез-Универсал 50 – 3 ч. (действующие вещества: тетраметилед этилентетрамин и четвертичные аммониевые соединения алкилдиметилбензиламмоний хлорид, дидецилдиметиламмоний хлорид), 10 %-ный

раствор ДИАБАК-вет – 3 ч. (содержит в качестве активного вещества алкилдиметилбензиламмоний хлорид) [87, 115, 118].

1.3 Особенности культивирования *Clostridium perfringens*

Микроорганизмы этой группы широко распространены в природе, часто встречаются в почве, кормах, воде, фекалиях людей и животных. Культуры *Clostridium perfringens* в организме животных и при культивировании на питательных средах с кровяной сывороткой образуют капсулу, во внешней среде и на богатых белком средах – споры [3, 13, 15, 21, 82, 88, 103, 117, 118, 141, 164]. Благодаря способности образовывать споры микробы этой группы обладают высокой устойчивостью и долго сохраняются в окружающей среде при неблагоприятных для их существования условиях. *C. perfringens* хорошо растет на питательных средах для анаэробов: Китта-Тароцци, Виллиса-Хоббса, Вильсона-Блэра, глюкозо-кровяном агаре Цейслера, молочной среде [58, 79, 62, 68].

Глюкозо-кровяной агар Цейслера – питательная среда для выявления гемолитических свойств бактерий, представляет из себя плотную среду для культивирования и дифференциации анаэробов, содержащую мясопептонный агар, глюкозу и кровь. В основу определения вида анаэробов положена форма роста их на среде Цейслера в анаэробных условиях.

На поверхности глюкозо-кровяного агара Цейслера клостридии образуют колонии округлой, выпуклой формы с гладкими краями и влажной, гладкой поверхностью. Колонии окружены светлой зоной гемолиза, имеют вначале серовато-белый цвет, при доступе кислорода переходящий в оливковый, а затем в светло-зеленый [89, 90, 103, 107].

Среда Китта-Тароцци обеспечивает рост многих спорообразующих и строгих аспорогенных анаэробов. Ее используют для культивирования и хранения клостридий. Состоит из питательного бульона, 2 % глюкозы и кусочков печени или мясного фарша для адсорбции кислорода. Перед посевом среду прогревают на кипящей водяной бане в течение 10-15 минут для удаления воздуха.

При выращивании на среде Китта-Тароцци культура клостридий проявляют обильное газообразование, помутнение среды и выпадение осадка, а на кровяном агаре – выпуклые округлые белые колонии, окруженные зоной β -гемолиза.

Характерным является рост клостридий на молочной среде – молоко после посева быстро свертывается, затем створаживается, выделяя газы; сыворотка отжимается и становится совершенно прозрачной [62, 88, 90, 145].

Среда Виллиса-Хоббса содержит кроме питательного агара, лактозу, индикатор, яичный желток и обезжиренное молоко. Дифференциация видов клостридий осуществляется по изменению цвета индикатора в красный (ферментация лактозы) и наличию вокруг колоний зоны (ореола) опалесценции (лецитиназная активность).

На железосульфитном агаре Вильсон-Блэра культуры *C. perfringens* уже через 1-2 часа анаэробного культивирования при + 37 °С образуют зеленовато-черные колонии, в столбике агара – дискообразные, чечевицеобразные колонии [78, 90].

1.4 Основные факторы патогенности возбудителя и патогенез болезни

Анаэробную энтеротоксемию крупного рогатого скота чаще всего отмечают в хозяйствах, где не соблюдаются зоогигиенические, технологические и ветеринарно-санитарные требования, а также имеют место нарушения режимов кормления и содержания животных [3, 7, 142, 143, 206, 218, 226].

Патогенез, эпизоотическое проявление и клинические признаки инфекции определяются воздействием на организм токсинов, продуцируемых конкретным штаммом. При этом характер заболевания связывают не столько с видом участвующего в инфекционном процессе микроорганизма, сколько с типом токсина, который он продуцирует. Наиболее важной особенностью токсинов перфрингенс клостридиозной инфекции является их способность нарушать или изменять те-

чение жизненно важных физиологических процессов клеток макроорганизма [16, 30, 38, 79, 95, 99, 100].

При попадании *Clostridium perfringens* в пищеварительный канал с кормом, водой, молозивом и молоком, клостридии бурно размножаются, выделяя токсины (некротоксины, гематотоксины, нейротоксины, эндотелиотоксины, гемолизины), которые нарушают секреторную и моторную функции пищеварительного тракта, снижают переваривающую способность ферментов. Это приводит к ослаблению окислительно-восстановительных процессов и защитных барьеров [16].

В патогенезе заболевания основную роль играют экзотоксины. Клостридии продуцируют 12 различных токсинов, которые представлены в таблице 2. Ведущую роль в патогенезе играют – α (альфа), β (бета), ϵ (эпсилон) и ι (иота) токсины, которые обладают гемолитическими, некротическими, летальными свойствами. Токсины синтезируются вегетативными клетками клостридий в период активного роста и выделяются в окружающую среду. Патогенные токсины *C. perfringens* представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Патогенные токсины *C. perfringens*

Токсин	Действие токсинов в организме
Главные токсины	
<i>C. perfringens</i> тип А – α (альфа)-токсин (лецитиназа)	Разрушает эритроциты, повышает проницаемость сосудов, расщепляет лецитиновую мембрану, обладает некротизирующей активностью
<i>C. perfringens</i> тип В, С – β (бета)-токсин	Индукцирует артериальную гипертензию в результате образования катехоламинов и некротизирующей активностью
<i>C. perfringens</i> тип В, D – ϵ (эпсилон)-токсин	Повышает сосудистую проницаемость пищеварительного канала
<i>C. perfringens</i> тип Е – ι (йота) – токсин	Проявляет некротизирующую активность, повышает сосудистую проницаемость
Энтеротоксин	Нарушает проницаемость слизистой оболочки тонкого отдела кишечника
Минорные токсины	

Таблица 2 продолжение

<i>C. perfringens</i> тип В, С – δ (дельта)-токсин	Обладает гемолитической активностью
<i>C. perfringens</i> тип В, Е, D – λ (лямба)-токсин	Расщепляет денатурированный коллаген и желатин, обладает некротическими свойствами
<i>C. perfringens</i> тип А, С – κ (каппа)-токсин	Действует некротически, разрушает коллагеновые волокна соединительной ткани и ретикулярную ткань мышц
<i>C. perfringens</i> тип А, В, D, С, Е – θ (тэта)-токсин	Образует гемолиз, цитолиз
<i>C. perfringens</i> тип А, В, D – μ (мю)-токсин	Повышает проницаемость тканей
Нейраминидаза	Повреждает ганглиозиды клеточных рецепторов, вызывает тромбоз в капиллярах
<i>C. perfringens</i> тип А, В, D, С, Е, F – ν (ню)-токсин	Проявляет гемолитическую и некротизирующую активность

Из данных, представленных в таблице 2, видно, что α -токсин является основным токсином *C. perfringens* типа А, β -токсин – основной токсин бактерий типов В и С, ε -токсин образуют *C. perfringens* типов D и В, ι -токсин – специфичен только для типа Е; минорные: δ -токсин – основной токсин *C. perfringens* типов В, С, λ -токсин – основной токсин *C. perfringens* типов В, Е, D [90, 138, 184, 192, 196, 197, 211, 221, 225].

Вертиев Ю. В. утверждает, что анализ биологического действия токсинов позволяет сформировать положение о токсин-опосредованной обусловленности перфрингеоза (кlostридиоза, вызываемого *C. perfringens*) животных, при котором токсины являются веществами, вызывающими развитие основного симптомокомплекса заболевания [99, 100].

Накопившиеся в кишечнике токсины воздействуют на слизистые оболочки, затем проникают в кровь, поступают в печень. В слизистой оболочке кишечника токсины вызывают глубокие изменения, что приводит к нарушению барьерной функции. Токсины в необезвреженном виде, поступают в кровяное русло, поражают эндотелий сосудов, проникают в клетки организма, вызывая общую интоксикацию. Часть токсинов попадает в мезентериальные лимфатические узлы, образуя большое количество газов.

Действие токсинов обуславливает развитие патологии с проявлением профузной геморрагической диареи, судорог и параличей, что заканчивается, как правило, гибелью телят в течение короткого промежутка времени [16, 35, 173, 178, 180, 189, 190, 193].

1.5 Клинико-морфологическая характеристика анаэробной энтеротоксемии крупного рогатого скота

По данным большинства исследователей инкубационный период болезни колеблется от 12-14 ч. до 2-7 дней. Клинические признаки анаэробной энтеротоксемии зависят от степени интоксикации. Во многих случаях внешне здоровых животных с вечера – утром находили павшими. Болезнь протекает сверхостро, остро, и с момента проявления заметных признаков до гибели животного проходит от нескольких часов до 1-2 суток [3, 7, 149, 153, 200, 227].

Так, Зароза В.Г. утверждает, что у телят от 1-5 дневного до 4 недельного возраста, заболевание протекает остро, иногда смерть наступает через 3-4 часа. В начале заболевания развивается общая слабость, отказ от еды, колики, затем – парез конечностей, геморрагическая диарея с пузырьками газа и неприятным запахом, мышечная дрожь, анемия слизистых оболочек, диспноэ, незначительное повышение температуры тела. У больных появляются судороги, некоординированные движения и, перед смертью, развиваются конвульсии. У некоторых телят регистрируют кровотечение из естественных отверстий, диарею с примесью крови [41].

Большинство литературных источников отмечают, что у взрослых животных, особенно стельных коров, нетелей и у молодняка крупного рогатого скота старше 4-недельного возраста анаэробная энтеротоксемия протекает остро или сверхостро, продолжается 5-6 ч. и, редко, – 24-48 ч. Основные симптомы заболевания – отказ от корма, температура тела повышена или в норме, дискоординация движений, состояние возбуждения, парезы и параличи, сгибание головы и позвоночника, иногда отмечаются мышечная дрожь, эдематозная ин-

фильтрация подкожной соединительной ткани, прекращение сокращений преджелудков и тимпания, усиление перистальтики кишечника (диарея). Фекалии имеют дегтеобразный цвет с примесью крови. Перед гибелью учащается дыхание (тахипное), у некоторых животных отмечаются одышка, сердечная недостаточность и предсмертная конвульсия [20, 21, 30, 59, 68, 90, 95, 119, 134, 170].

Патологоанатомические изменения зависят от типа возбудителя, вызвавшего заболевание.

Для патоморфологической характеристики Москалева Н.В. совместно с соавторами в 2001 г. провела экспериментальное заражение четырех новорожденных телят культурой, содержащей энтеротоксин *Clostridium perfringens* типа А, с целью воспроизведения анаэробной энтеротоксемии телят. Данные исследования показали, что один теленок уже через 3 ч. заболел, а у остальных через 4-5 ч. наблюдали признаки интоксикации. В течение 5 суток три теленка пали, а один тяжело переболел.

При внешнем осмотре у трупов телят отмечали в области ануса и хвоста загрязнения волосяного покрова фекалиями. Конъюнктивы и слизистые оболочки носа и рта были анемичны. При вскрытии телят авторы констатировали набухание и гиперемию слизистой оболочки тонкого отдела кишечника, покрытой полосчатыми кровоизлияниями. В сычуге – серозно-геморрагическое, а в отдельных случаях – катарально-геморрагическое воспаление слизистой оболочки. Брыжеечные и порталые лимфоузлы были отечны, увеличены в размере, на разрезе – покрасневшие.

При гистологическом исследовании установлена острая застойная гиперемия сосудов сегмента кишок, набухание энтероцитов, а в некоторых случаях – разрушение крипт и десквамация энтероцитов.

Фекалии больного теленка и фильтрат содержимого тонкого отдела кишечника павших телят были токсичны для белых мышей, обладали выраженными эритемальными, летальными, диареагенными свойствами [95].

При энтеротоксемии, обусловленной *C. perfringens* типами В и С, Ургуев К.Р. и его соавторы обнаруживали в паренхиматозных органах у телят множественные кровоизлияния, геморрагическое воспаление тощей и подвздошной кишок с некрозами. Содержимое кишечника кровянистое. Было зарегистрировано большое количество субкапсулярных петехий в почках и печени. В грудной и брюшной полостях – избыточное количество жидкости кровянистого цвета [115, 146, 149].

По данным Салимова В.А. при заболевании, обусловленном *C. perfringens* типа D, при вскрытии трупов телят отмечали катаральное воспаление кишечника с полосчатыми кровоизлияниями. В редких случаях наблюдали размягчение почек. Наиболее выраженными изменениями являлись инъецированность кровеносных сосудов, отечность и увеличение брыжеечных лимфатических узлов, точечные кровоизлияния на сердце, дряблость и кровенаполненность печени, избыточное количество жидкости в грудной и брюшной полостях [126, 127, 128].

1.6 Вакцинные препараты против анаэробной энтеротоксемии крупного рогатого скота

Разработкой вакцины против анаэробной энтеротоксемии животных занимались многие исследователи (Каган Ф.И., Кириллов Л.В., Ургуев К.Р., Алешкевич В.Н., Глушкова А.И., Спиридонов Г.Н., Казимир А.Н., Курлович Д.В., Капустин А.В.) [1, 18, 19, 22, 31, 36, 39, 45, 48, 56, 59, 61, 69, 74, 80, 86, 95, 104, 109, 124, 150, 156].

В 1948 г. впервые в ветеринарную практику внедрил анатоксин-вакцину *Clostridium perfringens* Размазин М.И., которую использовали для профилактики анаэробной энтеротоксемии крупного рогатого скота.

В 1958 г. разработали вакцину концентрированную поливалентную гидроокисьалюминиевую против браздота, инфекционной энтеротоксемии, злокачественного отека овец и дизентерии ягнят. Её авторы, Каган Ф.И. и Колесова А.И., включали в состав вакцины следующие антигены: *C. perfringens* типов В,

С и D, *C. oedematiens* и *C. septicum*. В препарат также входил гель гидрата окиси алюминия, который обладает выраженным адьювантным и сорбционным действием, что, тем самым, позволяло увеличить иммуногенные свойства вакцины [56, 57]. Кроме того, благодаря работам Ленькова В.И. и Быченко Б.Д. (1958 г.), в технологию изготовления вакцины ввели процесс активации эpsilon-токсина *C. perfringens* типа D трипсином, что также позволило увеличить иммуногенность препарата [55, 82].

В дальнейшем было установлено, что вакцины, изготовленные по типу анатоксинов (без микробных клеток), с высокими исходными титрами специфических токсинов обладают существенно большей специфической активностью. Наилучшие результаты получали на специальных средах с определенным уровнем расщепления белка, проведением последующей очистки и концентрирования анатоксинов, обезвреженных теплом и формалином, с последующей сорбцией растворимых белковых антигенов на геле гидрата окиси алюминия и определением полноты сорбции специфических антигенов. Данные исследования позволили получить принципиально новый препарат при сохранении антигенного состава поливалентной вакцины (Каган Ф.И., Ургаев К.Р., Кириллов Л.В. и др.). В 1975 г. поливалентный анатоксин против клостридиозов овец внедрен в производство [56, 57, 71, 74, 144, 146, 147, 133]. Возбудители инфекционной анаэробной энтеротоксемии крупного рогатого скота и овец родственны в антигенном отношении, это определило, что вышеуказанные биологические препараты, предназначенные для овец, уже много лет применялись и для крупного рогатого скота.

Недостатком этих препаратов на протяжении всей истории их применения был их неполный антигенный состав, а, именно, отсутствие антигена типа А – основного возбудителя анаэробной энтеротоксемии у телят, что делало эти препараты малоэффективными в хозяйствах, где преобладает возбудитель этого типа [95, 112, 129, 133, 135].

Алешкевич В. Н. в Витебске в 1992 году разработал вакцину против анаэробной энтеротоксемии телят и свиней. Вакцина, представляющая собой комплексный препарат, предназначенный для иммунизации коров против болезней телят, содержала концентрированные анатоксины *C. perfringens* типов А, С, В, D в соотношении 100:200:200:200 ЕС, сорбированные на гидрате окиси алюминия [1].

Однако, литературный обзор не подтвердил, что вакцина применялась когда-либо на территории России и получила распространение применения в других странах.

В 1997 г. Казимир А.Н. получил ГОА-формолвакцину против анаэробной энтеротоксемии телят. Ученый использовал токсигенные штаммы для разработки вакцины *C. perfringens* типов А и С, выделенные от телят, павших от анаэробной энтеротоксемии [59]. Недостатком вакцины стало отсутствие в её составе *C. perfringens* типа D, который немаловажную роль играет в формировании иммунитета против анаэробной энтеротоксемии молодняка крупного рогатого скота. Широкого применения вакцина также не получила.

Из литературных данных по материалам исследований Курлович Д.В., Москалевой Н.В. и др. известно, что анаэробная энтеротоксемия у телят часто проявляется в виде смешанной инфекции с эшерихиозом [36, 44, 80, 91, 109, 125, 133, 139, 140, 158]. В Минске в 2000 году была предложена ассоциированная вакцина против колибактериоза и анаэробной энтеротоксемии телят на основе антигенов бактерий *C. perfringens* типа А (200 ЕС) и *E. coli* K99 и A20 (по 10 млрд. мкр. кл./мл.), которые подвергались дробной формалинизации до суммарной концентрации 0,4 %, конечного значения рН 6,8 и осаждению 10 %-ным раствором алюмокалиевых квасцов [96]. Авторы использовали эти технологические методы с целью получения высокоиммуногенного ассоциированного препарата. Однако, данная вакцина обладала низкой иммуногенной и антигенной активностью.

В 2013 г. в Казани Спиридонов А.Г. с соавт. разработали ассоциированную вакцину против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят. В состав вакцины были включены суспензии клеток штаммов: *C. perfringens* типа А № 28, *C. perfringens* типа D № 213, *C. perfringens* типа С № 392, инактивированных формалином, суспензия клеток *E. coli* KB-1, содержащая адгезивный антиген К 99, и суспензия клеток *E. coli* ПЗ-3, содержащая адгезивный антиген А 20 на физиологическом растворе, 6 %-ная гидроокись алюминия, ТС- и ТЛ-анатоксины *E. coli* KB-1 и *E. Coli* ПЗ-3 в соотношении 1:1 в культуральной среде с титром РДП 1:8-1:6.

Вакцинацию рекомендовано проводить на глубокостельных матках крупного рогатого скота путем подкожного введения в дозе 10 см³ двукратно за 50-60 дней до отела с интервалом 14 дней. Телят, полученных от иммунизированных маток, предписывают вакцинировать дважды в возрасте 20 дней с интервалом 14 дней в дозе 3 см³ [46, 109, 124, 135, 138, 140].

Для борьбы с клостридиозами сельскохозяйственных животных разработана вакцина «АНТОКС-9» в ФКП «Ставропольская биофабрика». Согласно инструкции препарат состоит из культур клеток *C. chauvoei*, *C. septicum*, анатоксинов *C. novyi* типа А и В, *C. perfringens* типов А, С, В и D, *C. sordellii*, *C. tetani*, инактивированных формальдегидом (0,5 %), с добавлением гидрата окиси алюминия – 15 %. Согласно инструкции по применению ей иммунизируют крупный рогатый скот и овец в возрасте от 45 дней. Вакцину вводят подкожно: овцам в бесшерстный участок под локтевым суставом, крупному рогатому скоту в заднюю треть шеи двукратно с интервалом 21-28 дней в объеме 4 см³. Ревакцинируют животных ежегодно однократно по аналогичной схеме. Телят и ягнят дополнительно однократно вакцинируют в возрасте 6 месяцев [48].

В 2011 г. Капустиным А.В. и соавт. разработана и изготовлена вакцина против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентная инактивированная «Клостбовак-8». Препарат содержит в своем составе следующие компоненты: культуры клеток *C. chauvoei*, *C. septicum*, анатоксинов *C. novyi*

(*oedematiens*) тип В, *C. perfringens* типов А, С и D, *C. tetani*, инактивированных формальдегидом (0,5 %), с добавлением гидрата окиси алюминия – 15 %. Согласно наставлению по применению иммунизируют крупный рогатый скот и овец способом, аналогичным вакцине «АНТОКС-9» [45, 47, 50, 61, 63, 64, 69, 120, 131].

Все перечисленные отечественные вакцины предназначены для специфической профилактики животных с 1,5-месячного возраста, а также стельных коров.

Однако, несмотря на актуальность современных ассоциированных вакцин, следует отметить, что высокое содержание антигенов отрицательно сказывается на безвредности применения препаратов, а также создает менее выраженный иммунитет к каждому из компонентов, что особенно заметно у молодняка. Поэтому, в хозяйствах неблагополучных по анаэробной энтеротоксемии, для вакцинации стельных коров с целью создания колострального иммунитета у новорожденных телят и иммунизации молодняка в постколостральный период формирования иммунного статуса (от 14-20 до 60-90 дней), целесообразно использовать моновакцины против отдельных видов возбудителей. В настоящее время таких препаратов отечественного производства нет, хотя их применение в стационарно неблагополучных хозяйствах эпизоотически обосновано и более эффективно.

Для специфической профилактики против анаэробной энтеротоксемии крупного рогатого скота разработаны зарубежные вакцины, которые зарегистрированы и сертифицированы для применения на территории Российской Федерации:

В Испании фирмой «Лабораториес Хипра С.А.» приготовлена вакцина ТОКСИПРА ПЛЮС. Антигенный состав вакцины представлен: β - и ϵ -токсоидами *C. perfringens* типов В, С и D, α -токсоидом *C. novii* типа В, α -токсоидом *C. septicum*, анакультурами *C. chavoe*, токсоидом *C. tetani*.

Вакцина, согласно наставления, вызывает формирование иммунного ответа у животных к клостридиозам через 21 день после двукратного введения, напряженность иммунитета у крупного рогатого скота сохраняется 12 месяцев. Вакцинацию предписывают взрослым животным крупного рогатого скота и телятам на откорме в дозе 4 см³ на одну голову с интервалом 20-25 дней, подсосным телятам – в дозе 2 см³ с интервалом 20-25 дней. Ревакцинируют животных ежегодно однократно в дозе 4 см³.

При выявлении в хозяйстве животных, больных энтеротоксемией, допускается ревакцинация всего поголовья, через 8-10 дней иммунизированных животных повторно вакцинируют в той же дозе [68].

Вакцина Миллениум выпускается «Венкофарма лаборатории Бразилии ЛТД». Вакцина против эмкара, газовой гангрены, энтеротоксемии, бактериальной гемоглобинурии и столбняка. Препарат предназначен для крупного рогатого скота, овец и свиней. Как указывает производитель в ее состав входят антигены: *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi* типов А и В, *C. perfringens* типов А, С, В и D, *C. sordellii*, *C. tetani*, *C. haemolyticum*. Иммунизируют крупный рогатый скот в возрасте от 40 дней в дозе 5 см³, через 30 дней повторно вакцинируют в той же дозе, и в дальнейшем – один раз в год [123].

Вакцина «ВанШотУльтра 8» производится в США фирмой «Пфайзер». Данная вакцина предназначена для профилактики клостридиозов и пастереллеза крупного рогатого скота, в состав входят инактивированные формалином компоненты: лиофилизированный – бактерин-токсоид *Manchemia* (*Pasteurella*) *haemolytica* и жидкий – токсид *Clostridium chauvoe*, *C. septicum*, *C. haemolyticum*, *C. novyi*, *C. sordellii*, *C. perfringens* типов D и C с добавлением адъюванта «Стимуген».

Позиционируется создание иммунитета против клостридиозов, вызываемых *C. chauvoe*, *C. septicum*, *C. haemolyticum*, *C. novyi*, *C. sordellii*, *C. perfringens* типов D и C, а также пневмонии, вызванной *Manchemia haemolytica*, через 3 недели после двукратной вакцинации в течение не менее 12 месяцев. В рекомен-

дваемых дозах вакцина безвредна и ареактогенна. Иммунизируют только клинически здоровых животных с 45-дневного возраста. Вакцину вводят подкожно двукратно с интервалом 4-6 недель в объеме 2 см³ [68].

Также фирма «Пфайзер» предложила ассоциированную вакцину «Скоугард 4КС». Как указывает производитель, вакцина обеспечивает колостральный иммунитет у новорожденных телят (после выпойки молозива от вакцинированных коров). Уровень защиты телят зависит от времени поения, качества и количества молозива, поэтому необходимо уделять особое внимание обеспечению телят достаточным количеством молозива от вакцинированных коров.

Вакцина содержит инаktivированные рота- (серотипы G6 и G10) и коронавирусы (*Hansen isolate*) крупного рогатого скота, инаktivированные бактерии *E. coli* энтеротоксигенного штамма NL-1005, имеющие адгезивный фактор K99, бета-токсоид *C. perfringens* типа C, консерванты – гентамицин (не более 30 мкг/мл), мертиолят (не более 0,01 %) и адьювант – Quil A. Как видим, данный препарат не включает антигены этиопатогенных клостридий других типов, актуальных для защиты телят.

Вакцина предназначена для иммунизации здоровых нетелей и беременных коров, вводится внутримышечно в область шеи в объеме 2 см³. Во время первичной вакцинации здоровых стельных животных вакцинируют двукратно с интервалом 3-4 недели. Вторую дозу вакцины следует вводить не позднее, чем за 3-6 недель до отела. Ревакцинация необходима перед каждым отелом. В редких случаях вакцина может вызвать анафилаксию или незначительный отек в месте инъекции у животных. Отек исчезает без лечения в течение нескольких дней. Также отмечается, что после вакцинации у некоторых животных может наблюдаться кратковременное повышение температуры тела [213].

В Уругвае фирма «Прондил» предложила инаktivированную вакцину «Мультикрос». Согласно инструкции, эта вакцина изготавливается из анатоксинов, полученных из культур *C. septicum*, *C. novyi* типа B, *C. sordellii*, *C.*

perfringens типов D и C, а, также, из инактивированных культур *C. chauvoei* и *C. haemolyticum* с добавлением алюмокалиевых квасцов в качестве адъюванта и фенола в качестве консерванта. Вакцинируют стельных коров и нетелей на 6-7 месяц беременности крупный рогатый скот подкожно в дозе 4 см³, через месяц повторно иммунизируют в той же дозе. Телят трех месячного возраста и старше, вакцину вводят подкожно в той же дозе, что указано выше, через месяц повторно вакцинируют в более низкой дозе 2 см³ [68].

Недостатком представленных зарубежных ассоциированных препаратов является их многокомпонентность, при антигенном составе, не отвечающем в полной мере угрозам эпизоотической ситуации на территории России. Кроме того, данные препараты являются дорогостоящими. Программа импортозамещения направлена на создание отечественных вакцин с высокой эффективностью и оптимальными качествами применения. Следует также отметить, что большинство вакцин отечественного и зарубежного производства не содержат антигена *C. perfringens* типа A, что делает специфические препараты малоэффективными в хозяйствах, где преобладает возбудитель этого типа. Все представленные препараты предназначены для вакцинации животных с 1,5-месячного возраста, а также стельных коров. Следует отметить, что для вакцинации в неблагополучных хозяйствах против анаэробной энтеротоксемии стельных коров с целью создания колострального иммунитета у новорожденных телят целесообразно использовать специфические анатоксин-вакцины против определенных видов возбудителей, этиологичных в эпизоотическом неблагополучии. Период от 14 дней до 60 дней в жизни теленка остается уязвимым при использовании действующих средств. А на этот возрастной период приходится большая часть случаев анаэробной энтеротоксемии. На данные аспекты указывают в своих работах Спиридонов А.Г., Москалева Н.В., Шевченко А.А., Сергеева Т.И., Петров А.М. [40, 95, 96, 110, 133, 134, 136, 153, 154]. В настоящее время специализированные препараты против анаэробной энтеротоксемии телят отечественного производства отсутствуют, хотя их использование в ста-

ционарно неблагополучных/условно-благополучных хозяйствах по анаэробной энтеротоксемии телят было бы оправдано и перспективно.

1.7 Основные направления лечебной стратегии

Анализ литературных источников показал, что проводить терапевтические мероприятия при анаэробной энтеротоксемии не всегда представляется возможным и эффективным из-за сверхострого и острого течения заболевания. Только раннее и быстрое оказание лечебной помощи дает положительный результат. С этой целью на начальных стадиях болезни необходимо введение антитоксической сыворотки в сочетании с медикаментозными средствами. Если заболевание обусловлено *Clostridium perfringens* типов В, С и D, то применяют бивалентную антитоксическую сыворотку против анаэробной энтеротоксемии овец в дозах 1000-3000 АЕ в сочетании с медикаментозными средствами – антибиотиками или сульфаниламидными препаратами [22, 29, 32, 96, 133, 157]. На эффективность применения при анаэробной энтеротоксемии телят, вызванной *C. perfringens* типа А, противогангренозной медицинской сыворотки, указывает Каган Ф.И. и соавторы. Применение такой сыворотки дало хороший лечебный эффект: после её введения в дозе 120-150 тыс. МЕ 37 телятам с яркими клиническими признаками болезни все животные выздоровели [58].

Из антибактериальных средств, согласно исследовательским данным, эффективны препараты пенициллиновой группы: амоксиклав (болюсы), бициллин-5, бициллин-3 и амоксициллин [19, 44, 59, 79, 123].

В некоторых источниках отмечена эффективность антибиотиков тетрациклиновой группы: биомицина, тетрамицина [36].

Также разные авторы в терапевтических мероприятиях предлагают использовать кобактан антибиотик, входящий в состав группы 4-го поколения цефалоспоринов [112, 154], энроксил 5 %-ный, относящийся к группе антибиотиков фторхиноловых [52, 79, 152], левомицетин, который входит в состав группы антибиотиков амфениколов [77, 90, 138].

Головко И.Д. с соавт. для лечения телят, больных энтеротоксемией, применяли смесь лекарственных препаратов селена и фармазина. Ее готовили из 0,1-0,15 %-ного водного раствора селена, 6 %-ного фармазина и стерильной дистиллированной воды. Из 158 больных телят, подвергнутых лечению, все выздоровели [19].

Для лечения молодняка крупного рогатого скота, больного анаэробной энтеротоксемией, разные авторы рекомендуют также использовать средства регулирующие функцию желудочно-кишечного тракта: ацидофильно-бульонную культуру (АВК), пропионово-ацидофильную бульонную культуру (ПАБК), ацидофильное молоко или сухой ацидофилин, ацидофильную простоквашу, пробиотики – диалакт, биофлор, биококтейль НК, подкисление питьевой воды и молока соляной кислотой [7, 19, 36, 39, 41, 70, 77, 82, 99, 132, 144].

Для уменьшения интоксикации и улучшения сердечной деятельности телятам вводят внутривенно раствор глюкозы с аскорбиновой кислотой, подкожно – кофеин или камфорное масло, внутримышечно – тетравит и тривит [101].

Тем не менее большинство ученых отмечают низкую терапевтическую эффективность при клинических случаях анаэробной энтеротоксемии молодняка крупного рогатого скота, высокую летальность и необходимость специфической профилактики [1, 18, 19, 22, 31, 36, 39, 45, 48, 56, 59, 61, 69, 74, 80, 86, 95, 104, 109, 124, 150, 156].

1.8 Заключение по обзору литературы

Приведенные в обзоре литературы данные свидетельствуют о том, что анаэробная энтеротоксемия крупного рогатого скота регистрируется во многих зарубежных странах и в России. Это связано с широким распространением возбудителя *Clostridium perfringens* в окружающей среде, а также – с невысокой эффективностью специфических средств профилактики, нарушением ветеринарно-санитарных и зоогигиенических мероприятий при содержании животных. Важными факторами, способствующими возникновению и развитию анаэ-

робной энтеротоксемии, являются неудовлетворительное ветеринарно-санитарное состояние животноводческих помещений, плохой уход и неполноценное или несбалансированное кормление стельных коров и нетелей.

Учеными многих стран проведены значительные исследования по изучению этиологии, патогенеза и систематики возбудителя анаэробной энтеротоксемии. Разработаны и внедрены лабораторные методы диагностики. Для специфической профилактики клостридиозов крупного рогатого скота разработаны и рекомендованы ассоциированные инаktivированные вакцины. Однако предложенные средства направлены на профилактику болезни преимущественно у взрослого поголовья крупного рогатого скота или множественно ассоциированы антигенами различных возбудителей других болезней. Это имеет некоторые технологические преимущества, но для обеспечения защиты от заражения и заболеваемости анаэробной энтеротоксемией животных в ранний постнатальный период развития (молозивный и раннемолочный) данные средства не предусматривают актуальный эпизоотический состав антигенов *C. perfringens* и, поэтому, в современных условиях отечественного скотоводства не обладают достаточной эффективностью. Кроме того, особенности иммунного статуса молодняка являются ограничителем в использовании множественно ассоциированных вакцин. Иммунологическая эффективность при вакцинации в постнатальный период прямо пропорциональна специфичности препарата. Тем более большинство предложенных и зарегистрированных препаратов являются импортными. Создание отечественных средств профилактики анаэробной энтеротоксемии крупного рогатого скота в связи с вышеперечисленным – актуальная проблема.

Специфические биопрепараты для профилактики анаэробной энтеротоксемии у молодняка крупного рогатого скота неонатального и раннего постнатального периода отсутствуют. Комплексные противоклостридиозные вакцины не предусматривают использование молодняку до 45-дневного возраста, не обеспечивая защиту в период снижения титра колостральных антител. Зару-

бежные аналоги стоят дорого и, как уже отмечалось, не в полной мере отвечают угрозам эпизоотической ситуации в России. В данной связи актуализируется необходимость исследований по разработке наиболее эффективных средств специфической профилактики анаэробной энтеротоксемии у молодняка крупного рогатого скота нозологической направленности. Указанная ситуация послужила основанием для проведения настоящей работы.

ГЛАВА 2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Работа выполнена в 2014-2019 гг. на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина».

Изучение случаев анаэробной энтеротоксемии молодняка крупного рогатого скота проводили в хозяйствах: ОАО «Возрождение» Кировской области, ЗАО «Заря» Саратовской области, ОАО «Биотон» Самарской области, ЗАО «Селково» и ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское» Московской области, СПК им. Ленина Нижегородской области, СПК «Воронцово» Тверской области, ЗАО «Колос» Белгородской области, ООО «Уральские Нивы» Челябинской области, ЗАО «Агрофирма Труженник» Курской области, СПП «Красное Знамя» республики Мордовия.

Изучение отдельных биологических свойств изолятов клостридий проводили на базе федерального государственного бюджетного учреждения «Всероссийский государственный центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов».

В работе использовали производственные штаммы, полученные из коллекции ФГБУ «ВГНКИ»: *C. perfringens* типов А – № 28, С – № 3 и D – № 91. Для дифференциальной диагностики применяли: набор окраски по Граму, ферментативный тест «RapID ANA II», диагностические антитоксические сыворотки клостридиум перфрингенс типов А, С, D (производства ФКП «Курская биофабрика-фирма «БИОК»), стандартизованные токсины *C. perfringens* типов А, С, В, D. Применяли следующие питательные среды: кровяной агар с 0,5 % глюкозы, агар Шедлера с добавлением 10 % крови барана, Китта-Тароцци, а также МПА, МПБ, агар и жидкое Сабуро, МППБ, мясо-казеиновую среду.

Для изготовления анатоксинов использовали следующие реактивы: 10 % раствор едкого натра, 50 % раствор глицерина, 0,6 % раствор формалина с со-

держанием 37 % формальдегида, 40 % раствор глюкозы, 3 % раствор гидроокиси алюминия, 0,9 % раствор хлористого натрия, сухой трипсин активностью 150-250 ЕД.

Лабораторная посуда, расходные материалы и оборудование: пробирки стеклянные, пипетки градуированные вместимостью 1 по 10 см³, флаконы стеклянные 100 см³, шприцы инъекционные, вместимостью 1-10 см³, газогенераторные пакеты, стандарты мутности по МакФарланду, набор оптических стандартов мутности ГИСК им. Тарасевича, чашки Петри, дозатор электронный Midi Plus 1-канальный 1-50 см³ Sartorius, ламинарный шкаф БАВп-01-«Ламинар-С.»-1,2, весы аналитические, термостат суховоздушный L1B-300M «Daihan Labtech» с температурой нагрева + 37,0±1,0 °С, термостат суховоздушный TCO-1/80 СПУ нагрева + 22,0±1,0 °С, термостат-инкубатор MIR-262 «Sanyo» с температурой нагрева + 30,0±1,0 °С, pH-метр-анализатор воды HI 2215 «Hanna Instruments», микроскоп «ЛОМО Биолом», центрифуга «Sigma 3-30 KS» с 5 тыс. об./мин., холодильник «ATLANT ХМ-6026-031», анаэроустат 3 литра, рассчитанный на 15 чашек «Schuett-biotec GmbH», автоклав вертикальный по ГОСТ 9586-75, нефелометр «Sensititre Nephelometer», вакуумный насос, реакторы для культивирования бактериальной массы «Binder».

Исследования проводили на 7068 белых беспородных мышах массой 16,0±2,64 г, 297 кроликах породы шиншилла массой 2,0±0,54 кг, 622 морских свинках массой 250,0±100,42 г, 487 коровах и 657 телятах разного возраста и физиологического состояния.

В ходе исследований применяли методы: эпизоотологический (анализировали эпизоотическую ситуацию по документам ветотчетности хозяйств, проводили скрининговые исследования на клостридиозы у крупного рогатого скота в хозяйствах Центрального, Приволжского и Уральского федеральных округов); бактериологический (исследовали отобранный патматериал из 11 хозяйств и поступивший материал из хозяйств в лабораторию ФГБУ «ВГНКИ» по государственной программе эпизоотологического мониторинга на клостридиозы:

фиксируют и микроскопировали мазки-отпечатки, окрашенные по Граму, культивировали материал на питательных средах, исследовали биохимические свойства изолятов, определяли типы токсинов, исследовали патогенность и токсигенность выделенных культур); методы биотехнологии (методы технологии приготовления инактивированных анатоксин-вакцин, контроль препарата на стерильность, безвредность, иммуногенность); клинический (осмотр, пальпация, аускультация, термометрия, исследования фекалий); патологоанатомический (вскрытие, характеристика, отбор материала); статистический метод исследования.

Отбор патологического материала для исследований. Во время выполнения работы мы провели бактериологические исследования фекалий от больных и патологического материала от павших и вынужденно убитых животных. Вскрытие вынужденно убитых и павших животных проводили методом изолированного извлечения внутренних органов (методом Эрвирхова) [126, 128] и методом полного извлечения органов (Шора) [127]. Для бактериологических исследований у павших животных отбирали сердце (кровь, кусочки миокарда), образцы мышечной ткани, содержимое и участки тонкого отдела кишечника, кусочки паренхиматозных органов (печень, почки, селезенка).

Всего на наличие возбудителей анаэробных инфекций крупного рогатого скота было исследовано 834 пробы патологоанатомического материала, включая материал, поступивший в лабораторию.

Бактериологическое исследование. Исследование патологического материала с целью выявления возбудителей клостридиозов проводили согласно ГОСТ 26503-85 «Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики клостридиозов» [25].

Для выделения анаэробных культур микроорганизмов патологический материал высевали на питательные среды Китта-Тароцци, агар Шедлера с добавлением 10 % крови барана, кровяной агар с 0,5 % глюкозы, а также на МПА, МПБ. Чашки Петри помещали в анаэростат с газогенераторным пакетом и ин-

кубировали при температуре $+ 37,0 \pm 1,0$ °C. Через 24 и 48 часов культивирования посеvy просматривали на наличие характерного роста анаэробов на средах Китта-Тароцци (интенсивное помутнение, обильный осадки с просветлением среды, газообразование), готовили мазки, которые окрашивали по Граму. При обнаружении в мазках грамположительных крупных палочек, характерных по морфологическим свойствам для клостридий, проводили пересев на агар Шедлера с добавлением 10 % крови барана.

Культивирование проводили в анаэростате с использованием газогенераторных пакетов. После 48 часов культивирования учитывали результаты посевов и отбирали характерные колонии для накопления. Идентификацию клостридий проводили по ГОСТ 26503-85. При идентификации микроорганизмов с помощью ферментативного теста «RapID ANA II» приготовили бактериальную суспензию с концентрацией 3 единицы в соответствии со стандартом мутности МакФарланду. Полученную суспензию равномерно распределяли по лункам и культивировали в термостате при температуре $+ 37,0 \pm 1,0$ °C в течение 4-6 часов. Затем в лунки добавляли реагенты «RapID ANA II Reagent» и «RapID Stop Indole». Результаты заносили в базу данных программного обеспечения и получали идентификацию микроорганизма до вида.

Для выявления типов летальных токсинов *C. perfringens* использовали реакцию нейтрализации с использованием антитоксических сывороток клостридиум перфрингенс типов А, С и D. Исследуемую бактериальную суспензию разливали в $1,0 \text{ см}^3$ в четыре пробирки, добавляли $1,0 \text{ см}^3$ сыворотки каждого типа: в первую пробирку – типа А, второго типа С, третьего типа D (активность каждого типа сывороток предварительно доводили до 10 антитоксических единиц (АЕ) стерильным 0,9 % раствором хлорида натрия), в четвертую пробирку добавляли $1,0 \text{ см}^3$ 0,9 % изотонического раствора хлорида натрия, что служило контролем. Смесь исследуемой бактериальной суспензии, физиологического раствора и сывороток инкубировали при температуре $+ 37,0 \pm 1,0$ °C в течение 45 минут, затем вводили внутривентально в дозе $0,5 \text{ см}^3$ двум белым

мышам. Для каждой смеси использовался отдельный шприц. Животные наблюдались в течение 48 часов [49].

Результаты реакции нейтрализации учитывались по гибели белых мышей в контрольной группе. Животные, получившие смесь токсина и гомологичной сывороткой, оставались живы, когда контрольные лабораторные модели умирали.

Патогенность выделенных изолятов определяли на морских свинках массой $250,0 \pm 100,42$ г. и кроликах массой $2,0 \pm 0,54$ кг. Исследуемую культуру микроорганизма вводили внутримышечно в объеме $0,5 \text{ см}^3$ для морских свинок и $1,0 \text{ см}^3$ для кроликов, используя по два животных. Результат учитывали при заболевании морских свинок и их гибели в течение 48 часов.

Определение токсигенности выделенных изолятов проводили экспериментальным заражением лабораторных животных, для чего использовали белых мышей. Для определения токсигенности *Clostridium* использовали наиболее патогенные изоляты, которые культивировали при $+ 37,0 \pm 1,0$ °C в течение 8-16 ч. на МППБ с добавлением 0,5 % глюкозы к объёму среды. Далее токсинсодержащую культуральную жидкость центрифугировали при 3000 об./мин., в течение 20 минут, затем полученный супернатант фильтровали через стерилизующие фильтры. Полученную суспензию вводили внутривенно в дозе $0,5 \text{ см}^3$ белым мышам. Токсигенными изоляты признавались, только когда белые мыши умирали в течение 12 часов, а в случае смерти в более позднее время (до 24 часов) проводили бактериологическое исследование для исключения сопутствующих инфекций.

Антибиотикорезистентность выделенных клостридий исследовали методом диффузии в агаре с применением стандартных дисков.

Для изготовления препарата использовали производственные штаммы, обладающие высокой антитоксической активностью, – *C. perfringens* типов А – № 28, С – № 3 и D – № 91. Согласно данным паспорта на производственный штамм *C. perfringens* тип С № 3, возбудитель был выделен от павшего поросенка.

ка в Тульской области в 1988 г. Сторожевым Л.И. и Кирилловым Л.В. Штамм *C. perfringens* тип D № 91 впервые выделен в Южно-Казахстанской научно-исследовательской ветеринарной станции от овцематки в Кзыл-Ордынской области в 1958 г., производственный штамм *C. perfringens* тип А № 28 был выделен в США, а депонировали в 1952 г. в Государственном национальном ветеринарном институте Польши. Нами штаммы получены из коллекции производственных штаммов *C. perfringens* ФГБУ «ВГНКИ». Исследования их биологических свойств подтвердили таковые, заявленные в паспортах.

Культуры пересевали на МППБ под вазелиновое масло с последующим посевом во флаконы с мясо-казеиновой средой, pH 7,5-8,0. Посевы инкубировали при температуре $+37,0 \pm 1,0$ °C в течение: типа А и С-6 ч., типа D-8 часов.

После окончания процесса культивирования отбирали пробы для определения: чистоты роста культур на средах – МПБ, МПА, жидкое и агар Сабуро, Китта-Тароцци и микроскопирование мазков окрашенных по Граму. Полученные культуры с типичной морфологией и окраской, пересевали глубинным способом посева, в мясо-казеиновую среду с добавлением 40 % раствора глюкозы в реакторы. Культуры *C. perfringens* типа С накапливали и выращивали в течение 8-12 часов, *C. perfringens* типа А – 4-6 часов и типа D – 16-18 часов при температуре $+37,0 \pm 1,0$ °C. Во время роста культуры *C. perfringens* типа D дважды подщелачивали питательную среду 10%-ным раствором каустической соды, до получения pH 7,8, добавляли стерильный раствор трипсина, культуру в реакторе перемешивали в течение 1,5-3 ч. каждые 30 минут и за два часа до окончания роста добавляли 40 % раствор глюкозы.

Полученные культуры проверяли на чистоту роста посевом на питательные среды – МПБ, МПА, жидкое и агар Сабуро, Китта-Тароцци и микроскопированием мазков.

После проверки чистоты роста определяли степень токсичности посевов. Для этого культуральную жидкость *C. perfringens* типа С разбавляли физиологическим раствором в соотношении 1:10, 1:50, 1:100, 1:200 и т.д. до 1: 6400; для

C. perfringens тип А разбавляли в соотношении 1:10, 1:50, 1:100, 1:150 и т.д. до 1: 300; культуру *C. perfringens* типа D разбавляли в соотношении 1:10, 1:50, 1: 100, 1:150, 1:200 и т.д. до 1: 3000. Полученные суспензии вводили внутривенно, используя по две белые мыши на каждое разведение в дозе 0,5 см³. Наблюдали за животными в течение 24 часов. Значение токсичности культур являлось максимальное разведение, от которого погибали мыши. Например, если белые мыши умирали от введения 0,5 см³ в разведении 1:1500, а в разведении 1:2000 оставались живыми, то в 1 см³ культуры содержалось 2000 Dlm.

В полученные культуры *C. perfringens* типов А, С и D добавляли дробно формалин содержащий 37 % формальдегида из расчёта 0,6 % от объёма, перемешивали, устанавливали рН 7,2. Инактивацию анатоксинов проводили при + 37,0±1,0 °С в течение 10-12 суток, с ежедневным перемешиванием 3-4 раза.

Инактивированные культуры центрифугировали для удаления бактериальной массы при 3000 об./мин. в течение 30 минут.

Затем анатоксины проверяли на стерильность и остаточную токсичность. Остаточную токсичность определяли на лабораторных белых мышах. Инактивированную культуральную жидкость разводили физиологическим раствором в соотношении 1:10 и вводили внутривенно в дозе 0,5 см³ двум белым мышам. Период наблюдения за животными составлял 24 часа. Учёт полученных результатов: анатоксины считались не токсичными, если все животные оставались живыми и клинически здоровыми в течение суток наблюдения. Стерильность проверяли путем посевов на среды: МПА, МПБ, Китта-Тароцци, жидкое и агар Сабуро. Посевы контролировались в течение 14 дней. Рост бактериальной и грибковой микрофлоры на питательных средах должен отсутствовать.

После установления остаточной токсичности и стерильности инактивированных анатоксинов в реакторы добавляли трехпроцентный стерильный раствор гидроксида алюминия в количестве 15-18 % от объёма, смесь тщательно перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 2-5 суток до полного осветления надосадочной жидкости. После достижения полной сорбции ана-

токсинов декантировали прозрачную надосадочную жидкость в количестве 75-80 % от общего объема.

Концентрированные анатоксины *C. perfringens* типов А, С и D смешивали в равных соотношениях 1:1:1 в стерильных условиях при перемешивании в течение 60 минут с помощью мешалки, после чего устанавливали pH 7,0-7,7.

Полученную экспериментальную серию поливалентного анатоксина *C. perfringens* типов А, С и D проверяли на стерильность в соответствии с ГОСТ 28085-2013 «Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Метод бактериологического контроля стерильности» [26]. Проводили посев препарата на жидкие среды – МПБ, Сабуро, Китта-Тароцци и твердые среды: МПА, Сабуро агар. На посев использовали Китта-Тароцци – две пробирки и два флакона, на остальные питательные среды брали по три пробирки и две чашки Петри. Посевы инкубировали на среде Сабуро при температуре $+ 22,0 \pm 1,0$ °С, а на других средах – при температуре $+ 37,0 \pm 1,0$ °С. Наличие роста определяли визуально в течение 14 дней. Метод заключался в определении бактериальной микрофлоры и грибов из образцов анатоксина на питательных средах. Отсутствие роста посторонней микрофлоры на питательных средах указывало на стерильность препарата.

Определение остаточной токсичности анатоксина проводили следующим образом. Для этого 10 белым мышам подкожно вводили инаktivированный анатоксин в удвоенной дозе – $1,0 \text{ см}^3$. Период наблюдения за животными составлял 10 дней. Учёт результатов: препарат считался нетоксичным, если все животные оставались живы и клинически здоровы в течение 10 дней наблюдения.

Безопасность поливалентного анатоксина осуществляли в соответствии с ГОСТ 31926-2013 «Средства лекарственные для ветеринарного применения. Методы определения безвредности» [27]. Исследование проводилось на 10 белых мышах и 5 морских свинках. Препарат вводили подкожно в область спины, белым мышам – в объёме $0,5 \text{ см}^3$, морским свинкам – в дозе $1,0 \text{ см}^3$. Период

наблюдения за животными составлял 10 дней. Результаты безвредности препарата оценивали по клиническому состоянию животных и осмотру места инъекции. Серию анатоксина считали безвредной, если все 10 белых мышей и 5 морских свинок оставались живы и клинически здоровы в течение 10 дней наблюдения. При выявлении случаев гибели животных, проверку на безвредность повторяли на удвоенном количестве животных. В случае повторной гибели и заболевания лабораторных животных от введения анатоксина, серию препарата браковывали.

Определение опытной летальной дозы Ld_{50} рассчитывали по формуле Кербера-Ашмарина, используя результаты испытаний: $\lg Ld_{50} = \lg D_w - \lg \sigma (\sum Li - 0,5)$, где: $\sum Li$ – сумма отношения количества павших животных к взятым на каждую тест-дозу посевного материала, 0,5 – коэффициент, D_w – максимальная из использованных тест-доз; σ – шаг разведения.

Определение антитоксической (иммуногенной) активности поливалентного анатоксина проводили на 5 кроликах. Препарат вводили подкожно в дозе 2 см³ с интервалом 21 день. В течение 14 дней после последнего введения препарата у иммунизированных кроликов брали кровь из ушной вены. В сыворотках крови от иммунизированных кроликов определяли титр антитоксических антител определяли с помощью реакции нейтрализации. Для этого в полученную сыворотку добавляли стандартизированные токсины *C. perfringens* типов А, С и D с установленной активностью 20 Dlm/см³ в соотношении 1:1, смесь токсинов с сывороткой инкубировали для нейтрализации токсинов при температуре + 37,0±1,0 °С в течение 45 мин, затем вводили внутривенно по 0,5 см³, используя по пять белых мышей на каждую смесь. Для контроля активности токсинов каждый из них разводили до концентрации 2 Dlm в 1 см³. Растворы токсинов смешивали, затем помещали в термостат при температуре + 37,0±1,0 °С на 45 мин, после чего полученную смесь вводили внутривенно белым мышам в дозе 0,5 см³, используя по 5 мышей на каждую пробу. Период наблюдения за животными составлял 3 дня. Результат исследования антитоксической активности ре-

гистрировали по количеству павших белых мышей в опытных и контрольной группах.

Производственные испытания проводили в ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское» Сергиев-Посадского района Московской области. Эффективность анатоксина оценивали по количеству больных и павших животных от анаэробной энтеротоксемии в широких группах аналогов – иммунизированных «Поливалентным анатоксином *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят» и вакцинированных ассоциированной зарубежной вакциной. Животные находились под наблюдением в течение 14 месяцев.

Для определения антигенной активности препарата использовали сыворотку крови иммунизированных телят. Сыворотку крови подопытных телят объединяли и смешивали с установленной дозой токсина. Смесь сыворотки и токсина выдерживали при температуре $+ 37,0 \pm 1,0$ °C в течение 45 мин, затем полученную суспензию вводили внутривенно в дозе 0,2 см³ четырем белым мышам. Полученные результаты учитывались для выживания лабораторных животных через 72 часа. Полученные результаты сравнивали с эффективностью эталонного антитоксина *C. perfringens*, калиброванного в МЕ.

Согласно Европейской Фармакопеи 8.0, вакцины против *Clostridium perfringens* для ветеринарного применения, должны обеспечивать образование анитоксических антител не менее 1 МЕ α -антитоксина в 1 мл., 10 МЕ β -антитоксина в 1 мл. и не менее 5 МЕ ϵ -антитоксина в 1 мл.

Статистическая обработка. Для обработки результатов исследований использовали методы вариационной статистики по Стьюденту, программу Biostat.

2.2 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

2.2.1 Эпизоотологические данные по заболеванию анаэробной энтеротоксемией крупного рогатого скота в России

Согласно отчетам Федерального государственного бюджетного учреждения «Центр ветеринарии» [161], в России зарегистрировано большое количество клостридиозных заболеваний, среди которых преобладает анаэробная энтеротоксемия крупного рогатого скота, случаи заболеваемости представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Случаи анаэробной энтеротоксемии крупного рогатого скота в РФ

Отчётный год	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Установленных случаев (животных)	782	561	1079	237	2	352	10	27	12
Неблагополучных пунктов	116	64	75	53	1	16	3	5	3
Летальность*, %	79,3	99,8	88,6	97,5	100	96,6	100	100	100

* с учётом коэффициента вынужденного убоя

Из представленной таблицы 3 видно, что заболевание широко распространено в нашей стране. Заболевание проявляется энзоотическими или спорадическими, но имеет четкое постоянство и высокую летальность: 79,3-100 %. Согласно официальной статистике, количество случаев анаэробной энтеротоксемии в последние годы сократилось, но многие хозяйства избегают бактериологической диагностики в государственных лабораториях, тем самым скрывая проблему хозяйства. Также, не во всех случаях заболеваемости и смертности, когда они не носят массового характера, специалисты ветеринарной службы и производства прибегают к дифференциальной диагностике.

2.2.2 Особенности клинико-морфологического проявления анаэробной энтеротоксемии у крупного рогатого скота

В ходе выполнения настоящих исследований изучали случаи анаэробной энтеротоксемии у молодняка крупного рогатого скота в различных хозяйствах Российской Федерации, а также сопутствующие случаи анаэробных инфекций у коров. Всего в период 2014-2018 гг. было изучено 371 случаев заболеваемости в Центральном, Приволжском и Уральском федеральных округах.

Анаэробную энтеротоксемию у телят неонатального возраста отмечали в 135 случаях. Начало заболевания характеризовалось повышением температуры тела до $42,5 \pm 0,16$ °С. Такая температура держалась в течение нескольких часов, затем снижалась до $38,0 \pm 0,6$ °С. Заболевание отмечено учащением пульса $157,1 \pm 2,3$ уд./мин. и дыхания $61,5 \pm 1,4$ д.д./мин., угнетенным состоянием, отказом от корма, вялостью. Телята больше лежали, вытянув шею, у них фиксировали нарушение координации движения, в 102 случаях отмечали парезы и параличи.



Рисунок 1 – Диарея с примесью крови у новорожденного теленка

У неонатального молодняка (до 10-14-дневного возраста) отмечали диарею с примесью крови в 98 случаях. Кал вначале был жидкий со слизью, желтого или серо-желтого цвета, содержал пузырьки газа с неприятным запахом, а через 1-2 дня становился буро-коричневым (рис. 1). В дальнейшем, у больных телят появлялся профузный понос с непроизвольным актом дефекации. У 41 теленка регистрировали анемию видимых слизистых оболочек, гематурию. В области подчелюстного пространства, шеи, подгрудка, живота, спины, задних конечностей прижизненно отмечали инфильтраты в подкожной клетчатке. Гибель наступала через 2-4 дня после начала заболевания. Из 135 изученных случаев гибель фиксировали у 82 животных, ещё 21 были вынуждено убиты, а остальные 32 теленка переболели с благоприятным исходом на фоне интенсивной терапии, но они, в дальнейшем, значительно отставали в росте и развитии. Основные клинические признаки представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Особенности клинической картины при анаэробной энтеротоксемии у неонатальных телят

Симптомы	Абсолютное значение, гол.	Относительная значимость, %
Нарушение координации движения	123	91,1
Парезы или параличи	102	75,5
Диарея с примесью крови	98	72,6
Подкожные инфильтраты	135	100
Анемия	41	30,4
Профузный понос	86	63,7
Одышка	64	47,5
Колики	5	3,7
Олигоурия	24	17,7
Всего случаев заболевания анаэробной энтеротоксемии (гол.)	135	

Из таблицы 4 следует, что у телят неонатального периода основными клиническими признаками являются – подкожные инфильтраты, нарушение координации движения и парезы или параличи.

При вскрытии павшего и вынужденно убитого молодняка фиксировали наиболее характерные патологоанатомические признаки: трупное окоченение было выражено слабо, из анального отверстия вытекала кровь, отмечали анемию видимых слизистых оболочек. В подкожной клетчатке, в области подчелюстного пространства, шеи, подгрудка, спины, задних конечностей находили серозно-геморрагические инфильтраты с пузырьками газа. Такие же инфильтраты отмечены в сердечной сумке, под серозными оболочками, в околопочечной ткани, брыжейке у 47 павших и вынужденно убитых телят, что составляет 44,5 % встречаемости признака. Также во всех случаях находили скопление кровянистой жидкости в брюшной полости (рис. 2).



Рисунок 2 – Скопление кровянистой жидкости в брюшной полости

Слизистая сычуга и слизистая тонкого отдела кишечника были набухшие, гиперемизированные, с полосчатыми и точечными кровоизлияниями, покрыты обильно слизью. Сердечная мышца – дряблая, бледно-розового цвета. На эпикарде и эндокарде обнаруживали точечные и полосчатые кровоизлияния, в области трехстворчатого клапана отмечали разлитое кровоизлияние в большинстве случаев. Печень – увеличена, бледная, гнилостного цвета, паренхима – дряблая, желчный пузырь переполнен желчью, мезентериальные лимфатиче-

ские узлы – набухшие, отечные, гиперемированные, на разрезе – сочные. Легкие – анемичные и немного отечны (рис. 3). Кровоизлияния в подкожной клетчатке отмечали в 103 случаях (100%).



Рисунок 3 – Анемичные легкие

Основные патологоанатомические признаки у неонатальных телят при заболевании предоставлены в таблице 5.

Таблица 5 – Патологоанатомические признаки при анаэробной энтеротоксемии у неонатальных телят

Патологоанатомические признаки	Абсолютное значение, гол.	Относительная значимость, %
Трупное окоченение выражено слабо	98	95,1
Выделение крови из анального отверстия	98	95,1
Серозно-геморрагические инфильтраты в подкожной клетчатке	103	100
Гиперемия и отёк мезентериальных лимфоузлов	56	54,4
Анемия и отёк легких	84	81,6
Сердечная мышца дряблая, бледно-розового цвета	87	84,5
Печень – гниlostного цвета, дряблая	90	87,4
Слизистые оболочки сычуга, тонкого и толстого отделов кишечника геморрагически воспалены	79	76,7
Мочевой пузырь переполнен мочой, под серозной оболочкой – кровянистые инфильтраты	4	3,9
Скопление кровянистой жидкости в брюшной и грудной полостях	88	85,4
Всего пало (гол.)	103	

Представленные данные в таблице 5 указывают на характерные патолого-анатомические признаки: в подкожной клетчатке – серозно-геморрагические инфильтраты, трупное окоченение выражено слабо, печень – гнилостного цвета, кишечные кровотечения и геморрагическое поражение слизистой.

У телят от 10- до 30-дневного возраста в начале заболевания наблюдали жидкие фекалии серо-желтого цвета со слизью, неприятным запахом, пузырьками газа и небольшой примесью крови. Через сутки понос становился профузным, акт дефекации был непроизвольным. У 67 (из 105) телят регистрировали профузный понос с зиянием ануса (драстический синдром). В подкожной клетчатке, в области подчелюстного пространства, шеи, подгрудка, спины, задних конечностей находили крепитирующие при пальпации серозно-гемморрагические инфильтраты (рис. 4).



Рисунок 4 – Инфильтраты в подкожной клетчатке в подглазничной области у телёнка 25-дневного возраста

В достаточно короткий промежуток времени (6-48 часов) у больных развивались признаки обезвоживания организма: олигоурия, эксикоз, энофтальм, потеря тургора кожи, матовость шерстного покрова. Температура тела у молодняка раннего постнатального периода (10-30-дневного возраста) была повышенной – $42,1 \pm 0,6$ °C. Пульс – $129,2 \pm 0,7$ уд./мин., аритмичный. Дыхание –

жесткое, частое: $73,3 \pm 0,6$ д.д./мин. с затруднением на вдохе. Таким образом, у молодняка этой группы отмечали тахикардию, тахипное, аритмию инспираторную, одышку (рис. 5), перитическую гипертермию, длящуюся 6-24 часов и переходящую в послабляющую лихорадку возрастного типа.



Рисунок 5 – Одышка у теленка

В 98 случаях у молодняка этой группы присутствовали признаки сильной интоксикации: угнетенное состояние – сопор, олигоурия, мышечная дрожь, в 97 случаях отмечали колики. Животные постоянно лежали, вытянув шею или запрокинув голову на бок, вяло реагировали на окружающих. Большинство животных (в 64 случаях) погибали через 2-3 дня и (в 11 случаях) через 4-5 дней после начала болезни. В 7 случаях животные погибли молниеносно без видимых клинических признаков заболевания. Результаты семиотического исследования при анаэробной энтеротоксемии у телят постнатального периода представлены в таблице 6.

Таблица 6 – Клинические признаки у телят постнатального периода

Симптомы	Абсолютное значение, гол.	Относительная значимость, %
Нарушение координации движения	31	29,5
Парезы или параличи	14	13,3
Диарея с примесью крови	61	58,1
Подкожные инфильтраты	85	80,9
Профузный понос	57	63,8
Анемия	10	9,5
Одышка	72	68,6
Слюнотечение	48	45,7
Олигоурия	98	93,3
Колики	97	92,4
Мышечная дрожь	98	93,3
Абдоминальные судороги	31	29,5
Всего случаев заболевания анаэробной энтеротоксемии (гол.)	105	

Из данных таблицы 6 следует, что у телят постнатального периода преобладают олигоурия, мышечная дрожь, колики, инфильтраты в подкожной клетчатке, одышка, профузный понос, диарея с примесью крови.

При вскрытии трупов телят наблюдали скопление серозно-фибринозного экссудата в грудной и брюшной полостях, точечные кровоизлияния на эпикарде, отек легких (рис. 6).



Рисунок 6 – Скопление серозно-фибринозного экссудата в грудной полости и отек легких у телёнка 20-дневного возраста

В слизистой сычуга, тонкого и толстого отделов кишечника выявляли геморрагическое воспаление. У телят двухнедельного возраста в сычуге находили серо-желтые, творожистые, рыхлые массы с хлопьями свернувшегося молока (рис. 7).



Рисунок 7 – В сычуге серо-желтые, творожистые массы

В 3 случаях на слизистой сычуга обнаруживали до 6 круглых язв, величиной 1 см x 1 см. Мезентериальные лимфатические узлы были отечны, увеличены, на разрезе стекала мутная жидкость. Печень при вскрытии ранних постнатальных телят была кровенаполнена, увеличена в объеме, дряблой консистенции. Почки – увеличены, размягчены, границу между корковым и мозговым слоями не визуализировали. Селезенка – анемичная, пульпа размягчена. Мочевой пузырь наполнен мочой, под серозной оболочкой находили кровянистые инфильтраты. В головном мозге у 9 телят обнаружили очаговый негнойный менингит с латеральных сторон основания мозжечка. Из 105 случаев заболевания молодняка крупного рогатого скота 10-30-дневного возраста пали 62 и вынужденно убиты 23 теленка, 20 телят тяжело переболели, подвергнуты интенсивной терапии и остались живы. При этом у них также фиксировали отставание в

росте и развитии. Основные патологоанатомические признаки при анаэробной энтеротоксемии телят представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Характерные патологоанатомические признаки при анаэробной энтеротоксемии у телят 10-30-дневного возраста

Патологоанатомические признаки	Абсолютное значение, гол.	Относительная значимость, %
Трупное окоченение выражено слабо	73	85,9
Выделение крови из анального отверстия	58	68,2
Серозно-геморрагические инфильтраты в подкожной клетчатке	79	92,9
Гиперемия и отёк мезентериальных лимфоузлов	62	72,9
Анемия и тём лёгких	66	77,6
Сердечная мышца дряблая, бледно-розового цвета	55	64,7
Печень – гнилостного цвета, дряблая	49	57,6
Почки – размягчены, граница между корковым и мозговым слоями размыта	45	52,9
Слизистые оболочки сычуга, тонкого и толстого отделов кишечника геморрагически воспалены	84	98,8
Мочевой пузырь переполнен мочой, под серозной оболочкой – кровянистые инфильтраты	34	40
Скопление кровянистой жидкости в брюшной и грудной полостях	57	67,0
Всего пало телят (гол.)	85	

В данной таблице мы наблюдаем, что доминирующими патоморфологическими признаками были геморрагическое воспаление слизистой тонкого и толстого кишечника (84 случаев) и серозно-геморрагические инфильтраты в подкожной клетчатке (79 случаев), наряду с уже отмеченными изменениями в печени, почках, селезенке.

Анаэробную энтеротоксемию у молодняка крупного рогатого скота в возрасте от 1 до 12 месяцев выявили в 77 случаях. В основном, заболевание отмечалось у хорошо упитанных животных. Болезнь проявлялась коликами, диареей, оглухом, а также – мышечной дрожью. В области подгрудка, шеи, живота, спины, конечностей у больных присутствовали мягкие, крепитирующие, с повышенной местной температурой инфильтраты в подкожной клетчатке. Заболевание характеризовалось учащением пульса до $119,0 \pm 2,1$ уд./мин. и дыхания до

57,6±1,4 д.д./мин., повышением температуры тела до 40,6±0,4 °С, с её интервальным снижением через 4 ч.: лихорадка – перемежающего типа. Животные были малоподвижные, вялые, отказывались от корма. В 36 случаях регистрировали парезы и параличи. Всего из исследованных 77 случаев заболевания у молодняка данной возрастной группы регистрировали 47 случаев падежа. Вынужденно убили 24 животных, у 6 животных симптомы заболевания через 11 дней стали постепенно затухать и молодняк выздоравливал. Основные клинические признаки при заболевании указаны в таблице 8.

Таблица 8 – Характерные клинические признаки при анаэробной энтеротоксемии молодняка крупного рогатого скота от 1 до 12-месячного возраста

Симптомы	Абсолютное значение, гол.	Относительная значимость, %
Нарушение координации движения	30	38,9
Парезы или параличи	36	46,7
Диарея с примесью крови	66	85,7
Подкожные инфильтраты	63	81,8
Анемия	12	15,6
Профузный понос	16	20,8
Одышка	11	14,3
Слюнотечение	13	16,9
Колики	61	79,2
Мышечная дрожь	59	76,6
Абдоминальные судороги	16	20,8
Всего случаев заболевания анаэробной энтеротоксемии (гол.)	77	

Отмечали характерные патоморфологические изменения. Трупное окоченение было кратковременное (в течение 4-6 часов) у 67 животных. Трупы вздуты, быстро разлагались. Из анального отверстия выделялась кровь в 59 случаях. При вскрытии павших и вынужденно убитых животных обнаруживали геморрагическое воспаление слизистой оболочки кишечника с изъязвлениями, стенки толстой кишки истончены (см. рисунок 8).

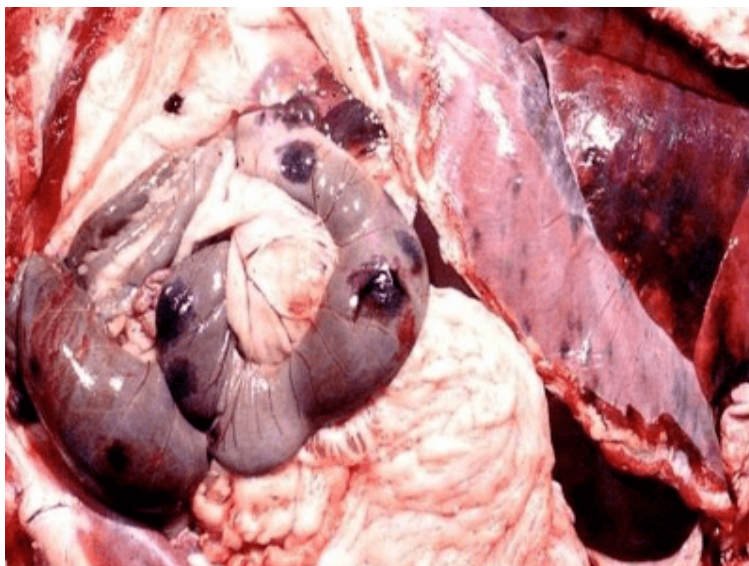


Рисунок 8 – Геморрагическое воспаление кишечника с изъязвлениями у теленка 50-дневного возраста

Также отмечали размягчение почек, зернистую дистрофию печени. Патологоанатомические изменения со степенью значимости при анаэробной энтеротоксемии молодняка крупного рогатого скота 1-12-месячного возраста представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Патологоанатомические признаки для молодняка крупного рогатого скота 1-12 месяцев

Патологоанатомические признаки	Абсолютное значение, гол.	Относительная значимость, %
Трупное окоченение выражено слабо	67	94,4
Выделение крови из анального отверстия	59	83,1
Серозно-геморрагические инфильтраты в подкожной клетчатке	65	91,5
Гиперемия и отёк мезентериальных лимфоузлов	35	49,3
Анемия и отёк лёгких	19	26,8
Сердечная мышца дряблая, бледно-розового цвета	21	29,6
Печень – гнилостного цвета, дряблая	44	62,0
Почки – размягчены, граница между корковым и мозговым слоями размыта	65	91,5
Слизистые оболочки сычуга, тонкого и толстого отделов кишечника геморрагически воспалены	62	87,3

Таблица 9 продолжение

Мочевой пузырь переполнен мочой, под серозной оболочкой – кровянистые инфильтраты	11	15,5
Скопление кровянистой жидкости в брюшной и грудной полостях	36	50,7
Всего пало (гол.)	71	

Из таблицы 9 видно, что для молодняка старшего возраста преобладают характерные патологоанатомические признаки: слабое трупное окоченение, признаки геморрагического поражения кишечного канала и подкожной клетчатки, размягченные почки, дряблая печень гнилостного цвета (зелёно-коричневая).

Характерными клиническими признаками для молодняка крупного рогатого скота в возрасте от 1 до 1,5 года, при заболевании анаэробной энтеротоксемией были – геморрагическая диарея, анемия, инфильтраты в подкожной клетчатке.

У молодняка крупного рогатого скота старшего возраста признаки были менее специфичны.

Патологоанатомические изменения у молодняка крупного рогатого скота в возрасте от 1 до 1,5 года: трупное окоченение выражено слабо, видимые слизистые оболочки анемичные. В подкожной клетчатке – серозно-геморрагические инфильтраты. Лимфатические узлы – гиперемированы и отечны. Слизистые оболочки сычуга, тонкого и толстого отделов кишечника геморрагически воспалены. Легкие – анемичные, отечные. Сердечная мышца дряблая, бледно-розового цвета. Печень – гнилостного цвета, дряблая. Мочевой пузырь переполнен мочой, под серозной оболочкой – кровянистые инфильтраты.

Наряду с молодняком крупного рогатого скота в условно благополучных хозяйствах встречали случаи анаэробных инфекций у коров.

Материал для бактериологического исследования был получен от 54 голов старшего молодняка, нетелей и коров. У животных отмечали диарею, ис-

тощение, анемию слизистых оболочек, подкожные инфильтраты в области груди, спины, живота, конечностей, что свойственно клостридиум-инфекции.

При этом следует отметить, что температура тела – $37,5 \pm 1,5$ °C, пульс $50 \pm 2,4$ уд/мин. и дыхание $25 \pm 6,0$ д.д./мин у коров были в пределах физиологических норм. В отдельном случае наблюдали аборт, абортированный плод подвергли бактериологическому исследованию, культуры *C. perfringens* не выявили.

При патологоанатомическом вскрытии трупов (21 павших и вынужденно убитых животных) обнаруживали в брюшной и грудной полостях серозно-фибринозный экссудат с примесью крови. Сердечная мышца – дряблая, на эпикарде, эндокарде и эндотелии аорты выявлены точечные кровоизлияния (петехии). В сосочковом мускуле и клапане левого желудочка также находили точечные кровоизлияния. В 13 случаях отмечали геморрагическое воспаление слизистой тонкого отдела кишечника. Петехии отмечали и на поверхностях паренхиматозных органов: печени, почек, селезенки. Легкие были отечны, увеличены, темно-вишневого цвета. Бронхи и трахея у павших заполнены пенистой кровянистой жидкостью. У 8 животных отмечали ограниченные, покрытые капсулой, участки ткани темно-красного или вишневого цвета, с тестообразной консистенцией, на задних конечностях в области крупа, которые при пальпации являлись твердыми уплотнениями размером от 7 до 15 см в диаметре. Печень – увеличена, капсула легко снимается. Почки – темно-вишневого цвета, под капсулой видны точечные кровоизлияния. Мочевой пузырь переполнен темно-красной мочой, на слизистой видны точечные кровоизлияния. Всего из 54 случаев заболевания у коров регистрировали 7 случаев падежа. Вынужденно убили 14 животных, у 33 животных на фоне антибиотикотерапии и дополнительной патогенетической терапии симптомы заболевания стали постепенно затухать, и коровы через 20 дней выздоровели.

Изучение случаев болезни показало, что заболеваемость взрослых животных ниже, чем заболеваемость у телят. Взрослое поголовье крупного рогатого

скота проявляло большую устойчивость к анаэробной энтеротоксемии. Болезнь у коров протекала, как правило, в подострой форме, а у молодняка – в сверхострой и острой. Специфичность патоморфологических изменений у старшего молодняка и взрослых коров была менее выражена.

От выявленных животных с характерными признаками отбирали пробы: от павших и вынужденно убитых животных – кусочки паренхиматозных органов (печень, почки, селезенка), сердце (кровь, кусочки миокарда), участки тонкого отдела кишечника с содержимым, от живых животных – фекалии. Материал использовали для проведения бактериологических исследований и выделения возбудителя заболевания.

2.2.3 Характеристика культуральных, морфологических и биологических свойств выделенных изолятов *Clostridium perfringens*

Доставленные в лабораторию образцы первоначально исследовали микроскопически в мазках-отпечатках, окрашенных по Граму, и при наличии крупных грамположительных палочек проводили посевы на питательные среды. Для выделения клостридий материал высевали на жидкие питательные среды Китта-Тароцци, агары Цейслера и Шедлера с добавлением 10 % крови барана и 0,5 % глюкозы, а также МПА, МПБ и Сабуро для выявления посторонних микроорганизмов. Посевы на плотных средах инкубировали в анаэроостате при температуре $+37\pm0,5$ °C в течение 24-48 часов, а для создания анаэробных условий использовали газогенераторные пакеты.

Полученные колонии при культивировании в анаэроостате пересеивали на среду Китта-Тароцци для накопления микроорганизмов, а также на кровяной агар с 0,5 % глюкозы и 10 % крови барана для получения чистых культур и на МПБ и МПА для контроля чистоты роста.

Полученные колонии пересеивали в среду Китта-Тароцци для накопления микроорганизмов, а также в кровяной агар с 0,5 % глюкозой и 10 % крови ба-

рана для получения чистых культур, а также в МПБ и МПА для контроля чистоты роста.

Полученные культуры относили к роду *Clostridium*, если они росли на средах Китта-Тароцци и на кровяном агаре в анаэробном состоянии при отсутствии роста на МПАи МПБ.

Рост клостридий на питательных средах характеризовался обильным газообразованием, помутнением в начальной стадии роста с последующим прояснением среды и образованием осадка на дне пробирки в среде Китта-Тароцци (рис. 9). На кровяном агаре культуры *Clostridium* образовывали крупные, гладкие, выпуклые колонии с ровными краями, окруженные зонами β -гемолиза, что является отличительной особенностью для *C. perfringens* (рис.10).



Рисунок 9 – Обильный рост *Clostridium* на среде Китта-Тароцци из печени теленка



Рисунок 10 – Колонии окружены светлыми зонами β -гемолиза, характерными для *Clostridium*

При микроскопии мазков обнаруживали грамположительные палочки с закругленными концами, прямые, крупные и широкие размером $0,9 - 1,3 \times 4,0 - 8,0$ мкм (рис. 11). В мазках бактерии располагались группами параллельно друг другу, одиночно, редко цепочкой.

Диагностическим признаком являлась неподвижность клеток, устанавливаемая методом «висячая капля». У выделенных микроорганизмов регистрировали споры овальные, центральные или субтерминальные.



Рисунок 11 – Морфология бактерий *Clostridium perfringens* со спорами (увеличение окуляр 10 объектив 100)

Проведённые бактериологические исследования 371 пробы полученных нами от больных животных из хозяйств, павших и вынужденно убитых, 463 проб патологического материала, доставленного в лабораторию из хозяйств Московской, Нижегородской, Кировской, Саратовской, Тверской, Челябинской, Курской, Нижегородской областей, республики Мордовия, позволили выделить 234 изолята с морфологическими, культуральными и тинкториальными свойствами, характерными для семейства *Clostridiaceae*.

Для идентификации возбудителя характерные для клостридий колонии пересекали в 2 пробирки на скошенный кровяной агар с последующим термостатированием. Одна из пробирок культивировалась в аэробных (контроль) условиях, а другая – в анаэробных. Через 24-48 часов, при наличии роста микрофлоры на агаре, культивируемом в анаэроостате, и отсутствии роста в контроле, из культуры готовили мазки и окрашивали по Граму. При последующей

микроскопии регистрировали палочки с морфологией, характерной для клостридий, не контаминированные посторонней микрофлорой.

Выделенные клостридиозные микроорганизмы идентифицировали, используя ферментативный метод с использованием набора «RapID ANA II». Исследуемую суспензию культуры микроорганизма с концентрацией 3 единицы по MacFarland вводили в плашку, содержащую 18 тестов, инкубировали при температуре $+ 37,0 \pm 1,0$ °C в течение 6 часов, после чего в определенные лунки вводили реагенты «RapID ANA II Reagent» и «RapID Stop Indole». Результаты учитывали после 2-5 минут на основании программного обеспечения.

При изучении биохимических свойств выявленных изолятов *C. perfringens* установили их способность к ферментации глюкозы, лактозы, сахарозы с образованием кислоты и газа, а также отсутствие способности к ферментации маннита и дульцита.

Для идентификации типов токсинов *C. perfringens* использовали реакцию нейтрализации с использованием антитоксических сывороток *Clostridium perfringens* типов А, С и D производства ФКП «Курская биофабрика-фирма «БИОК». Результаты реакции нейтрализации учитывали при гибели контрольных белых мышей. Животные, получившие смесь токсина и гомологичной сыворотки, остались живы.

Результаты идентификации представлены в таблице 10.

Таблица 10 – Видовая принадлежность изолятов клостридий

Исследуемые животные	<i>C. perfringens</i>			<i>C. septicum</i>	<i>C. sordellii</i>	<i>C. novyi</i>
	тип А	тип С	тип D			
телята до 10-дневного возраста	53	8	-	-	-	10
телята от 10 до 30-дневного возраста	10	33	8	-	-	5
молодняк от 1 до 12 месяцев	8	19	7	9	-	8
Коровы	3	5	9	19	13	7
Всего	74	65	24	28	13	30

Анализируя результаты бактериологических исследований, представленным в таблице 10, очевидно обращает на себя внимание наибольший удельный вес среди выделенных анаэробных микроорганизмов *C. perfringens* – от молодняка, *C. septicum* – от коров. Причём, основываясь на достаточном количестве проб, можно отметить доминирование в этиологической структуре у неонатальных телят *C. perfringens* типа А.

Определение патогенности 234 изолятов клостридий проводили на морских свинках и кроликах. На каждый изолят использовали по 2 животных. Исследуемые культуры вводили внутримышечно в дозе 0,5 см³ морским свинкам и 1,0 см³ кроликам. Учёт результатов проводили по времени гибели животных. Наблюдение ввели в течение 3 суток. Результаты патогенности изолятов указаны в таблице 11.

Таблица 11 – Патогенность выделенных изолятов клостридий

Изоляты	Всего изолятов	Патогенные	Слабо патогенные	Не патогенные
<i>C. perfringens</i> mun A	74	48	10	16
<i>C. perfringens</i> mun C	65	45	8	12
<i>C. perfringens</i> mun D	24	11	4	9
<i>C. septicum</i>	28	3	8	17
<i>C. sordellii</i>	13	2	4	7
<i>C. novyi</i>	30	1	9	20

- патогенные – пали кролики и морские свинки, в течение 16-24 ч.;
- слабо патогенные – пал один кролик и/или одна морская свинка, в течение 72 ч.;
- не патогенные – все животные живы в течение 72 ч.

На основании данных из таблицы 11, видно, что из 234 выделенных изолятов 110 являлись патогенными для морских свинок и кроликов. Наиболее патогенными были изоляты *C. perfringens* типов С и А, несколько меньше *C. perfringens* типа D, а также изоляты *C. septicum* и *C. sordellii*.

Следующим этапом наших исследований было определение токсигенных свойств выделенных 110 культур клостридий. При определении токсигенности клостридий использовали патогенные популяции микроорганизмов, культивированных в течение 8-16 ч. на МППБ с добавлением 0,5 % от общего объёма глюкозы к среде. Токсинсодержащую культуральную жидкость центрифугировали при 3000 об./мин., полученный супернатант затем фильтровали через стерилизующие фильтры. Полученный фильтрат вводили белым мышам внутривенно по 0,5 см³. На каждый исследуемый изолят использовали по 2 мыши. Токсигенными признавались изоляты, которые вызывали гибель двух лабораторных животных в течение 24 часов. Результаты исследований представлены в таблице 12.

Таблица 12 – Токсигенные свойства изолятов клостридий

Изоляты	Всего изолятов	Количество белых мышей: пали/выжили (голов)		
		2/0	1/1	0/2
		Количество изолятов		
<i>C. perfringens</i> тип А	48	36	9	3
<i>C. perfringens</i> тип С	45	38	5	2
<i>C. perfringens</i> тип D	11	5	3	3
<i>C. septicum</i>	3	1	0	2
<i>C. sordellii</i>	2	0	1	1
<i>C. novyi</i>	1	0	1	0

На основании данных, приведённых в таблице 12, установлено, что токсигенными свойствами обладали 80 изолятов анаэробов. Наиболее токсигенными для лабораторных животных были изоляты *C. perfringens* типа С и *C. perfringens* типа А, несколько меньше – *C. perfringens* типа D.

Проведенные исследования позволили отобрать для дальнейшей работы 79 наиболее патогенных и токсигенных штаммов *C. perfringens* типов А, С и D.

2.2.4 Антибиотикорезистентность патогенных штаммов *C. perfringens*

Антибиотикорезистентность изучали к некоторым наиболее патогенным и токсигенным штаммам. Суточные культуры *C. perfringens* тестировали на чувствительность к 16 антибактериальным препаратам групп: макролиды, аминокликозиды, фторхинолы, цефалоспорины, пенициллины (в том числе усиленные) и тетрациклины.

Результаты исследований представлены в таблице 13.

Таблица 13 – Антибиотикорезистентность вирулентных *Clostridium perfringens*

Препарат	N	B	C	H	Y
1	2	3	4	5	6
азитромицин	41	0	0	4	37
амоксиклав	40	9	11	9	11
ампициллин	41	16	7	10	8
гентамицин	39	12	5	11	11
доксидиклин	39	0	0	10	29
кобактан	40	0	7	6	27
тетрациклин	38	16	11	5	6
левомицетин	40	2	4	7	27
неомицин	41	5	9	7	20
цефазолин	41	0	3	7	31
цефалексин	38	1	7	11	19
ципрофлоксацин	39	3	8	9	19
энрофлоксацин	41	6	4	11	20
эритромицин	38	2	4	7	25
энроксил	40	0	0	13	27
	39	1	9	16	13

Условные обозначения: N – число исследованных изолятов, B – высокочувствителен, C – среднечувствителен, H – низкочувствителен, Y – устойчив к антибиотику

Из таблицы 13 видно, что высокое антибактериальное действие на культуры *C. perfringens* оказали препараты: кобактан (4-ое поколение цефалоспоринов) – 71,1 % чувствительных изолятов, амоксиклав (пенициллиновая группа, усиленная клавулоновой кислотой) – 56,1 %. Пенициллиновые β-лактамы проявили уровень чувствительности 43,6-50 %. К остальным антибиотикам культуры преимущественно проявляли резистентность либо низкую чувствительность. Множественную антибиотикорезистентность (к 3 и более группам) регистрировали у всех тестируемых патогенных штаммов.

2.2.5 Обоснование разработки поливалентного анатоксина против анаэробной энтеротоксемии телят

В настоящее время для специфической профилактики анаэробной энтеротоксемии крупного рогатого скота предложен широкий спектр препаратов зарубежного и отечественного производства.

Данные вакцины предназначены для иммунизации против клостридиозов животных с 1,5-месячного возраста. Практически, все из них – ассоциированные вакцины на основе 5 и более антигенов.

Несмотря на объективно обоснованный тренд применения ассоциированных вакцин в животноводстве, клинико-эпизоотические особенности анаэробной энтеротоксемии у молодняка требуют отдельного подхода в специфической профилактике этой болезни, особенно в условно благополучных и/или неблагополучных хозяйствах. Вспышкам болезни сопутствуют следующие факторы: стационарность анаэробной энтеротоксемии, сверхострое или острое течение, неэффективность лечебных мероприятий. Отсутствие специализированных вакцин для молодняка, требующего ввиду своих иммунофизиологических особенностей ограниченной антигенной нагрузки, что нивелировало бы реактогенные реакции и повысило бы иммуногенные свойства, сохранность и благополучие хозяйства, обосновывает необходимость в мононозологическом препарате, активном в отношении эпизоотически актуальных вариантов возбудителя.

Ассоциированные вакцинации не дают высокого протективного эффекта против анаэробной энтеротоксемии телятам в период снижения титра колостральных антител, приходящийся на раннемолочный возрастной период молодняка крупного рогатого скота, так как, обладая широким антигенным составом, не концентрируют защитный эффект по антигенам данного возбудителя, а также не содержат в своём составе антитела *C. perfringens* серотипа А, эпизоотически значимого для неонатальных и постнатальных телят.

Поэтому в хозяйствах, неблагополучных по анаэробной энтеротоксемии, целесообразно использовать вакцины против конкретных видов актуальных возбудителей, в частности, *C. perfringens* типов А, С и D, с целью создания колострального иммунитета у новорожденных телят и активного иммунитета у молодняка 20-60-дневного возраста. В настоящее время такие препараты отсутствуют, хотя их применение в стационарных неблагополучных и условно благополучных хозяйствах востребовано.

2.2.6 Подбор штаммов для изготовления поливалентного анатоксина *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят

Основной задачей для разработки анатоксина является подбор штаммов микроорганизмов. Штаммы должны обладать высокими токсигенными свойствами, стабильностью образования токсинов в высоком титре при культивировании на различных питательных средах, а также способностью штаммов вызывать антитоксическую активность у экспериментальных животных.

В результате проведенных исследований выделены и идентифицированы 14 культур *C. perfringens* типов А – 7, С – 4, и D – 3 изолятов, которые были наиболее патогенные и токсигенные. Нами были проведены сравнительные исследования антитоксических свойств выделенных новых изолятов с целью подбора производственных штаммов-кандидатов. Для получения анатоксина были изучены как выделенные культуры *C. perfringens*, так и культуры производственных штаммов, ранее использовавшихся в производстве биологических препаратов: *Clostridium perfringens* типа А – № 28, *C. perfringens* типа С – № 3 и *C. perfringens* типа D – № 91. Производственные штаммы проверяли по морфологическим, тинкториальным, культуральным, ферментативным, патогенным, токсигенным и иммуногенным свойствам, контролировали чистоту роста на питательных средах (МПА, МПБ, жидкое и агар Сабура, МППБ под вазелиновым маслом).

Моно-антигены получали из отобранных штаммов в мясо-казеиновой среде с добавлением 40 % раствора глюкозы. *C. perfringens* типа А инкубировали в течение 4-6 часов, типа С – в течение 8-12 часов, а *C. perfringens* типа D – в течение 16-18 часов при температуре $+ 37,0 \pm 1,0$ °С. После прекращения роста и достижения максимально возможного накопления бактериальной массы возбудителя в лабораторных условиях, отбирали пробы для проверки степени токсичности культуры. Для этого исследуемые культуры разводили 0,9 % раствором хлорида натрия в следующих пропорциях 1:10, 1:50, 1:100, 1:200 и так далее вплоть до предполагаемого титра токсина. Каждую из полученных суспензий вводили двум белым мышам внутривенно по 0,5 см³. За животными наблюдали в течение 24 часов. Токсичность культур являлось то максимальное разведение, от которого белые мыши погибали при заражении. Результаты выражали в Dlm/см³; степень токсичности культур приведена в таблице 14.

Таблица 14 – Токсичность культур *Clostridium perfringens* на белых мышах

№	Наименование штамма и его номер	Токсичность штамма Dlm/см ³
Новые штаммы		
1	<i>C. perfringens</i> тип А № 2/3	50
2	<i>C. perfringens</i> тип А № 11	5
3	<i>C. perfringens</i> тип А № 18-А	10
4	<i>C. perfringens</i> тип А № 22	25
5	<i>C. perfringens</i> тип А № 33	5
6	<i>C. perfringens</i> тип А № 37	10
7	<i>C. perfringens</i> тип А № 45	25
8	<i>C. perfringens</i> тип С № 5	500
9	<i>C. perfringens</i> тип С № 12	1500
10	<i>C. perfringens</i> тип С № 14	3000
11	<i>C. perfringens</i> тип С № ВГ	2000
12	<i>C. perfringens</i> тип D № 4-У	1500

Таблица 14 продолжение

13	<i>C. perfringens</i> тип D № 6	200
14	<i>C. perfringens</i> тип D № 9	500
Производственные штаммы		
15	<i>C. perfringens</i> тип A № 28	100
16	<i>C. perfringens</i> тип C № 3	6000
17	<i>C. perfringens</i> тип D № 91	2000

Из представленной таблицы 14 видно, что новые изоляты, выделенные нами из патологоанатомического материала, не обладали более высокой токсичностью по сравнению с производственными штаммами. Токсичность, например, производственного штамма *C. perfringens* типа D № 91 составила 2000 Dlm/см³, а у полевых штаммов типа D 500-1500 Dlm/см³, *C. perfringens* типа C № 3 – 6000 Dlm/см³, а у новых штаммов соответственно 500-3000 Dlm/см³, у производственного штамма *C. perfringens* типа A № 28 из коллекции «ВГНКИ» – токсичность 100 Dlm/см³, тогда как наиболее активный новый изолят показал лишь 50 Dlm/см³.

Для проверки иммуногенных свойств штаммы инактивировали дробным добавлением формалина в объеме 0,6 % от общего объема культуральной среды, культивировали при температуре + 37,0±1,0 °С в течение 10-12 суток. Инактивированную культуру центрифугировали для осаждения клеток при 3000 об./мин. в течение 30 минут, осадок был удален. После этого в инактивированную культуру добавляли 3 % стерильный раствор гидрата оксида алюминия в количестве 15-18 % от общего объема, перемешивали и оставляли при температуре + 18-20 °С до полного просветления надосадочной жидкости на 2-5 суток. Затем анатоксины концентрировали путем декантации прозрачной надосадочной жидкости в количестве 75-80 % от общего объема.

Способность каждого анатоксина образовывать специфические антитела к возбудителю проверяли путем иммунизации кроликов с использованием 3

кроликов на моно-антиген. Анатоксины *C. perfringens* типов А, С и D вводили подкожно в дозе 1 см³ (доза соответствовала инактивированным токсинам *C. perfringens* типа А – 100 Dlm/см³, *C. perfringens* типа С – 6000 Dlm/см³ и *C. perfringens* типа D – 2000 Dlm/см³) двукратно с интервалом 21 день. Через 14 суток после повторной инъекции у кроликов брали кровь и получали сыворотку.

В полученную сыворотку добавляли стандартизированные токсины *C. perfringens* типов А, С и D с установленной активностью 20 Dlm/см³ для белых мышей в соотношении 1:1. Смесь токсинов с сывороткой инкубировали в термостате при температуре + 37,0±1,0 °С в течение 45 мин, затем каждую пробу смеси токсин-сыворотка вводили внутривенно по 0,5 см³ десяти белым мышам.

Для контроля активности стандарт-токсинов каждый из них разводили так, чтобы в 1,0 см³ раствора содержалось 2 Dlm/см³. Растворы инкубировали в термостате при температуре + 37,0±1,0 °С в течение 45 минут. Полученные растворы вводили внутривенно 10 белым мышам в дозе 0,5 см³.

Результат иммуногенности учитывался через 72 часа. Реакция нейтрализации считалась положительной, если после введения смеси сыворотки и токсинов выживаемость мышей в эксперименте составляла не менее 80 %, при этом гибли не менее 8 из 10 контрольных белых мышей, которым вводили стандартный токсин.

Результаты экспериментов представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Антитоксическая активность моноанатоксинов

№	Наименование моноанатоксина и его номер	Количество выживших белых мышей/общее количество, гол.	Выживаемость белых мышей, %
1	<i>C. perfringens</i> тип А № 2/3	6/10	60
2	<i>C. perfringens</i> тип А № 11	1/10	10
3	<i>C. perfringens</i> тип А № 18-А	2/10	20

Таблица 15 продолжение

4	<i>C. perfringens</i> тип А № 22	4/10	40
5	<i>C. perfringens</i> тип А № 33	1/10	10
6	<i>C. perfringens</i> тип А № 37	2/10	20
7	<i>C. perfringens</i> тип А № 45	4/10	40
8	Контроль <i>C. perfringens</i> типа А	0/10	0
9	<i>C. perfringens</i> тип С № 5	1/10	10
10	<i>C. perfringens</i> тип С № 12	3/10	30
11	<i>C. perfringens</i> тип С № 14	6/10	60
12	<i>C. perfringens</i> тип С № ВГ	5/10	50
13	Контроль <i>C. perfringens</i> типа С	0/10	0
14	<i>C. perfringens</i> тип D № 4-У	7/10	70
15	<i>C. perfringens</i> тип D № 6	2/10	20
16	<i>C. perfringens</i> тип D № ЭМ1	4/10	40
17	<i>C. perfringens</i> тип D № 9	2/10	20
18	Контроль <i>C. perfringens</i> типа D	0/10	0
Производственные штаммы			
19	<i>C. perfringens</i> тип А № 28	10/10	100
20	<i>C. perfringens</i> тип С № 3	10/10	100
21	<i>C. perfringens</i> тип D № 91	10/10	100

Из представленных данных таблицы 15, видим, что сыворотка крови от иммунизированных кроликов моноанатоксинами *C. perfringens* типов А, С и D, изготовленных из производственных штаммов, проявила 100 % нейтрализующую активность при заражении белых мышей смертельными дозами гомологичных токсинов, тогда как в группах иммунизированных моноантитоксинами, произведенными из новых штаммов, нейтрализующая активность составила 40-70 % (выживаемости белых мышей).

Анализируя результаты проведенных исследований, необходимо отметить более высокую иммуногенность у производственных штаммов коллекции ФГБУ «ВГНКИ» в сравнении с нами полученными штаммами *C. perfringens*.

Таким образом, только выделенные из патологического материала клостридии, были менее активны по своим токсическим и антитоксическим свойствам, чем депонированные коллекционные штаммы. В связи с этим для дальнейшей работы нами были использованы штаммы *C. perfringens* с высокой антитоксической активностью, которые для всех актуальных серотипов возбудителя ранее были использованы штаммами для производства биопрепаратов.

2.2.7 Изготовление лабораторной серии поливалентного анатоксина *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят

Основным этапом нашей работы являлось создание поливалентного анатоксина для защиты телят от анаэробной энтеротоксемии.

Для изготовления препарата использовали производственные штаммы *C. perfringens* типов А – № 28, С – № 3 и D – № 91. Содержимое ампул ресуспендировали средой МППБ, затем культуральную взвесь высевали в пробирки, содержащие 10 мл аналогичной среды. Посевы помещали в термостат при $+37,0 \pm 1,0$ °C на 24 ч. в зависимости от роста культур.

Пересев производственных штаммов *C. perfringens* типов А, С, D осуществляли во флаконы, объемом 100 мл, на мясо-казеиновую среду. Дополнительно высевали культуры на питательные среды МПБ, МПА, жидкую и агар Сабуро, Китта-Тароцци, для исключения контаминации посторонней микрофлорой.

Следующий пересев производили в бутылки с мясо-казеиновой средой по 10 л, объем которой был не менее 3/4 от общего объема бутылки, при pH 7,5-8,0. Расплодку штаммов из флаконов в бутылки проводили из расчета 1:10 культуры второй генерации к питательной среде. Культивирование *C. perfringens* проводили в термостате при $+37 \pm 1,0$ °C в течение: тип А и С – 6 ч., а тип D – 8 часов.

После прекращения культивирования проверяли чистоту роста путем микроскопии мазков, окрашенных по Граму. При наличии культур с типичной морфологией и окраской, отсутствием посторонней микрофлоры, производили глубинный посев в питательную среду в реакторах. Для культивирования и последующей обработки каждой культуры *C. perfringens* типов А, С, D применяли отдельный реактор. Перед высевами культур в реактор, проводили стерилизацию мясо-казеиновой среды в автоклаве при температуре $+ 121,0 \pm 1,0$ °С в течение 40 минут, рН среды 7,6-7,8. После стерилизации среду быстро охлаждали до $+ 50,0 \pm 1,0$ °С путем подачи холодной воды в рубашку реактора и оставляли для равномерного снижения температуры по всему объёму реактора до $+ 40 \pm 1,0$ °С. Перед посевом культур в питательную среду добавляли стерильный 40 % раствор глюкозы из расчета 0,5 % сухого вещества.

Посев суспензии культуры каждого производственного штамма проводили в реакторы через посевную трубку, внося 4 литра активно растущей культуры на каждые 100 литров мясо-казеиновой среды. В реакторе культуру *C. perfringens* типа D растили и накапливали в течение 16-18 часов, *C. perfringens* типа А – 4-6 часов и типа С – в течение 8-12 часов при температуре $+ 37,0 \pm 1,0$ °С.

Рост культур контролировали путем микроскопии проб, которые отбирали с интервалом 1-1,5 ч. в зависимости от выраженности роста штаммов. Концентрацию микробных клеток в культуре определяли с применением нефелометра со стандартами мутности 3 и 4 Ед по МакФарланду.

В процессе роста культуры *C. perfringens* типа D питательную среду подщелачивали два раза 10 % раствором едкого натра. Первый раз – через 6-8 часов и второй раз – через 14-16 часов до получения рН 7,8. За 2 часа до окончания роста добавляли 40 % раствор глюкозы с целью лучшего роста и токсинообразования. По завершении культивирования добавляли стерильный раствор трипсина для активирования образовавшегося протоксина. Трипсин изготавливали по следующей методике: сухой трипсин, активностью не ниже 150-250

ЕД, растворяли в физиологическом растворе при температуре + 30-35 °С в соотношении 1:200. После тщательного перемешивания раствор инкубировали при температуре + 37,0±1,0 °С в течение 2 часов, затем его фильтровали через стерилизующие фильтр-пластины. Фильтрат трипсина добавляли в реактор к культуре *C. perfringens* типа D из расчета 10 л на 100 литров культуральной жидкости. После добавления трипсина культуру вновь перемешивали и выдерживали при температуре + 37,0±1,0 °С в течение 1,5-3 ч с периодическим перемешиванием содержимого реактора через каждые 30 минут. Наблюдали, чтобы рН при активировании был в пределах 8,0.

Полученные свежие культуры микроорганизмов в производственном цикле проверяли на чистоту роста путем посевов на МПА, МПБ, жидкое Сабу-ро, среду Китта-Тароцци и, одновременно, микроскопированием мазков. На контрольных средах МПА, МПБ, жидкое и агар Сабу-ро рост микроорганизмов и грибов отсутствовал, на Китта-Тароцци отмечали типичный рост клостридий. В окрашенных по Граму мазках при микроскопировании обнаруживали палочки, характерные для *C. perfringens*.

Далее определяли степень токсичности культур. Для этого культуры разводили 0,9 % раствором хлорида натрия в соотношениях 1:10, 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 и так далее до предполагаемого титра токсина. Каждую из полученных суспензий вводили двум белым мышам внутривенно по 0,5 см³. За животными наблюдали в течение 24 часов, отмечая наибольшее разведение фильтрата, что вызывало гибель лабораторных животных при клинических проявлениях заболевания. Учёт результатов накопления токсина показал, что токсичность *C. perfringens* типа D четвертой (итоговой) генерации составила 2000 Dlm/см³, типа С – 6000 Dlm/см³ и типа А – 100 Dlm/см³, т.е. идентично исходной.

К культурам *C. perfringens* типа А и С добавляли формалин из расчёта 0,6 % от общего объёма с содержанием 37 % формальдегида, предварительно

установив pH 7,2. Формалин добавляли дробно, разведенным 1:1 изотоническим раствором хлорида натрия.

В полученную активированную трипсином культуральную жидкость с *C. perfringens* типа D добавляли формалин с 37 % формальдегидом: 0,6 % от общего объёма. Формалин добавляли дробно из расчёта: вначале 0,4 % от общего объёма, через 24 часа – 0,2 % от общего объёма. Использовали формалин, разведённый 1:1 физиологическим раствором. Культуру с формалином тщательно перемешивали, устанавливали pH 7,2. В первые 4 дня следили за тем, чтобы pH был на одном уровне. Инактивацию анатоксинов проводили при температуре $+37,0 \pm 1,0$ °C в течение 10-12 суток с ежедневным перемешиванием 3-4 раза.

Инаktivированные культуры центрифугировали при 3000 об./мин. в течение 30 минут. Бактериальную массу утилизировали. При этом надосадочная жидкость содержала не более 5 % микробных клеток от их первоначального количества.

Полученные анатоксины проверяли на стерильность и остаточную токсичность. Остаточную токсичность проверяли путём внутривенного введения в дозе 0,5 см³ двум белым мышам инаktivированной культуральной жидкости в разведении 1:10. Наблюдали за животными 24 часа. При учёте результатов белые мыши оставались живы в течение суток, без изменения клинического статуса, что говорит о том, что инаktivированные культуры – не токсичны для животных. Стерильность проверяли путём посевов на среды: Китта-Тароцци, МПБ, МПА в пробирках, агар Сабуто и жидкое Сабуто. Наблюдение за посевами вели в течение 14 суток. На питательных средах не наблюдалось роста бактериальной и грибковой микрофлоры.

После установления стерильности и отсутствия токсичности инаktivированных культур в реакторы в качестве осадителя и адьюванта добавляли трехпроцентный стерильный раствор гидрата окиси алюминия в количестве 15-18 % по объёму, перемешивали и оставляли при температуре $+18-20$ °C на 2-5 суток до полного просветления надосадочной жидкости.

После просветления анатоксины концентрировали путем декантации прозрачной надосадочной жидкости в количестве 75-80 % от общего объема.

Для составления серии поливалентного анатоксина концентрированные анатоксины *C. perfringens* каждого из типов смешивали в равных соотношениях 1:1:1 в стерильных условиях при помешивании в течение 60 минут с помощью мешалки, после чего устанавливали pH 7,0-7,7.

Экспериментальную серию поливалентного анатоксина *Clostridium perfringens* типов А, С и D проверяли по показателям качества препарата: внешний вид, цвет, стерильность, pH, безвредность, антитоксическая активность. Готовый препарат расфасовывали во флаконы, герметично укупоривали и маркировали с указанием названия: «Поливалентный анатоксин *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят», номера серии, даты изготовления и его объема. Поливалентный анатоксин хранили при $+4,0 \pm 2,0$ °С не более 6 месяцев.

Таким образом, отработанная технология получения экспериментальных серий препарата соответствовала схеме, представленной на рисунке 12.

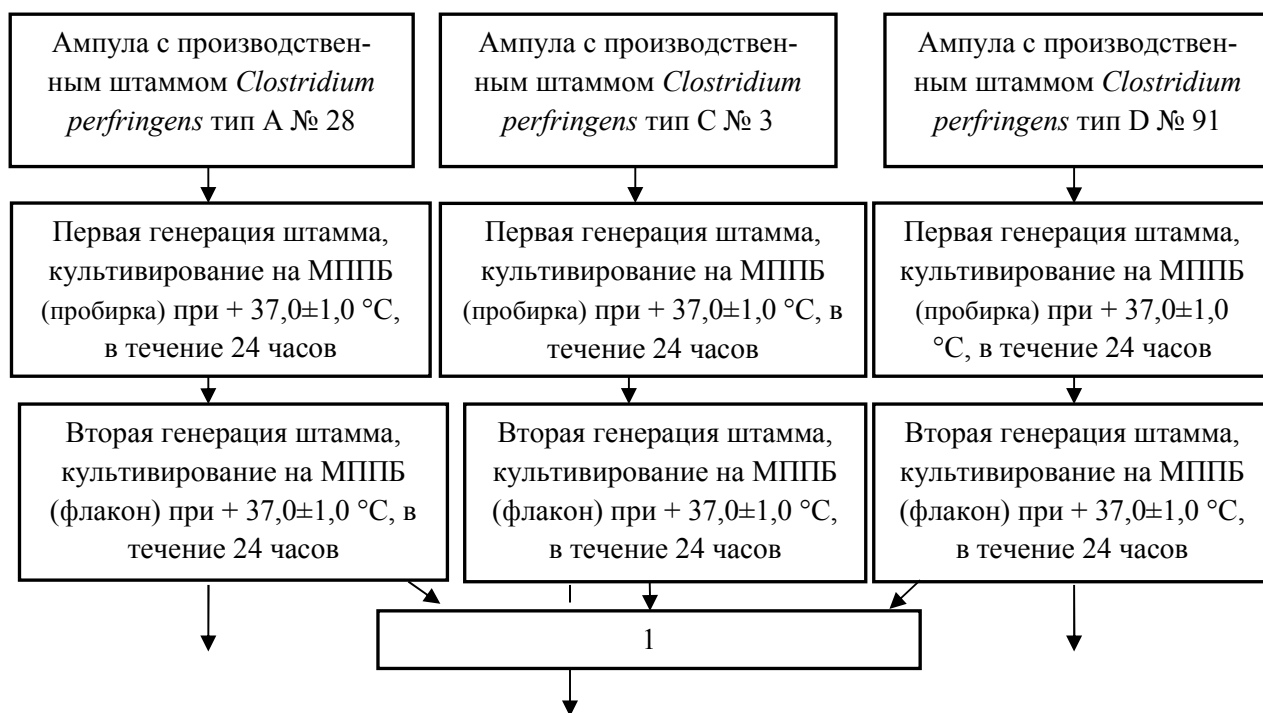


Рисунок 12 продолжение

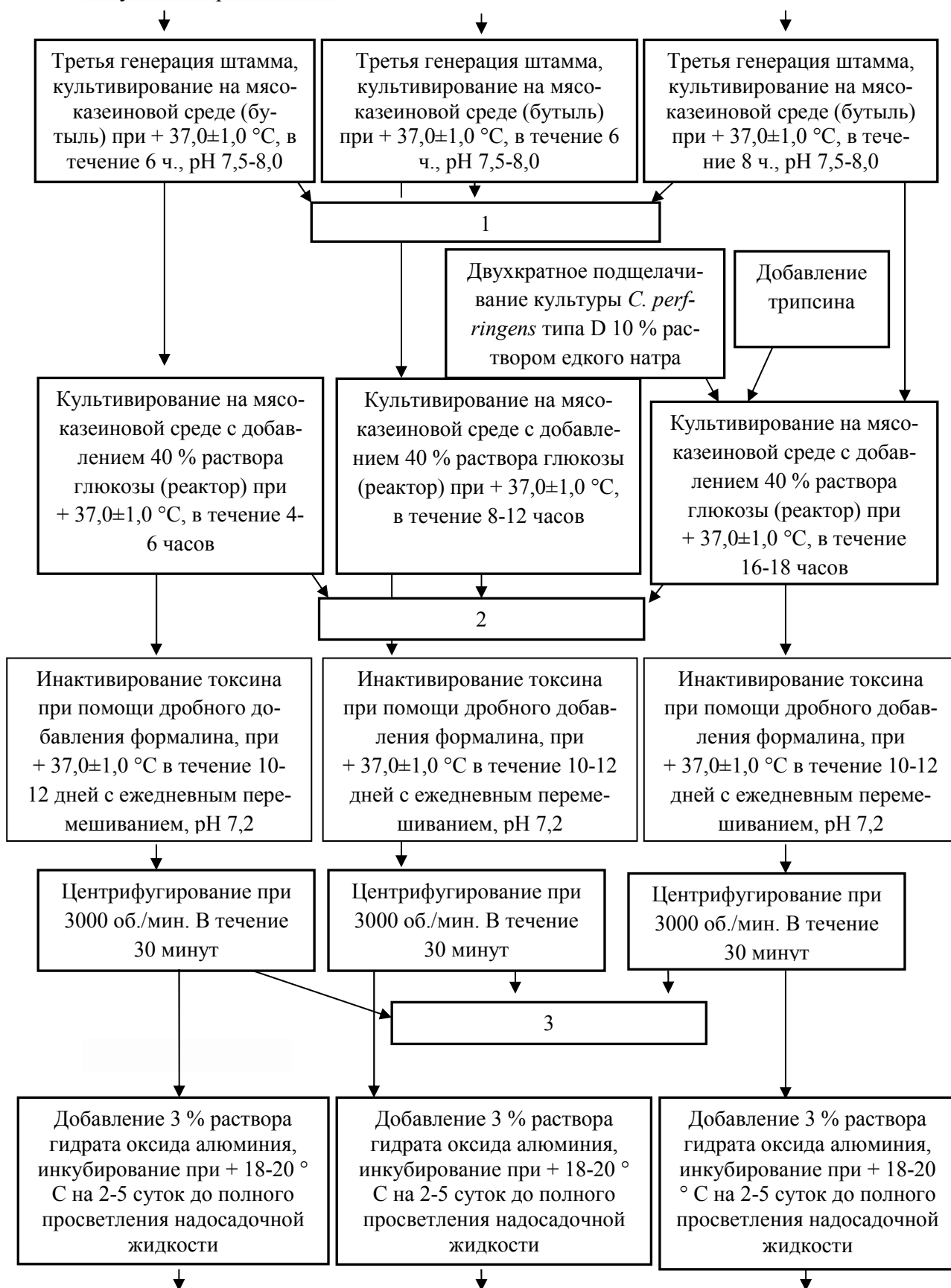
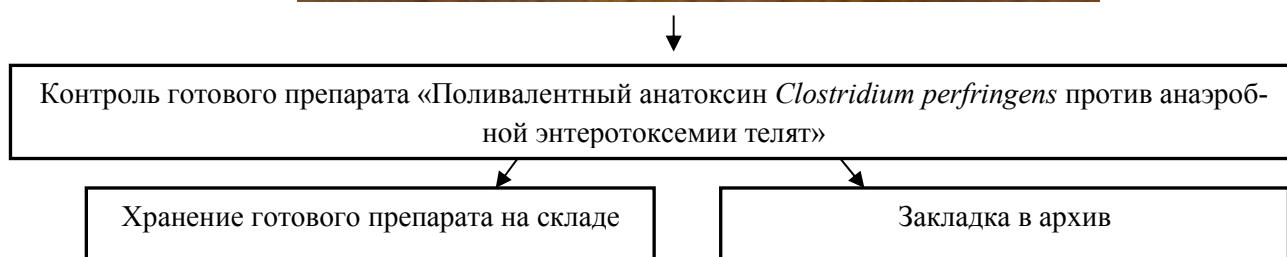
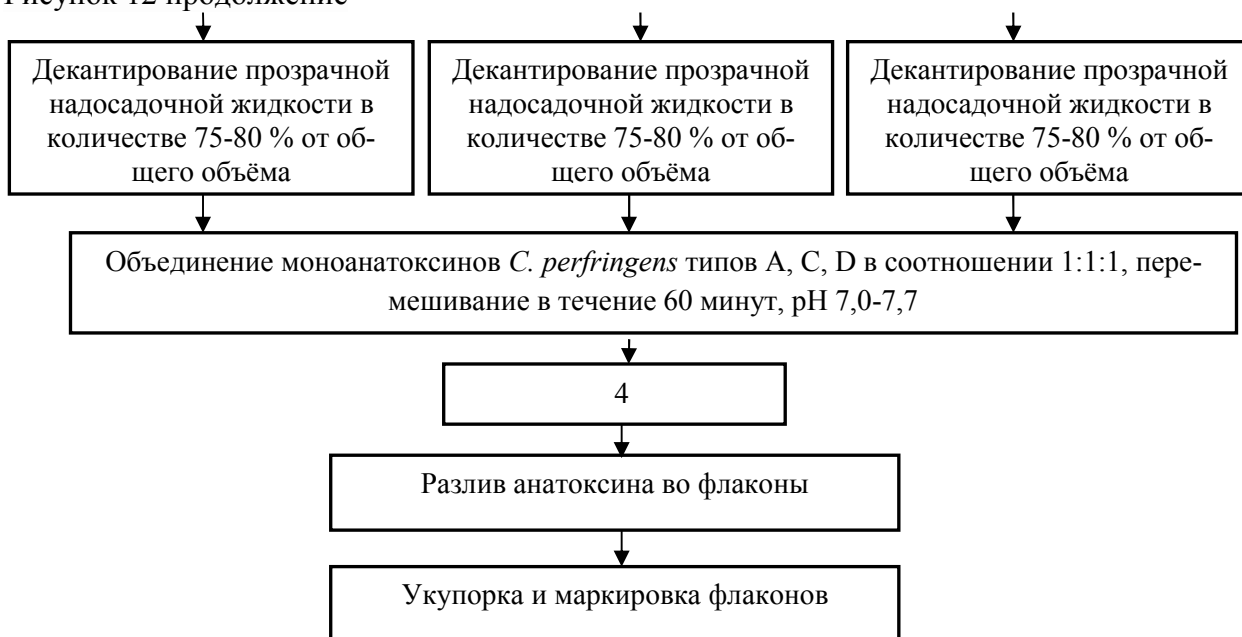


Рисунок 12 продолжение



Примечания: 1 - Контроль чистоты роста культур на питательных средах МПА, МПБ, жидкое и агар Сабуро, Китта-Тароцци, согласно ГОСТ 28085-2013 и микроскопия мазков, окраска по Граму;
2* - Контроль токсичности культур на белых мышах;
3 - Контроль чистоты роста культур на питательных средах МПА, МПБ, жидкое и агар Сабуро, Китта-Тароцци, согласно ГОСТ 28085-2013 и микроскопия мазков, окраска по Граму и остаточную токсичность;
4 - Контроль полуфабриката на стерильность согласно ГОСТ 28085-2013 (питательные среды МПА, МПБ, жидкое и агар Сабуро, Китта-Тароцци), pH, безвредность, антитоксическую активность.

Рисунок 12 – Технологическая схема изготовления поливалентного анатоксина
Clostridium perfringens

2.2.8 Определение оптимальной иммунизирующей дозы на лабораторных животных

Для определения оптимальных прививочных доз анатоксина сформировали 10 подопытных и 1 контрольную группу кроликов породы шиншилла массой $2,5 \pm 0,54$ кг. В каждой группе использовали по 4 кролика.

Животным подопытных групп вводили поливалентный анатоксин *C. perfringens* подкожно, в следующих дозах: первой группе по $0,5 \text{ см}^3$; второй по $1,0 \text{ см}^3$; третьей по $1,5 \text{ см}^3$; четвертой по $2,0 \text{ см}^3$; пятой по $2,5 \text{ см}^3$; шестой по $3,0 \text{ см}^3$; седьмой по $3,5 \text{ см}^3$; восьмой по $4,0 \text{ см}^3$; девятой по $4,5 \text{ см}^3$ и десятой по $5,0 \text{ см}^3$, содержащей в 1 см^3 , как было отмечено, доза соответствовала инактивированным токсинам *C. perfringens* типа А – 100 Dlm, *C. perfringens* типа С – 6000 Dlm и *C. perfringens* типа D – 2000 Dlm.

Кроликов подопытных групп повторно иммунизировали с интервалом 21 день. Интервал между введениями препарата определяли, используя опыт применения аналоговых противоклостридиозных средств и имеющиеся данные о механизмах формирования иммунного ответа у животных. Контролем служили 4 кролика, которым параллельно вводили физиологический раствор. Через 14 суток после второго введения у кроликов всех групп: подопытных и контрольной брали кровь из ушной вены. Сыворотку крови от кроликов использовали для постановки реакции нейтрализации на белых мышах.

В полученную сыворотку добавляли стандартизированные токсины *C. perfringens* типов А, С и D с установленной активностью 20 Dlm/см³ для белых мышей в соотношении 1:1. Смесь токсинов с сывороткой помещали в термостат при + 37,0±1,0 °С на 45 минут, с целью нейтрализации токсинов, затем каждую пробу смеси токсинов/сыворотка вводили внутривенно по 0,5 см³ пяти белым мышам. Для контроля активности токсинов *C. perfringens* их разводили 0,9 % раствором хлорида натрия до активности 2 Dlm в 1,0 см³, инкубировали температуре при + 37±1,0 °С в течение 45 минут и вводили белым мышам, наблюдение за животными вели трое суток, учитывали гибель лабораторных моделей. Оптимальной иммунизирующей дозой анатоксин-вакцины считали ту, которая после введения смеси токсинов с сывороткой от иммунизированных кроликов обеспечивала полную сохранность белых мышей (5 из 5 использованных животных) при гибели не менее 4 из 5 контрольных белых мышей. Результаты реакции нейтрализации приведены в таблице 16.

Таблица 16 – Результаты реакции нейтрализации на белых мышах при определении оптимальной иммунизирующей дозы анатоксина

Группа	Дозы введения анатоксина	Всего используемых белых мышей, гол.	Пали, гол.	Выжили, гол.
Первая подопытная	0,5	5	3	2
Вторая подопытная	1,0	5	2	3
Третья подопытная	1,5	5	1	4
Четвертая подопытная	2,0	5	0	5
Пятая подопытная	2,5	5	0	5
Шестая подопытная	3,0	5	0	5
Седьмая подопытная	3,5	5	0	5
Восьмая подопытная	4,0	5	0	5
Девятая подопытная	4,5	5	0	5
Десятая подопытная	5,0	5	0	5
Контрольная	-	5	5	0

Представленные в таблице 16 данные свидетельствуют, что минимальной протективной дозой для иммунизации кроликов является 2,0 см³ поливалентного анатоксина *C. perfringens*, при которой введение смеси токсинов и сыворотки

обеспечивало сохранность всех 5 белых мышей. В контрольной группе пали все белые мыши в течение одного дня.

2.2.9 Определение оптимальной иммунизирующей дозы анатоксина для телят, стельных коров и нетелей

Опыты проводили в ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское» Сергиев-Посадского района Московской области. Для этого сформировали 10 групп – 9 подопытных и одну контрольную, по 6 голов в каждой, из стельных коров, нетелей, а также 7 групп – 6 подопытных и одну контрольную, по 6 голов, из телят 14-20-дневного возраста. При обследовании все животные, использованные для исследований, были клинически здоровыми.

В подопытных группах коровам и нетелям анатоксин вводили подкожно в заднюю треть шеи двукратно с интервалом в 3 недели так, чтобы вторая доза вакцины вводилась не позднее 3-6 недель до отела (первая иммунизация с 224 по 245 и вторая – с 245 по 266 дней беременности), в первой группе в дозе 2,0 см³; во второй – 3,0 см³; в третьей – 4,0 см³; в четвертой – 5,0 см³; в пятой – 6,0 см³; в шестой – 7,0 см³; в седьмой – 8,0 см³; восьмой – 9,0 см³ и в девятой группе – в дозе 10 см³.

Телят подопытных групп иммунизировали подкожно в заднюю треть шеи двукратно с интервалом 21 день, первой группе анатоксин вводили в дозе 1,0 см³; телятам второй группы – в дозе 2,0 см³; третьей – 3,0 см³; четвертой – 4,0 см³; пятой – 5,0 см³ и в шестой группе – в дозе 6,0 см³.

Животных в контрольных группах не иммунизировали.

После первой и второй иммунизации системных осложнений у животных не выявляли, в том числе и аборт у стельных коров и нетелей. При ежедневном осмотре иммунизированных животных в группах установили, что на месте инъекции образовывался безболезненный отек, который проходил через 3 дня. Других побочных явлений (повышение температуры тела, повышения местной температуры, угнетение, в разных степенях хромота и т.д.) не отмечали.

Через 14 суток после второй иммунизации у животных всех групп: подопытных и контрольной брали кровь из яремной вены и получали сыворотку. Сыворотку крови использовали для постановки реакции нейтрализации на белых мышах по проведённой ранее методике аналогично исследованиям, представленным в п. 3.2.8. Полученные результаты реакции нейтрализации приведены в таблице 17.

Таблица 17 – Результаты реакции нейтрализации при оценке оптимальных иммунизирующих доз для телят и коров, нетелей

Группа	Дозы введения анатоксина	Всего белых мышей, гол.	Пали белые мыши, гол.	Выжили белые мыши, гол.
<i>Коровы и нетели</i>				
Первая подопытная	2	5	3	2
Вторая подопытная	3	5	2	3
Третья подопытная	4	5	1	4
Четвертая подопытная	5	5	0	5
Пятая подопытная	6	5	0	5
Шестая подопытная	7	5	0	5
Седьмая подопытная	8	5	0	5
Восьмая подопытная	9	5	0	5
Девятая подопытная	10	5	0	5
Контрольная	-	5	5	0
<i>Телята</i>				
Первая подопытная	1	5	2	3
Вторая подопытная	2	5	1	4
Третья подопытная	3	5	0	5
Четвертая подопытная	4	5	0	5
Пятая подопытная	5	5	0	5
Шестая подопытная	6	5	0	5
Контрольная	-	5	5	0

Результаты исследований, приведенные в таблице 17, указывают, что оптимальными иммунизирующими дозами являются: для телят – 3,0 см³ поливалентного анатоксина, для стельных коров и нетелей – 5,0 см³ при двукратном подкожном применении. Исследование провели в трехкратной повторяемости, получили аналогичные результаты. Это позволило нам установить порядок применения поливалентного анатоксина *Clostridium perfringens*.

2.2.10 Показатели качества, безвредности и антитоксической активности поливалентного анатоксина *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят

Для всех последующих исследований анатоксина против анаэробной энтеротоксемии телят из полученных образцов экспериментальной серии приготовили смешанную пробу, содержимое трех флаконов с препаратом объединили в отдельном стерильном флаконе в количестве, необходимом для исследования по всем показателям. Всего было изготовлено 3 экспериментальные серии препарата: «Поливалентный анатоксин *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят», исследования повторяли в каждой серии.

Визуально определяли внешний вид, цвет, наличие посторонних примесей, трещин флаконов, качество укупорки. В ходе исследований установили, что анатоксин представляет собой суспензию желто-серого цвета, на дне которой образуется серовато-белый осадок, который при встряхивании легко распадается на гомогенную суспензию. Во флаконах с поливалентным анатоксином отсутствовали посторонние примеси, плесень и трещины, что соответствует требованиям визуального контроля биопрепаратов.

Для определения стерильности препарата смешанные образцы исследовали согласно ГОСТ 28085-2013 «Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения» [26]. Из смешенной пробы с анатоксином проводили посевы на твердые питательные среды: МПА, агар Сабуро, используя по две чашки Петри, и на жидкие питательные среды: МПБ, Сабуро, используя по три пробирки. На среду Китта-Тароцци высевали, используя по два флакона и две пробирки. Флаконы, пробирки и чашки Петри с посевами на всех питательных средах инкубировали при температуре $+ 37,0 \pm 1,0$ °C, кроме посевов на среде Сабуро, которые инкубировали в соответствующем температурном режиме для роста грибов: $+ 22,0 \pm 1,0$ °C.

В результате проведенных исследований было установлено, что поливалентный анатоксин *C. perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят яв-

ляется стерильным препаратом, рост бактериальной и грибковой микрофлоры на питательных средах отсутствовал в течение 14 дней наблюдения.

Безвредность анатоксина определяли по ГОСТ 31926-2013 «Средства лекарственные для ветеринарного применения. Методы определения безвредности» [27], на 5 морских свинок и 10 белых мышах. Препарат вводили подкожно в область спины морским свинкам – в дозе 2,0 см³ и белым мышам – в дозе 0,5 см³. Наблюдали за животными в течение 10 дней. В ходе исследования зафиксировали, что все 5 морских свинок и 10 белых мышей остались живы и клинически здоровы. На месте введения у них было безболезненное уплотнение, которое исчезало на третьи сутки после инъекции. Таким образом, препарат – безвредный для животных, не вызывал постиммунных осложнений. Контроль показал идентичные результаты во всех трех экспериментальных сериях.

Определение антитоксической активности поливалентного анатоксина *C. perfringens* против анаэробной энтеротоксемии проводили на 5 кроликах. Препарат вводили лабораторным объектам подкожно в дозе 2,0 см³, которую мы определяли заранее, и через 21 день вакцинацию повторяли.

На 14-й день после повторного введения препарата у иммунизированных кроликов брали кровь из ушной вены. Полученную сыворотку исследовали в реакции нейтрализации на белых мышах, согласно схеме, описанной ранее.

Полученные нами данные приведены в таблице 18.

Таблица 18 – Результаты антитоксической активности анатоксина в реакции нейтрализации

Группы	Количество мышей	Доза сыворотки от иммунизированного кролика, см ³	Смертельная доза токсина <i>C. perfringens</i>	Результаты исследования	
				Выжило, голов/%	Пало, голов/%
Опытные	10	0,5	Тип А 10 Dlm/см ³	10/100	0
	10	0,5	Тип С 10 Dlm/см ³	10/100	0
	10	0,5	Тип D 10 Dlm/см ³	9/90	1/10

Таблица 18 продолжение

Контроль- ные	10	-	Тип А 1 Dlm/см ³	0	10/100
	10	-	Тип С 1 Dlm/см ³	0	10/100
	10	-	Тип D 1 Dlm/см ³	0	10/100

Анализируя представленные в таблице 18, результаты исследований, видим, что изготовленный поливалентный анатоксин обладает высокой антитоксической активностью. Сыворотка крови от иммунизированных кроликов, предотвращает гибель 90-100 % белых мышей после заражения их десятикратными смертельными дозами токсинов *C. perfringens* типов А, С и D.

Исследования по антитоксической активности, показателям качества и безвредности поливалентного анатоксина *C. perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят провели в трёхкратной повторяемости с новыми экспериментальными сериями препарата. Получили идентичные результаты.

Таким образом, разработанный и сконструированный поливалентный анатоксин *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят – стерильный, безвредный для лабораторных животных, обладает высокой антитоксической активностью, что позволило нам продолжить изучение его протективных свойств на целевых объектах.

2.2.11 Специфическая эффективность поливалентного анатоксина в производственных условиях

После положительных результатов, полученных при доклинических испытаниях анатоксина против анаэробной энтеротоксемии телят в лабораторных условиях и установления иммунизирующих доз для телят, стельных коров и нетелей, исследования были продолжены изучением профилактических свойств лекарственного препарата в производственных условиях.

Производственные испытания проводили в ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское» Сергиев-Посадского района Московской области, МТФ «Озерец-

кое» на крупном рогатом скоте голштинской породы, поголовье фермы 860 голов – коров, молодняка.

Кормление животных осуществлялось сеном, силосом, соломой и концентрированными кормами, по полноценным и сбалансированным рационам.

Коровы и нетели продуктивностью 6000-9000 кг. молока за лактацию, содержались в зимнее время без прогулок, беспривязным способом в группах по 60-120 голов. Новорожденных телят размещали в индивидуальные клетки. Режим очисток и дезинфекций в хозяйстве был нарушен.

В начале сентября 2016 г. у некоторых стельных коров хозяйства отмечали диарею, отказ от корма, угнетенное состояние, подкожные инфильтраты в области груди, спины, живота, конечностей. Спустя месяц в хозяйстве зафиксировали заболеваемость неонатальных телят.

Заболевание новорожденных телят характеризовалось общим угнетением, отказом от корма, вялостью, поносом с примесью крови. Фекалии вначале были жидкими со слизью, желтым, содержали пузырьки газа с неприятным запахом, позже стал коричневым. Инфильтраты в подкожной клетчатке наблюдались в области подчелюстного пространства, шеи, подгрудка, живота, спины и задних конечностей животных. Во время развития заболевания телята не реагировали на окружающие раздражители, лежали с вытянутой шеей. У животных наблюдалась анемия видимых оболочек, судорожные явления перед смертью. Также заболевание характеризовалось гипертермией (повышением температуры тела до 41,5 °С), которая держалась в течение нескольких часов, а затем температура снизилась до 38,4 °С, а частота пульса увеличилась до 158 уд./мин. и частота дыхания 62 ± 2 д.д./мин. Смерть наступила через 2-4 дня после начала заболевания.

Патологоанатомические изменения у павших новорожденных телят характеризовались кровянистыми истечениями из анального отверстия, видимые слизистые оболочки были анемичные. Серозно-геморрагические инфильтраты с пузырьками газа обнаружены в подкожной клетчатке, в области подчелюстного

пространства, шеи, подгрудка, живота, спины и задних конечностей. Инфильтраты находили в сердечной сумке, под серозными оболочками, в окологречечной ткани, брыжееке. Сердечная сумка у павших телят была дряблая, бледно-розового цвета. На эпикарде и эндокарде обнаруживали точечные и полосчатые кровоизлияния, в области трехстворчатого клапана отмечали разлитое кровоизлияние. Печень – увеличена, бледная, гнилостного цвета, паренхима органа характеризовалась как дряблая, желчный пузырь – переполненный желчью, мезентериальные лимфатические узлы – набухшие, отечные, гиперемированные, на разрезе – сочные. Легкие – анемичные и незначительно отечные. Слизистые сычуга и тонкого отдела кишечника были набухшие, гиперемированные, с полосчатыми и точечными кровоизлияниями, покрыты слизью.

Указанные патологоанатомические признаки у разных животных были выражены в различной степени.

За период с октября 2016 г. по апрель 2017 г. на молочно-товарной ферме было получено 416 телят, из них заболело 14 голов, пало 7, вынужденно убили 5 животных и 2 теленка переболели с клиническим выздоровлением, но значительным отставанием в росте. В начале вспышки заболевали, в основном, телята неонатального возрастного периода, а, в дальнейшем, заболеваемость фиксировали у более старшего молодняка.

При возникновении заболевания в хозяйстве применяли лечение антибактериальными препаратами: неомицином, тетрациклином, ампициллином. Применяемые препараты не давали терапевтического эффекта и выздоровление телят не отмечалось.

При микробиологическом исследовании кормов патогенных грибов не было выделено.

Бактериологическими исследованиями на наличие возбудителей клостридиозных инфекций из содержимого кишечника и печени от павших и вынужденно убитых телят выделили *C. perfringens*. Для определения типа токсина в исследуемом материале проводили реакцию нейтрализации с диагностически-

ми сыворотками типов А, С, D. Результаты исследований представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Результаты реакции нейтрализации токсина с диагностическими сыворотками

Исследуемые пробы от заболевших телят	Типы диагностических сывороток		
	<i>C. perfringens</i> тип А	<i>C. perfringens</i> тип С	<i>C. perfringens</i> тип D
1	+	-	-
2	-	+	-
3	-	+	-
4	+	-	-
5	-	+	-
6	+	-	-
7	+	-	-
8	-	+	-
9	+	-	-
10	-	+	-
11	-	-	-
12	+	-	-
13	-	-	-
14	-	-	+

«-» - не нейтрализовался токсин, белые мыши пали;

«+» - нейтрализовался токсин, белые мыши выжили.

Из данных таблицы 19 видно, что выделенный токсин у новорожденных телят нейтрализовался, в основном, антитоксической сывороткой *C. perfringens* типа А – в 6 случаях, типа С – в 5 и типа D – в 1 случае.

Таким образом, на основании анализа эпизоотической ситуации, клинических признаков, патологоанатомических изменений и лабораторных исследований был установлен диагноз – анаэробная энтеротоксемия крупного рогатого скота, вызванная *C. perfringens* типами А, С и D.

После окончательного установления диагноза определяли эффективность «Поливалентного анатоксина *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят» в сравнении с вакциной против клостридиозов крупного рогатого скота «ТОКСИПРА ПЛЮС» в производственных условиях.

Для этого выбрали две подопытные группы. Первая подопытная группа состояла из 70 стельных коров, нетелей, а также полученных от них 70 телят. Животных иммунизировали «Поливалентным анатоксином *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят». Коровам вводили анатоксин подкожно в заднюю треть шеи в дозе 5 см³ двукратно с интервалом в 3 недели так, чтобы вторая доза препарата была введена за 3 недели до отела коров и нетелей. Телят иммунизировали двукратно с 14-16-дневного возраста, с интервалом 21 день в дозе 3 см³.

Вторая подопытная группа состояла из 70 стельных коров, нетелей и полученных от них 68 телят. Животных данной группы вакцинировали вакциной против клостридиозов крупного рогатого скота «ТОКСИПРА ПЛЮС» (Испания, разработана фирмой Лабораториес Хипра С.А.). Коровам вводили вакцину по инструкции подкожно по 4,0 см³ дважды с интервалом 20-25 дней, вторая вакцинация происходила за 3 недели до отела. Телят также иммунизировали дважды с 35-дневного возраста с интервалом 20-25 дней по 2 см³.

Наблюдение вели в течение 1 года. Эффективность специфических препаратов оценивали по инцидентности анаэробной энтеротоксемии в сформированных группах, сохранности в группах. Оценивали переносимость препаратов, наличие осложнений, изменений физиологического статуса, местных реакций на введение у целевых объектов.

В первой подопытной группе после первой и второй иммунизации животных системных осложнений не выявляли, в том числе и аборт стельных коров и нетелей. При ежедневном осмотре иммунизированных животных установили, что на месте инъекции образовывался безболезненный отек, который

проходил через 3-5 дней. Других побочных явлений, таких как, например, повышение температуры тела, угнетение и хромота, не отмечали.

Во второй подопытной группе после первой вакцинации у большинства животных наблюдали на месте введения реакцию, сопровождавшуюся повышением местной температуры тела, болезненным отеком, хромотой (у теленка), данные симптомы полностью исчезали только через 10 дней. После повторной вакцинации местные реакции были более выраженными и также проявлялись отеком в месте инъекции, который через 5 дней переходили в безболезненные уплотнения, рассасывающиеся в течение 20 дней.

От коров первой группы получено 70 телят (для дальнейшего исследования взяли 68, для соответствия группе аналогов), второй – 68 (1 аборт, 1 случай гибели в двухсуточном возрасте, диагноз – диспепсия новорожденных). В течение годового периода наблюдения случаи анаэробной энтеротоксемии фиксировали во второй опытной группе. Диагноз подтверждали лабораторно: выделением *C. perfringens* и постановкой биопробы на белых мышах. Преимущественный возраст заболевших приходился на 14-40 день (4 случая). Болезнь развивалась стремительно, только в 1 случае удалось достигнуть выздоровления при комплексной антибактериальной (амоксиклав) и антитоксической (глюкозосолевые терапевтические инфузии, гамавит). Результаты исследований представлены в таблице 20.

Таблица 20 – Результаты оценки профилактической эффективности «Поливалентного анатоксина *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят» и вакцины против клостридиозов «ТОКСИПРА ПЛЮС»

Группа	Получено телят, голов	Использовано в исследованиях	Сохранность к 12-месячному возрасту, %	Гибель, голов Причины падежа	Заболеваемость анаэробной энтеротоксемией в группе голов/ %	Летальность при анаэробной энтеротоксемии телят, %
I	70	68	98,5	1 – травма	0/ 0	0

Таблица 20 продолжение

II	68	68	89,7	2 – диспепсия; 5 – анаэробная энтеротоксе- мия	6/ 8,8	83,3
----	----	----	------	---	--------	------

Из таблицы 20 видно, что в первой подопытной группе заболеваемость стельных коров и нетелей отсутствовала, а сохранность молодняка составила 98,5 %, 1 теленок погиб от полученной травмы, тогда как во второй подопытной группе, сохранность составила 89,7 %, то есть на 8,8 % ниже, чем в первой группе. Из семи телят пять умерли от анаэробной энтеротоксемии с характерными клинико-морфологическими изменениями: диарея с примесью крови, подкожные инфильтраты, зернистая гепатодистрофия, спленомегалия, анемия и отек легких, кровонаполненность почек с геморрагиями под капсулой. При бактериологическом исследовании патологоанатомического материала, в том числе паренхиматозных органов, выделили изоляты *C. perfringens* серотипов С и А, патогенные для белых мышей.

Таким образом, проведенные исследования показали, что изготовленный «Поливалентный анатоксин *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят» – безвреден в применении, не обладает выраженной реактогенностью для животных, обладает высокой антитоксической активностью и выраженными защитными свойствами, в отличие от аналога, что позволило повысить безопасность целевых объектов в условно благополучном хозяйстве (при эпизоотологическом проявлении анаэробной энтеротоксемии на молочно-товарной ферме).

2.2.12 Сравнительная оценка антигенной активности «Поливалентного анатоксина *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят» и вакцины «Клостбовак-8» на восприимчивых животных

Антигенную активность исследуемых специфических средств оценивали в реакциях нейтрализации токсинов клостридий. В условиях Сергиев-Посадского района Московской области (ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское» на ферме «Озерецкое») было сформировано 3 группы по 10 стельных коров и нетелей разного возраста. Первую подопытную группу иммунизировали «Поливалентным анатоксином *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят», препарат инъектировали подкожно в дозе 5 см³, двукратно с интервалом 21 день, вторую дозу препарата вводили за 3 недели до отёла. Вторую подопытную группу иммунизировали вакциной «Клостбовак-8», которую вводили подкожно в области средней трети шеи двукратно с интервалом 21 день в объеме 3 см³, вторую вакцинацию проводили за 28-30 дней до отела, согласно инструкции по применению вакцины против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентной инактивированной «Клостбовак-8». Третья группа служила контролем, животных не иммунизировали.

За животными: стельными коровами и нетелями полученными от них телятами вели наблюдения в течение 100 и 80 суток соответственно (75 дней телята + 21 день коровы и нетели). У коров и нетелей первой и второй группы после первой, а также после повторной иммунизации не отмечали никаких системных и местных нежелательных реакций на введение препаратов, в том числе анафилаксии и аборт. На месте введения у животных первой и второй группы наблюдались безболезненные отеки размером от 3 до 5 см², которые исчезали в первой группе через 3-5 дней и во второй группе через 7-18 дней после иммунизации соответственно.

Критерием оценки эффективности иммунизации считалось получение здорового молодняка от подопытных коров и нетелей, а также сохранность молодняка. Установлено, что в двух опытных группах от 20 иммунизированных

коров и нетелей получено 20 жизнеспособных телят. Заболевания и гибель новорожденных телят с признаками анаэробной энтеротоксемии не наблюдалось. Контрольная группа также получила 10 телят от 10 коров.

Новорожденных телят первой подопытной группы иммунизировали на 14 день жизни, препарат вводили двукратно с интервалом 3 недели подкожно в объеме 3 см³. Телят второй подопытной группы иммунизировали в 40-дневном возрасте, вакцину вводили двукратно с интервалом 21 суток, подкожно в объеме 3 см³. У новорожденных телят первой и второй опытной группы на второй день жизни, перед первой вакцинацией, а, затем, через 14 дней после повторной вакцинации брали кровь для оценки титров антитоксических антител. Также исследование провели в 75-дневном возрасте. Полученную сыворотку исследовали в реакции антитоксинсвязывания на белых мышах. Сыворотку крови от подопытных телят по группам объединяли и смешивали с раститрованным токсином (предварительно установленной активностью по отношению к стандартным антитоксическим сывороткам, в МЕ). Смесь сыворотка/токсин выдерживали в термостате при температуре + 37,0±1,0 °С в течение 45 минут, затем полученную суспензию вводили внутривенно в дозе 0,2 см³ четырем белым мышам. Полученные результаты учитывали по выживаемости лабораторных животных через 72 часа после введения смеси – сыворотка телят с раститрованными токсинами.

Результаты определения антигенной активности представлены в таблице 21.

Таблица 21 – Титр антитоксических антител в крови иммунизированных телят «Поли-валентным анатоксином *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят» и «Клостбовак-8»

Группа	Сыворотка крови взя-тая у телят в разные периоды	Титр антитоксических антител у животных, МЕ/мл		
		<i>C. perfringens</i> тип А	<i>C. perfringens</i> тип С	<i>C. perfringens</i> тип D
Первая подопытная	Смешанная проба сыво-ротки крови, взятой в двухдневном возрасте	3,0	8,20	4,10
	Смешанная проба сыво-ротки до вакцинации, взятой в 14- дневном возрасте	1,05	3,30	2,20
	Смешанная проба сыво-ротки, взятой на 14 день после второй вакцина-ции (50-дневный воз-раст)	4,40	11,80	11,10
	Смешанная проба сыво-ротки, взятой в 75-дневный возраст	4,10	11,50	10,80
Вторая подопытная	Смешанная проба сыво-ротки крови, взятой в двухдневном возрасте	2,10	7,80	3,20
	Смешанная проба сыво-ротки до вакцинации, взятой в 40-дневном воз-расте	0	0,50	0,50
	Смешанная проба сыво-ротки, взятой на 14 день после второй вакцина-ции (75-дневный воз-раст)	3,50	11,50	10,0
Контроль-ная	Смешанная проба сыво-ротки крови, взятой в двухдневном возрасте	0,02	0,05	0,01
	Смешанная проба сыво-ротки взятой в 14-дневном возрасте	0	0	0
	Смешанная проба сыво-ротки, взятой в 50-дневном возрасте	0	0	0
	Смешанная проба сыво-ротки, взятой в 75-дневный возраст	0	0	0

Из представленной таблицы 21 мы наблюдаем, что иммунизация стельных коров и нетелей способствовала образованию у новорожденных телят колострального иммунитета. Исследования смешанной пробы сыворотки в реакции нейтрализации проявили тенденции образования антитоксических антител и формирования колострального иммунитета у телят. Следует отметить, что нивелирование колостральных антител в значительной степени регистрируется уже к двухнедельному возрасту молодняка. Период восприимчивости с 25 до 60 дней иммунной защитой обеспечивается применением «Поливалентного анатоксина *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят». Четко прослеживается, что двукратная иммунизация специфичным анатоксином способствовала значительному увеличению специфических антител. В среднем показатели титров антител по каждому антигену в первой подопытной группе иммунизированных поливалентным анатоксином телят были на сопоставимых уровнях и выше, чем у телят, вакцинированных «Клостбовак-8».

ГЛАВА 3. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время эпизоотическая ситуация по анаэробной энтеротоксемии с возрождением и развитием скотоводства в нашей стране осложнилась. В последние два десятилетия по сведениям различных авторов и результатам наших исследований увеличилось число случаев перфрингиоза животных, в том числе молодняка крупного рогатого скота, с преобладанием определенных серотипов возбудителя и циркуляцией атипичных штаммов [67, 100, 116, 123, 137, 162].

Это обосновывает задачу совершенствования специфической профилактики анаэробной энтеротоксемии. Многочисленные исследования как в нашей стране, так и за рубежом интегрировали и предложили линейку однородной продукции вакцинопрепаратов комбинированного состава. Коммерческие условия определили развитие средств защиты от заражения и заболевания клостридиозами с широкими антигенными комбинациями и ассоциированных против разных возбудителей инфекционных болезней, протекающих совместно с клостридиозной инфекцией или схожих с ней по клинико-морфологическим проявлениям.

По данным многих отечественных ученых отмечается, что животные, переболевшие анаэробной энтеротоксемией, приобретают иммунитет, напряженность и продолжительность которого зависят от силы и тяжести перенесенного заболевания. Для создания иммунитета у животных, авторы указывают на применение или возможность использования концентрированной поливалентной гидроокисьалюминиевой вакцины против браздота, инфекционной энтеротоксемии, злокачественного отека овец и дизентерии ягнят, содержащей антигены *C. perfringens* типов В, С и D; поливалентного анатоксина против клостридиозов овец на основе анатоксинов *C. perfringens* типов С и D (поскольку возбудители инфекционной анаэробной энтеротоксемии крупного рогатого скота и овец родственные в антигенном отношении, то вышеуказанные биологические

препараты, предназначенные для овец, применяются и для крупного рогатого скота) [68, 92, 112, 133].

На сегодня в Российской Федерации зарегистрированы вакцины: «АНТОКС-9» против клостридиозов сельскохозяйственных животных; «Клост-бовак-8» против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентная инактивированная; Миллениум – против эмкара, газовой гангрены, энтеротоксемии, бактериальной гемоглобинурии и столбняка, предназначенная для крупного рогатого скота, овец и свиней; ТОКСИПРА ПЛЮС – против клостридиозов крупного рогатого скота; «ВанШотУльтра 8» против клостридиозов и пастереллеза крупного рогатого скота; «Скоугард 4КС» против рота- и коронавирусов, эшерихиоза, клостридиоза крупного рогатого скота; «Мультикрос» – против клостридиозов крупного рогатого скота, мелкого рогатого скота и кроликов [47, 48, 109, 123, 124, 125, 130, 135, 138, 140].

Недостатком зарубежных ассоциированных препаратов является их многокомпонентность, при этом, состав не в полной мере отвечает угрозам эпизоотической ситуации на территории России. Кроме того, эти препараты стоят дорого. Большинство вакцин отечественного и зарубежного производства не содержат антигена *C. perfringens* типа А. Однако наши исследования установили его существенную роль в этиологии анаэробной энтеротоксемии у телят раннего возраста, что делает специфические препараты малоэффективными в хозяйствах. Кроме того, существующие вакцины предназначены для вакцинации животных с 1,5-месячного возраста, а также стельных коров и нетелей. Следует отметить, что в неблагополучных хозяйствах при анаэробной энтеротоксемии целесообразно применять моновакцины против определенных видов возбудителей для вакцинации стельных коров и нетелей, с целью создания колострального иммунитета у новорожденных телят.

Целевых отечественных вакцин против анаэробной энтеротоксемии молодняка крупного рогатого скота практически нет, представленная разработка «Ассоциированной вакцины против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиоз-

ной диареи телят» Спиридонова А.Г. не получила развития и практического исполнения, начиная с 2014 года упоминания о данном продукте отсутствуют. Предложенная отечественная вакцина «Клостбовак-8», выпускаемая в нашей стране с 2011 года, содержит 8 антигенов. Ее применение для молодняка крупного рогатого скота неонатального периода с недостаточно сформированным иммунным статусом в условиях неблагополучного хозяйства по анаэробной энтеротоксемии телят будет недостаточно эффективным, в том числе и потому что не предусматривает протекции в постколостральный период до 2-месячного возраста.

В соответствие с проведенными исследованиями в условиях ЗАО «Васильевское» экспериментальной анатоксин-вакцины против анаэробной энтеротоксемии молодняка, сконструированной нами с эпизоотически значимыми антигенами *Clostridium perfringens* типов А, С и D, отмечены выраженные антигенные и протективные свойства у целевого препарата. Титры антител были выше у сконструированной вакцины против анаэробной энтеротоксемии в 1,5 раза к концу наблюдения и принципиально в период 20-60 дней. Как показали наши исследования (см. табл. 10) значительная инцидентность анаэробной энтеротоксемии у молодняка крупного рогатого скота в промышленных условиях приходится на этот период и не обеспечивается колостральной протекцией. За 12 месячный период наблюдений заболеваний анаэробной энтеротоксемией в группе иммунизированных анатоксином не отмечено, в группе с вакциной «Клостбовак-8» были зарегистрированы два случая заболеваемости с вынужденным убоем (23 и 27-дневный возраст, выделена *C. perfringens* типа С).

Таким образом, полученные данные согласуются со мнением, что иммунная эффективность для молодняка в неблагополучном хозяйстве специфического моновидового препарата будет выше, чем у комплексных ассоциированных средств. Поэтому, в связи со стационарностью и стремительным протеканием болезни, высокой летальностью при анаэробной энтеротоксемии телят, считаем обоснованным применение в неблагополучных хозяйствах целевого препарата,

вакцины против анаэробной энтеротоксемии молодняка крупного рогатого скота, которая состоит из инактивированных антигенов *C. perfringens* актуальных серотипов, установленных в настоящей работе: роль перфрингенс-инфекции в этиологии болезни телят очевидно доминировала в сравнении с другими клостридиями.

Для установления этиологической структуры анаэробной энтеротоксемии телят нами в четырёхлетний период были изучены 371 случаев заболевания с подтверждением диагноза клостридиозов в различных хозяйствах 10 регионов страны трех федеральных округов: Центрального, Приволжского, Уральского.

Изучение клинических случаев позволило установить и охарактеризовать преимущественные и особенные признаки развития анаэробной энтеротоксемии у телят. Так, выявлено, что телята неонатального возраста болеют, в основном, с признаками первичной гипертермии, развитием пиретической лихорадки возвратного типа, нарастающими геморрагической диареей, гематурией, анемией, кровотечениями из анального отверстия, появлением инфильтратов в подкожной клетчатке. У молодняка более старшего возраста признаки менее специфичны. Однако, у молодняка старших возрастных периодов в семиотике анаэробной энтеротоксемии прослеживалось нарастание значения геморрагической диареи с коликами и мышечной дрожи. Значение симптомов нарушения координации движения, парезов или параличей в постнатальный период и более старших телят снижалось, но проявлялись абдоминальные судороги как признак поражения нервной системы.

Из патологоанатомических изменений явления геморрагических поражений слизистых оболочек сычуга, кишечника, серозно-геморрагической инфильтрации подкожной клетчатки были в большей степени представлены у молодняка, павшего от *C. perfringens*, до 1-месячного возраста.

Отмечено, что болезнь характеризуется спорадическими случаями и энзоотическими вспышками с высокой летальностью. Эти данные согласуются со

сведениями, представленными в источниках [1, 2, 9, 14, 16, 17, 23, 24, 90, 112, 116, 118, 141, 207, 214, 217, 219, 220, 223, 230].

Дальнейшими исследованиями из патологического материала от молодняка крупного рогатого скота, а также коров выделены 234 изолята анаэробных микроорганизмов. На основании морфологических, тинкториальных, биохимических свойств выделенные изоляты отнесены к роду *Clostridium*, из которых 79 полевых штамм *Clostridium perfringens* обладали высокой патогенностью и токсигенностью. Выделенные возбудители характеризуются множественной антибиотикорезистентностью, чувствительность более половины культур зафиксировали к кобактану и амоксиклаву, к амоксициллину 50 % культур имели среднюю или высокую чувствительность.

Наши данные согласуются и расширяют имеющиеся сведения о клиникo-морфологических проявлениях клостридиозов крупного рогатого скота, биологических свойствах возбудителя анаэробной энтеротоксемии телят, растущей антибиотикорезистентности циркулирующих патогенных и токсигенных клостридий перфрингенс, представленные в источниках [10, 46, 87, 88, 90, 100, 123]. Однако полученные результаты полнее раскрывают семиотику анаэробной энтеротоксемии у телят, а также дифференцирующие признаки для предварительной диагностики.

Полученные результаты видовой серотипизации возбудителя позволили определить формулу актуальности циркулянтов клостридийных бактерий, вызывающих заболеваемость телят. Согласно нашим исследованиям преобладал *C. perfringens* типов А, С и D, в меньшей степени присутствовали изоляты – *C. novyi*, *C. septicum*, причём не патогенные или слабо патогенные (выделенные от телят). Патогенность установлена для 110 культур *C. perfringens*, преобладающее выделение которых было от телят, ещё 22 культуры обладали слабой патогенностью, вызывали гибель одной лабораторной модели из двух пар в течение 72 часов. Патогенные культуры клостридий других видов (*C. novyi* 1 из 30,

C. septicum – 3 из 28) выделены из патматериала от коров и молодняка 10-12 месяцев, *C. sordellii* – 3 изолята с патогенностью – от коров.

Согласно известным определениям, анаэробная энтеротоксемия вызывается *C. perfringens* типами А, С, В, D, редко Е. В нашей стране заболевание, вызванное типом Е, не описано. Наиболее часто новорожденные телята погибают от возбудителя *C. perfringens* типа А, молодняк более старшего возраста восприимчив к *C. perfringens* типа С, а взрослое поголовье крупного рогатого скота страдает от *C. perfringens* типа D. В настоящее время уже известно более 240 видов клостридий. Появляются новые, малоизученные, измененные и редко встречающиеся виды этой патологии [1, 10, 11, 12, 17, 20, 40, 87, 100, 113, 121, 134, 145, 149, 152, 160]. Полученные нами результаты исследования согласуются с мониторингом клостридиозов, проведенных авторами Москалевой Н.В., Спиридоновым Г.Н., Ивановым А.А., Макаевым Х.Н. и другими [2, 4, 20, 59, 60, 68, 71, 95, 96, 109, 112, 133, 137, 141, 146].

Для разработки анатоксина против анаэробной энтеротоксемии молодняка крупного рогатого скота мы определили состав препарата, включающий антигены *C. perfringens* типов А, С и D. Получение производственных штаммов стало следующим этапом работы, в течение которого был проведен отбор выделенных культур возбудителя, изучение их морфологических, тинкториальных, культурально-биохимических свойств, патогенности, токсигенности, антибиотикорезистентности. Для реализации этой задачи нами было проведено расширенное бактериальное исследование каждого изолированного возбудителя. Изучение 234 изолятов клостридий, полученных из патологического материала, как от молодняка, так и от взрослых животных, павших или вынужденно убитых в случаях характерных клинико-морфологических проявлений, в том числе подкожного газового инфильтрата тканей, позволило провести собственную поисковую работу штаммов-кандидатов.

Систематизировав полученные результаты, произведённая их оценка свидетельствовала о проявлении характерных свойств у изолятов в их видовой

специфике родового происхождения *Clostridium*. Биологические свойства возбудителей соответствовали их идентификационной принадлежности и имеющимся данным [5, 8, 92, 93, 103, 108].

Патогенность определяли следующим способом: исследуемые культуры вводили внутримышечно морским свинкам – 0,5 см³ и кроликам – 1,0 см³. Результаты исследования учитывали в течение 3 суток по времени гибели животных. Из 234 выделенных изолятов клостридий 110 являлись патогенными для морских свинок и кроликов. Как уже было отмечено в обсуждении, наиболее патогенными были изоляты *C. perfringens* типов С и А, несколько меньше *C. perfringens* типа D, выделенные от телят, что и послужило основой формирования целевого препарата для молодняка – «Поливалентного анатоксина *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят».

На лабораторных моделях: белых мышах была установлена токсичность вирулентных *Clostridium*, что позволило отобрать наиболее патогенные, токсигенные изоляты, сформировать их паспортные характеристики штаммов. Установленные наиболее токсигенные и патогенные штаммы могут быть использованы, в дальнейшем, для контроля вакцинопрепаратов. Кроме того, изучение свойств штаммов патогенных *C. perfringens* позволило охарактеризовать их антибиотикорезистентность. Как уже отмечено, полученные данные указывают на множественную антибиотикорезистентность у всех патогенных изолятов: устойчивая и низкая чувствительность возбудителя отмечена к антибиотикам трех и более групп. Наименьшую чувствительность *C. perfringens* проявила к эритромицину, неомицину, гентамицину, азитромицину. Это согласуется с литературными данными, что циркулирующие патогены *C. perfringens* сохраняют в половине чувствительность в β -лактамам пенициллиновой подгруппы, но развивают резистентность к антибиотикам групп: аминогликозиды, макролиды, фторхинолы, тетрациклины [19, 36, 52, 59, 77, 79, 90, 112, 123, 138, 152, 154].

Анализ результатов антибиотикорезистентности свидетельствует, что применяемые антибактериальные препараты не проявляют должного бактерио-

статического действия на микроорганизмы, что существенно оказывает влияние на эффективность лечебно-профилактических мероприятий на основе применения антибиотиков, используемых на сегодня в скотоводческих хозяйствах страны. Это обстоятельство определяет необходимость в совершенствовании иммунопрофилактики болезни как эффективного способа борьбы с инфекцией и её последствиями.

Для разработки экспериментального поливалентного анатоксина *C. perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят подбирали и исследовали штаммы *C. perfringens*: как новые выделенные из патологического материала, так и производственные из коллекции ФГБУ «ВГНКИ». К сожалению, новые штаммы не превосходили по токсигенными свойствами и иммуногенной активности депонированные производственные штаммы.

На основании полученных данных нами для приготовления поливалентного анатоксина были использованы культуры производственных штаммов *C. perfringens* типов А № 28, С № 3 и D № 91, которые выращивали на мясоказеиновой среде в реакторе. После проведенного культивирования, в реактор с культурой добавляли дробно формалин. Инактивированные культуры центрифугировали для удаления бактериальных клеток, а надосадок использовали для получения антигена.

Эффективность инактивированных вакцин зависит не только от качества антигена, но и от правильного выбора адъювантов.

Наиболее часто в качестве адъювантов используют гидроокись алюминия, фосфат кальция, фосфат алюминия и диоксид кремния. При изготовлении эмульсионных вакцин применяют вазелиновое, парфюмерное, вакцинное масло. Использование эмульсионных вакцин имеет существенный недостаток: обладая затруднительным введением, высокой кинетической вязкостью, застыванием при низких температурах, эмульсионные вакцины имеют ограниченность применения в животноводстве.

Учитывая вышеизложенное, нами в качестве адъюванта был применён гидроксид алюминия. Гидроокись алюминия успешно отработана в качестве осадителя и адъюванта в аналоговых препаратах – «Поливалентная концентрированная гидроокись алюминиевая вакцина против бразилового, энтеротоксемии овец и дизентерии ягнят», «АНТОКС 9», «Клостбонакс-8», «Вакцина ассоциированная против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят». Для осаждения антигенов и потенцирования антитоксической активности использовали трехпроцентный раствор гидроксида алюминия в количестве 15-18 % от общего объёма. Данные свойства и преимущества гидроксида алюминиевых вакцин-анатоксинов против клостридиозов осветили в своих работах Каган Ф.И., Колесова А.И., Капустин А.В., Спиридонов А.Г., Иванов А.А., Спиридонов Г.Н., определив данный химический компонент в качестве приоритетного при осаждении клостридиозных антигенов в биопрепаратах.

Значительным этапом приготовления целевой анатоксин-вакцины являлось смешивание компонентов, оценка физических свойств, контроль стерильности, безвредности, внешнего вида и антитоксической активности. Полученный поливалентный анатоксин *C. perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят исследовался в лабораторных условиях по следующим показателям: внешний вид, наличие посторонних примесей, стерильность, безвредность и антитоксическую активность.

Во всех сериях вакцинопрепарата: «Поливалентный анатоксин *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят», установлено, что он отвечает современным требованиям качества, являясь полностью безопасным при введении животным и индуцирует у животных иммунитет высокой степени напряженности. Таким образом, базируясь на научный задел в вакцинологии клостридийных средств и опыт по биотехнологии анатоксин-вакцин [77, 94], были изготовлены в соответствие с ключевыми параметрами технологии несколько серий экспериментального препарата «Поливалентного анатоксина *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят».

В дальнейших исследованиях определена оптимальная прививочная доза для кроликов (необходима для разработки контроля антитоксической активности) и целевых животных. Интервал между вакцинациями определяли, используя опыт применения аналоговых противоклостридиозных препаратов и имеющиеся данные о механизмах формирования иммунного ответа у животных, описанные Здродовским П.Ф. в 1950 году [16]. Выявили, что действующими дозами для иммунизации кроликов является объём препарата в дозе 2 см³ (при введении смеси токсинов и сыворотки оставались живы все 5 белых мышей), для иммунизации стельных коров и нетелей доза составила 5 см³, для телят – 3 см³.

Изыскивая оптимальную схему вакцинации стельных коров, нетелей и телят, мы руководствовались общепринятыми положениями, касающимися методов введения вакцин, отработки их дозировки, количества инъекций и интервала между ними.

Производственные испытания анатоксина проводились в условиях индустриальной технологии племенного молочного хозяйства ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское» Сергиев Посадского района Московской области.

На основании анализа эпизоотической ситуации, клинических признаков, патологоанатомических изменений и лабораторных исследований был установлен диагноз – анаэробная энтеротоксемия крупного рогатого коза, вызванная *C. perfringens* типа А, С и D.

Протективную эффективность изучали в группах аналогов, используя наряду с «Поливалентным анатоксином *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят», ассоциированную вакцину против клостридиозов крупного рогатого скота «ТОКСИПРА ПЛЮС» (Испания), применявшуюся ранее в хозяйстве. Исследования проводили при иммунизации стельных коров, затем, молодняка в соответствие с инструкциями по применению.

Установили, что «Поливалентный анатоксин *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят» – безвреден для животных, обладает низкой

реактогенностью, высокой антитоксической активностью. В период наблюдения в 2017 году отмечена более высокая сохранность молодняка в группе применения поливалентного анатоксина с отсутствием случаев заболеваемости анаэробной энтеротоксемией. В то же время иммунизация вакциной «ТОКСИПРА ПЛЮС» вызывала местную реакцию, в период наблюдения отмечали 6 случаев анаэробной энтеротоксемии у телят в 14-40-дневном возрасте с подтверждением диагноза и выделением возбудителя – *C. perfringens* типов А и С.

Как уже было отмечено, высокие антигенные свойства были доказаны у поливалентного анатоксина в сравнительных исследованиях с вакциной «Клостбовак-8» на восприимчивых животных.

Полученные в ходе исследований данные позволяют говорить, что производственные антигены отвечают современным требованиям качества, являясь безопасными при введении животным и эффективно индуцирующими иммунитет высокой степени напряженности, а избранный состав и технология изготовления перфрингенс-анатоксина удовлетворяют запросам иммунопрофилактики анаэробной энтеротоксемии телят в неблагополучных или условно благополучных хозяйствах и комплексах (фермах).

Поливалентный анатоксин *C. perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят обеспечивает формирование колострального и активного иммунитета у телят, снижая, тем самым, возникновение случаев заболевания анаэробной энтеротоксемией. Анатоксин в рекомендуемых дозах – безвредный. Установленная протективная эффективность изготовленного препарата позволяет говорить о защите молодняка крупного рогатого скота как в молозивный период, так и в последующие раннемолочный период, позднемолочный период, период полового созревания, в которые отмечена актуальность перфрингенс-инфекции и значимость экономических потерь от заболеваемости и гибели молодняка.

ГЛАВА 4. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

4.1 Выводы

1. Исследования случаев анаэробной энтеротоксемии позволили выделить дискоординацию движений с парезами и параличами, пиретическую гипертермию, лихорадку возвратного типа, подкожную инфильтрацию и патоморфологию геморрагического поражения как характерные признаки болезни у неонатальных телят. У молодняка старших возрастных периодов в семиотике анаэробной энтеротоксемии отмечена меньшая специфичность, превалировали геморрагическая диарея с коликами, мышечная дрожь. Болезнь характеризуется спорадическими случаями и энзоотическими вспышками с высокой летальностью.

2. Из патологического материала от молодняка крупного рогатого скота, а также коров выделены 234 изолята клостридий, из которых 163 *Clostridium perfringens*, в т.ч. 79 – с выраженной патогенностью и токсигенностью. Установлено, что в этиологии анаэробной энтеротоксемии телят ведущая роль принадлежит *C. perfringens* типов А, С, D, причём серотип А доминировал в этиологии заболеваемости у неонатальных телят, тип С – у молодняка старшего возраста. Выделенные возбудители характеризуются множественной антибиотикорезистентностью, наибольшую активность фиксировали у кобактана (71,1 %) и амоксиклава (56,1 %).

3. Полученные штаммы *C. perfringens* не обладали более высокой токсигенностью и антитоксической активностью по сравнению с производственными штаммами *Clostridium perfringens* типов А № 28, С № 3 и D № 91, депонированными в коллекции ФГБУ «ВГНКИ».

4. Разработан «Поливалентный анатоксин *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят». Технология изготовления анатоксина основана на раздельном культивировании производственных штаммов *C. perfringens* серотипов А, С, D на мясо-казеиновой питательной среде в двух генерациях с разными режимами инкубации, на дробной инаktivации формалином, концен-

трировании путём осаждения в супернатанте 3 % раствором гидроокиси алюминия и на очистке моноанатоксинов ультрафильтрацией с последующим их смешиванием в соотношении 1:1:1.

5. Установлено, что оптимальной иммунизирующей дозой «Поливалентного анатоксина *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят», обеспечивающей 90-100 % эффективность в опытах, является: для кроликов – 2 см³; для телят – 3 см³; для стельных коров и нетелей – 5,0 см³ при подкожном введении двукратно с интервалом 21 день.

6. В лабораторных условиях установлено, что «Поливалентный анатоксин *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят» является стерильным, безвредным, обладает высокой иммуногенной активностью. Сыворотка крови от двукратно вакцинированных кроликов предотвращает гибель 90-100 % белых мышей после заражения их смертельными дозами токсинов *C. perfringens* типов А, С и D, при полной гибели мышей в контроле.

7. Поливалентный анатоксин против анаэробной энтеротоксемии телят не токсичен и слабо реактогенен для целевых объектов, обладает выраженными защитными свойствами от возбудителя для телят, что было установлено в ходе сравнительных апробационных производственных испытаний. Сохранность в опытной группе составила 98,5 % в течение 12-месячного периода наблюдения, что на 8,8 % выше, чем в группе животных, иммунизированных многокомпонентным биопрепаратом – вакциной против клостридиозов крупного рогатого скота «ТОКСИПРА ПЛЮС». Антигенные свойства анатоксина были на сопоставимых уровнях и выше, чем в группе телят с иммунопрофилактикой ассоциированным аналогом.

4.2 Практическое использование полученных научных результатов

1. На основе проведенных исследований разработан и предложен для внедрения в ветеринарную практику «Поливалентный анатоксин *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят».

2. По материалам исследований разработаны:

- «Поливалентный анатоксин *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят», СТО 00507243-005-2019;

- «Промышленный технологический регламент на производство и контроль качества поливалентного анатоксина *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят»;

- «Инструкция по применению поливалентного анатоксина *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят».

3. Получен патент № RU 2699035 С 2 «Поливалентная вакцина против анаэробной энтеротоксемии молодняка крупного рогатого скота и способ ее применения».

4.3. Рекомендации по использованию научных выводов

1. Для специфической профилактики анаэробной энтеротоксемии молодняка крупного рогатого скота рекомендуется применять «Поливалентный анатоксин *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят» по схеме: стельных коров и нетелей иммунизируют подкожно двукратно с интервалом 21 ± 2 дней, в объеме 5 см³, телятам препарат вводят двукратно с интервалом 21 ± 2 дней подкожно в объеме 3 см³, с 14-20-дневного возраста.

2. Материалы научных исследований рекомендуется использовать в диагностике и противоэпизоотической работе для борьбы с анаэробной энтеротоксемией крупного рогатого скота.

3. Результаты научно-исследовательской работы могут быть использованы в образовательном процессе по дисциплинам: «Микробиология», «Эпизоотология и инфекционные болезни животных», «Ветеринарная биотехнология».

ГЛАВА 5. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алешкевич В.Н. Совершенствование специфической профилактики анаэробной энтеротоксемии телят: Автореф. дис. канд. вет. наук. – Витебск, 1992. – 19 с.
2. 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 Беларусь. – 1999. - № 2. – С. 73-76.
3. Асонов Н.Р. Микробиология: учеб. Пособие для студ. ветер. вузов / Н.Р. Асонов – М.: Колос, 1997. – 352 с.
4. Бакулин И.Н. Выделение энтеротоксигенных штаммов *Cl. perfringens* типа А и изучение их энтеротоксиногенеза // ЖМЭИ. – 1981. - № 3. – С. 8-12.
5. Бергольцева Л.А. Быстрая диагностика *Cl. perfringens* // Сб. науч. тр. – Харьковского научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. Мечникова, 1955. – Т. 21.– С. 45-48.
6. Бергольцева Л.А. Условия обезвреживания токсина *Cl. perfringens*, полученного в казеиновой среде / Л.А. Бергольцева, С.В. Бирюкова // Сб. науч. тр. – Харьковского научно-исследовательского института вакцин и сывороток им. Мечникова, 1963. – Т. 27, – С. 23-26.
7. Бессарабов Б.Ф. Инфекционные болезни животных / Б.Ф. Бессарабов, А.А. Вашутин, Е.С. Воронин. – М.: Издательство КолосС, 2007. – 671 с.
8. Бехтерев С.И. К вопросу о заявке на изобретение, относящееся к штаммам микроорганизмов / С.И. Бехтерев, А.Я. Самуйленко // Матер. межд. науч.-прак. конф. – Щелково, 2005. – С. 405-407.
9. Бублов А.В. Анаэробная энтеротоксемия поросят (этиология, эпизоотология, специфическая профилактика): Автореф. дис. канд. вет. наук. – Минск, 2000. – 21 с.

10. Бургасов П.Н. Эволюция клостридиозов / П.Н. Бургасов, С.Н. Румянцев – М., Изд.: Медицина, 1974. – С. 46-52.
11. 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.
12. В Кубани анаэробная энтеротоксемия / И.А. Болоцкий, А.К. Васильев, В.И. Семнцов, и др. // Ветеринария Кубани. – 2009. - № 4. – С. 12-15.
13. Васильев Д.А. Методы частной бактериологии / Д.А. Васильев, А.А. Щербаков, Л.В. Карпунин // Ульяновск. – 2004. – С. 18-26.
14. Волков Г.К. Гигиена выращивания здорового молодняка // Ветеринария. – 2003. - № 3. – С. 3-6.
15. Волков И.В. К выявлению этиологии энтеритов у новорожденных телят // Сб. науч. тр. Куйбышевской НИВС. – Куйбышев, 1959. – Вып. 3. – С. 11-17.
16. Воробьев А.А. Анатоксины / А.А. Воробьев, Н.Н. Васильев, А.Т. Кравченко // М., Издат.: Медицина. – 1965. – 488 с.
17. Глотова Е.В. Научно-исследовательская работа в области анаэробных инфекций за последние 20 лет // ЖМЭИ. – 1937. – Вып. 19. - № 5. – С. 22-28.
18. Глушкова А.И. Получение концентрированных очищенных гангренозных анатоксинов из нативных и концентрированных токсинов, приготовленных на казеиновых питательных средах /А.И. Глушкова, В.П. Ненашев // Материалы итоговой конф. Московского научно-исслед. инст. вакцин и сывороток. – М., 1967. – С. 43-51.
19. Головкин И.Д. Лечебно-профилактические мероприятия при энтеротоксемии телят / И.Д. Головкин, Г.М. Бутузов, Ф.А. Емченко и др. // Диагностика, патогенез и лечение инфекционных и инвазионных заболеваний с-х животных. – 1984. – С. 25-26.

20. Голубев Н.Д. Анаэробная энтеротоксемия телят // Матер. Всесоюзной конф. по бол. молод. – М., 1964. – С. 19-22.
21. Гончаров А. Этиология и клинико-морфологическое проявление анаэробной энтеротоксемии молодняка крупного рогатого скота // Международный журнал исследований в Аюрведе и фармации. – 2016. –Т. 7, - № 2. – С. 228-231.
22. Горелов Ю.М. Биологические и технологические основы совершенствования средств и методов специфической профилактики сибирской язвы и клостридиозов животных: Автореф. дис. д-ра биол. наук. – Алматы, 1994. – 54 с.
23. Горковенко Н.Е. Кишечные инфекции новорожденных телят бактериальной этиологии / Н.Е. Горковенко, Ю.А. Макаров // Вестник ветеринарии. – 2009. - № 48. – С. 22-27.
24. Горковенко Н.Е. Острые кишечные расстройства новорожденных телят бактериальной этиологии / Н.Е. Горковенко, Ю.А. Макаров, А.М. Кузьменко // Тр. ВИЭВ. – М., Издат.: ВИЭВ, 2011. – Т. 76, – С. 179-181.
25. ГОСТ 26503-85 Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики клостридиозов. – Москва: Издательство стандартов, 1985. – 17 с.
26. ГОСТ 28085-2013 Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Метод бактериологического контроля стерильности. – Москва: Стандартинформ, 2014. – 18 с.
27. ГОСТ 31926-2013 Средства лекарственные для ветеринарного применения. Методы определения безвредности. – Москва: Стандартинформ, 2014. – 20 с.
28. Гугушвили Н.Н. Возбудители анаэробных инфекций / Н.Н. Гугушвили, А.А. Шевченко // учеб. пособие КубГАУ, 2015. – 77 с.
29. Дереза А.Ф. Профилактический эффект сыворотки антиэнтероперфрингенс при экспериментальной энтеротоксемии телят / А.Ф. Дереза, Н.В. Ло-

сякина // Проблемы научного обеспечения животноводства. – Минск. – 1990. – 126 с.

30. Дереза А.Ф. Анаэробная энтеротоксемия телят, обусловленная энтеротоксином *CI. perfringens* типа А / А.Ф. Дереза, В.А. Ленькова // Современные проблемы профилактики зоонозных болезней и пути их решения. – Минск. – 1987. – С. 154-155.

31. Дереза А.Ф. О развитии иммунитета у крупного рогатого скота к токсинам *CI. perfringens* типов А, В, С, Д / А.Ф. Дереза, В.Н. Алешкевич, А.А. Солоненко // Ветеринарная наука. – Минск. – 1992. – С. 77-84.

32. Дереза А.Ф. Получение диагностической сыворотки антиэнтероперфрингенс типа А // Ветеринарная наука – производству. – 1988. – Т. 26. – С. 65-67.

33. Дереза А.Ф. Разработка и испытание методов обнаружения энтеротоксина Клостридиум перфрингенс типа А / А.Ф. Дереза, В.А. Ленькова // Ветеринарная наука – производству. – 1988. – Т. 26, – С. 68-70.

34. Дереза А.Ф. Совершенствование лабораторной диагностики анаэробной энтеротоксемии сельскохозяйственных животных / А.Ф. Дереза, В.А. Ленькова // Современные проблемы профилактики зоонозных болезней и пути их решения. – Минск. – 1987. – 154 с.

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

36. Диагностика, специфическая профилактика и лечение и бактериальных болезней животных / М.К. Пирожков, С.В. Ленев, Е.В. Викторова, и др. // Ветеринария. – 2011. - № 1. – С. 24-28.

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

38. Емельяненко П. А. Энтеротоксины кишечных бактерий / П.А. Емельяненко // Ветеринария. – 2000. - № 2. – С. 25-27.
39. Жукова Е.В. Профилактика желудочно-кишечных болезней новорожденных телят / Е.В. Жукова, Г.И. Устинова // Тр. ВИЭВ. – М., Издат.: ВИЭВ, 2011. – Т. 76, – С. 46-50.
40. Значение энтеротоксигенных штаммов *Cl. perfringens* типа А в этиологии инфекционной энтеротоксемии крупного рогатого скота / Т.И. Сергеева, А.Х. Лайшев, И.Н. Бакулин и др. // Доклад ВАСХНИЛ, 1987. – Т. 5, – С. 32-34.
41. Зароза В.Г. Энтеротоксемия крупного рогатого скота, вызываемая *Cl. perfringens* // Сельское хозяйство за рубежом. – 1984. – Т. 8. – С. 51-53.
42. Земляницкая Е.П. Токсинообразование *Cl. perfringens* типа Е / Е.П. Земляницкая, К.И. Матвеев // ЖМЭИ. – 1966. - № 7. – С. 6-9.
43. Земсков А.М. Некоторые механизмы действия адъювантов // 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. Изучение иммуногенной активности столбнячного компонента в составе ассоциированной вакцины против клостридиозов крупного рогатого скота. // А.В. Капустин, А.И. Лаишевцев, А.И. Гулюкин и др. // Ветеринария Кубани. – 2016. - № 4. – С. 15-17.
46. Изыскание средств специфической профилактики и лечения анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят / Г.Н. Спиридонов, Х.Н. Макаев, А.Г. Спиридонов и др. // Тр. ФЦОЗЖ, Владимир, Издат.: ФГУ ФЦОЗЖ, 2018. – Т. 16, – С. 191-204.
47. Инструкция по применению вакцины против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентная инактивированная «Клостбовак-8» (организация-разработчик – ООО «Ветбиохим», г. Москва).

48. Инструкция по применению вакцины против клостридиозов сельскохозяйственных животных инактивированной «АНТОКС 9» (организация-разработчик – ФКП «Ставропольская биофабрика», г. Ставрополь).
49. Инструкция по применению сывороток антитоксических Кл. перфрингенс типов А, С, D диагностических (организация-производитель – ФКП «Курская биофабрика-фирма «БИОК»).
50. Интерференция компонентов в поливалентной вакцине против клостридиозов крупного и мелкого рогатого скота / О.Д. Скляр, А.В. Капустин, А.И. Лаишевцев и др. // Российский ветеринарный журнал. – 2017. - № 1. – С. 20-23.
51. Инфекционные болезни животных раннего постнатального периода: учеб. Пособие для студ. ветер. вузов / Е.С. Воронин, Д.А. Девришов, В.А. Есепенок и др. – М., Издат.: Лань, 2008. – С. 65-67.
52. Исаев В.В. Способ профилактики желудочно-кишечных болезней телят с применением биологически активных веществ // Ветеринарная патология. – 2008. - № 2(6). – С. 65-67.
53. Исмаилов Э.И. Биохимические и патоморфологические изменения при гастроэнтеритах телят // Ветеринария. – 2007. - № 4. – С. 13-14.
54. Использование молекулярно-генетических методов для типирования *Clostridium perfringens* / А.Д. Козлова, А.И. Лаишевцев, С.П. Яцентюк // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. – 2017. – Т. 63, - № 3. – С. 188-194.
55. Испытание анатоксин-вакцины против энтеротоксемии телят в производственных условиях / В.И. Ленков, В.С. Азаренко, С.И. Музычин и др. // Пути и средства снижения потерь в животноводстве. Издат.: Урожай, 1969. – С. 33-47.
56. Каган Ф.И. Дальнейшие испытания поливалентной концентрированной гидроокись алюминиевой вакцины против браздота, энтеротоксемии

овец и дизентерии ягнят / Ф.И. Каган, А.И. Колесова // Труды ВГНКИ, 1959. – Т.8, – С.114-118.

57. Каган Ф.И. Концентрированная поливалентная вакцина против браздота, инфекционной энтеротоксемии, злокачественного отека овец и дизентерии ягнят / Ф.И. Каган, А.И. Колесова // Биологические и химиотерапевтические ветеринарные препараты. – 1963. – С. 45-57.

58. Каган Ф.И. Лабораторная диагностика анаэробных инфекций и выделение чистых культур / Ф.И. Каган, Я.Р. Коваленко // Производство и контроль бактериальных препаратов в ветеринарии. Издат.: Всесоюз. акад. с/х наук им. В.И. Ленина, 1973. – С. 73-83.

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

60. Капустин А.В. Видовой состав клостридий крупного рогатого скота / А.В. Капустин, А.В. Моторыгин, Н.К. Букова / Вестник ветеринарии. – 2013. - № 1. – С. 71-73.

61. Капустин А.В. Изучение эффективности применения поливалентной вакцины «Клостбовак-8» на неблагополучном по злокачественному отёку, браздоту и анаэробной энтеротоксемии поголовье мелкого рогатого скота // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2016. - №11. – С.33-40.

62. Капустин А.В. Питательная среда, обеспечивающая стабильное накопление токсинов при культивировании некоторых штаммов клостридий / А.В. Капустин, О.С. Пивоварова // Материалы научной конференции «Лекарственные препараты для животных», М., Издат.: ФГБУ ВГНКИ. – 2011. – С. 54-56.

63. Капустин А.В. Разработка вакцины против эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота // Российский журнал сельскохозяйственных хозяйства и социально- экономических наук. – 2016. – Т. 53, - № 5. – С. 97-102.

64. Капустин А.В. Способы контроля иммуногенной активности ассоциированной вакцины против инфекционных болезней крупного рогатого скота, вызванные различными видами бактерий рода *Clostridium spp.* // Ветеринария и кормление. – 2017. - №3. – С. 47-49.
65. Капустин А.В. Столбняк сельскохозяйственных животных // Веткорм. – 2009. - № 6. – С. 55-56.
66. Капустин А.В. Эпизоотология и профилактика клостридиозов крупного рогатого скота / А.В. Капустин, Т.И. Алипер // Единый мир – единое здоровье. Материалы межд. вет. конгресса. – 2017. – С. 106-108.
67. Капустин А.В. Этиологическое значение клостридий при инфекционных заболеваниях крупного рогатого скота / А.В. Капустин, Б.Ю. Бурико // Материалы научной конференции «Лекарственные препараты для животных», М., Издат.: ФГБУ ВГНКИ, 2011. – С. 53-54.
68. Капустин А.В. Этиологическая структура и специфическая профилактика клостридиозов крупного рогатого скота и овец: Автореф. дис. докт. биол. наук. – Москва, 2019. – 49 с.
69. Капустин А.В. Эффективность применения вакцины «Клостбовак-8» против клостридиозов крупного рогатого скота, вызванных различными видами *Clostridium spp.* // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2016. - № 9. – С. 6-11.
70. Каталог лекарственных средств для животных / Под ред. Н.М. Казакова, 2005. – С. 92, 104-105.
71. Кириллов Л.В. Инфекционная анаэробная энтеротоксемия животных / Л.В. Кириллов, З.Х. Межиева // Российский ветеринарный журнал сельскохозяйственных животных. – 2007. - № 3. – С. 4-6.
72. Кириллов Л.В. Предупреждение инфекционных болезней анаэробной этиологии // Ветеринария. – 2001. - № 1. – С. 16-19.

73. Кириллов Л.В. Требования к производственным штаммам микроорганизмов и биологическим препаратам / Л.В. Кириллов, А.В. Селиванов, Ю.А. Козырев и др. // Сб. науч. тр. ВГНКИ. Издат.: ВГНКИ, 1994. – Т. 55, – С. 7-20.
74. Кириллов Л.В. Средства и методы специфической профилактики инфекционных болезней животных анаэробной этиологии / Л.В. Кириллов, Л.И. Сторожев, З.Х. Межиева // Сб. науч. тр. ВГНКИ. Издат.: Спутник, 2003. – Т. 64, – С. 18-31.
75. Кисленко В.Н. Возбудители инфекционной анаэробной энтеротоксемии / В.Н. Кисленко, Н.М. Колычев, О.С. Суворина // Ветеринарная микробиология и иммунология. – М.: Издательство КолосС, 2007. – С. 64-67.
76. Ковалева Е. Н. Мониторинг экосистемы с целью фагового обнаружения патогенными микроорганизмами как часть сельскохозяйственного прогнозирования // Достижения в области экологической биологии. – 2016. – Т. 10, - № 3. – С. 1-3.
77. Колычев Н.М. Ветеринарная микробиология и иммунология / Н.М. Колычев, Р.Г. Госманов // 3-е изд., перераб. и доп. – М.: Издат.: КолосС, 2003. – С. 289-294.
78. Круцких В.А. Анаэробная энтеротоксемия овец, вызываемая *Cl. perfringens* типа А: Автореф. дис. канд. вет. наук. – Воронеж, 1997. – 26 с.
79. Куриленко А.Н. Инфекционные болезни молодняка сельскохозяйственных животных / А.Н. Куриленко, В.Л. Крупальник – М.: Издат.: КолосС, 2000. – С. 21-26.
80. Курлович Д.В. Разработка и апробация вакцины ассоциированной против колибактериоза и анаэробной энтеротоксемии телят / Д.В. Курлович, В.К. Карпович, Н.В. Москалева // БИО – технология реальность и перспективы в сельском хозяйстве. – 2013. – С. 108-113.
81. Лабораторные исследования в ветеринарии. Бактериальные инфекции / Б.И. Антонов, В.В. Борисова, П.М. Волков и др. // Метод. указ. – 1986. – С. 48-51.

82. Ленёкова В.А. Энтеротоксемия телят, вызываемая Кл. перфрингенс и меры борьбы с этим заболеванием // Тр. БелНИВИ. – Минск, 1967. – Т. 6, – С. 21-27.
83. Ленёков В.И. Энтериты, обусловленные *Cl. perfringens* / В.И. Ленёков, В.А. Ленёкова, М.Я. Швец // ЖМЭИ. – 1965. - № 10. – С. 13-19.
84. Ленёков В.И. О причинах возникновения и распространения энтеротоксемии телят в Белоруссии / В.И. Ленёков, В.С. Азаренко, С.И. Музычин // Пути и средства снижения потерь в животноводстве. Издат.: Урожай, 1969. – С. 46-55.
85. Ленёков В.И. Результаты изучения энтеротоксемии новорожденных телят // Тезисы докладов научно-произв. конф. по ветеринарии. – Минск, 1969. – С. 7-12.
86. Малахов Ю.А. Специфическая профилактика и диагностика бактериальных болезней животных / Ю.А. Малахов, Р.В. Душук // Ветеринария. – 2001. - № 1. – С. 35-38.
87. Марченко Ф. Клостридиоз // Главный зоотехник. – 2008. - № 11. – С. 68-70.
88. Мельников В.Н. Основы профилактики анаэробных инфекций / В.Н. Мельников, Н.И. Мельников, У.С. Еникеева – Уфа, 1971. – С. 57-70.
89. Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных / Д.И. Скородумов, В.В. Субботин, М.А. Сидоров и др. // Справочник. М.: Изограф., 2005. – 656 с.
90. Мишанин Ю.Ф. Инфекционная анаэробная энтеротоксемия // Справочник по инфекционным болезням животных. – 2002. – С. 318-331.
91. Мищенко В.А. Меры борьбы с диареями новорожденных телят / В.А. Мищенко, Н.А. Яременко, Д.К. Павлов и др. // Ветеринария. – 2002. - № 4. – С. 16-19.

92. Михеев В.Е. Оценка напряженности поствакцинального иммунитета к эпсилон-токсину *C. perfringens* // Ветеринария и кормление. – 2017. - № 4. – С. 40-44.
93. Михеев В.Е. Оценка содержания специфического иммуноглобулина к эпсилон-токсину клостридий методом иммуноферментного анализа // Таврический вестник аграрной науки. – 2017. - № 3(11). – С. 31-39.
94. Михеев В.Е. Разработка стандартного отраслевого образца сыворотки, калиброванной по содержанию специфического иммуноглобулина к эпсилон-токсину клостридий / В.Е. Михеев, Е.В. Маркова // Материалы IV Международной научной конференции, посвященной 55-летию аспирантуры ФГБУ «ВНИИЗЖ», Владимир, Издат.: ФГУ ФЦОЗЖ, 2016. – С. 165-170.
95. Москалева Н.В. Диагностика и профилактика анаэробной энтеротоксемии телят обусловленной энтеротоксином *CI. perfringens* типа А: Автореф. дис. канд. вет. наук. – Минск, 2001. – 20 с.
96. Москалева Н.В. Профилактическая и лечебная эффективность гипериммунной сыворотки антиэнтероперфрингенс типа А и при энтеротоксемии телят // Ветеринарная наука - производству. – 2001. – С. 99-113.
97. Муромцев С.Н. Современное состояние вопроса об анаэробных инфекциях сельскохозяйственных // Анаэробные инфекции. М., Издат.: Рус., 1958. – 62 с.
98. Мусаева М.Н. Инфекционные диареи новорожденных телят в условиях Дагестана (эпизоотология, профилактика, лечение): Автореф. дис. кандид. вет. наук. – Краснодар, 2010. – 24 с.
99. Нестеров И.А. Особенности диагностики перфрингеоза животных типа А // Науч. обеспечение инновац. развития отечественного животноводства. Северо-Кавказская зон. науч.-исслед. ветеринар. ин-т. – Новочеркасск, 2011. – С. 42-45.

100. Нестеров И.А. Эмерджентная эволюция перфрингеоза (инфекционной анаэробной энтеротоксемии) животных в зоне Северного Кавказа // Ветеринарная патология. – 2005. - № 2. – С. 35-41.
101. Олейник А.В. Расстройство желудочно-кишечного тракта у телят раннего возраста // Ветеринария. – 2009. - № 1. – С. 6-8.
102. Оссипранди М.К. Молекулярное ПЦР – типирование токсинов изоляторов *Clostridium perfringens* и *Clostridium difficile*, полученных от крупного рогатого скота / М.К. Оссипранди, Л. Зербини, Е.М. Болдырева // Российский ветеринарный журнал. – 2013. - № 3. – С. 20-23.
103. Панин А.П. Основные требования к производственным и контрольным штаммам микроорганизмов / А.П. Панин, Н.Т. Татаринцев // Ветеринария. – 1993. - № 4. – С. 28-29.
104. Патент РФ № 2462263. Витвлит М.Х., Смутс Й.Ф., Редхед К. Применение бактерий *Clostridium perfringens* *mun* C для производства вакцины // Патент России. 2012.
105. Патент СССР № 2816459/28-13. Калиниченко Н.Ф., Бирюкова С.В., Старобинец З.Г. Способ получения токсинов клостридий // Патент СССР № 986100. 1979.
106. Патент РФ № 2311197. Киселевский М.В., Доненко Ф.Т., Воюшин К.Е., Тришин А.В. и др. Способ получения протективной белоксодержащей фракции бактерий // Патент России. 2007.
107. Патент РФ № 2001118457/13, 04.07.2001. Меджидов М.М., Темирханова З.У., Аджиева А.А. Питательная среда для дифференциальной диагностики *Cl. perfringens* // Патент России № 2203939. 2003.
108. Патент СССР № 4311448/13, 10.08.1987. Нестеров И.А., Азарян С.Л., Карева Э.П., Круцких В.А., Кащенко С.С. Способ выявления токсинов *Clostridium perfringens* // Патент СССР № 1552654. 1996.
109. Патент РФ № 2010124555/15, 15.06.2010. Спиридонов Г.Н., Иванов А.А., Макаев Х.Н., Хурамшина М.Т., Спиридонов А.Г., Галиуллина Э.Р. Вак-

цина ассоциированная против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят // Патент России № 2428202. 2011. Бюл. № 25.

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

111. Пименов Н.В. Этиология анаэробных инфекций у крупного рогатого скота и сравнительная характеристика выделенных штаммов клостридий / Н.В. Пименов, Ю.Н. Колесникова, А.В. Капустин // RJOAS. – 2016. – Т. 56, - № 8. – С. 39-48.

112. Пименов Н.В. Этиология анаэробной энтеротоксемии у молодняка крупного рогатого скота / Н.В. Пименов, Ю.Н. Колесникова // Перспективные направления в развитии сельского хозяйства: тр. Всероссийского совета молод. уч. и спец. аграр. образов. и науч. учреж. – М., ФГБНУ. Издат.: Росинформгротех, 2015. – С.175-178.

113. Пименов Н.В. Этиология клостридиозов у крупного рогатого скота и сравнительная характеристика выделенных изолятов / Н.В. Пименов, Ю.Н. Колесникова // Наука молодых – инновационному развитию АПК: Мат. Междунар. молодежной научно-практической конф.– Часть 1. – Уфа: Башкирский ГАУ, 2016. – С. 120-125.

114. Польшковский М.Д. Анаэробная энтеротоксемия ягнят: дис. док. ветер. наук. – М., 1948. – 202 с.

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

116. Пулотов Ф.Х. Клостридиозы овец и контроль / Ф.Х. Пулотов, Д.А. Девришов // Ветеринария. – 2019. - № 5. – С. 27-30.

117. Пулотов Ф.Х. Разработка способа совместного культивирования вакцинных штаммов *Clostridium perfringens* / Ф.Х. Пулотов, Д.А. Девришов // Ветеринария, Зоотехния и Биотехнология. – 2019. - № 12. – С. 23-24.

118. Радионова К.П. Клостридиозы сельскохозяйственных животных / К.П. Радионова, О.В. Карабанова // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2010. - № 9. – С. 12-14.
119. Размазин М.И. Энтериты телят, вызываемые анаэробами // Ветеринария. – 1948. - № 1. – С. 8-11.
120. Разработка метода контроля иммуногенной активности ассоциированной вакцины против клостридиозов крупного рогатого скота / А.В. Капустин, А.И. Лаишевцев, О.Д. Скляр и др. // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. – 2017. – Т. 63, - № 3. – С. 170-175.
121. Разработка средств иммунологического мониторинга и прогнозирования острых кишечных инфекций бактериальной этиологии / З.М. Бедоева и др. // Вестник РАСХН. – 2006. - № 3. – С. 63-73.
122. Разработка тест-системы для выявления *Clostridium perfringens* / В.С. Черепушкина, Ю.С. Хоменко, К.А. Табанюхов и др. // Сборник статей в 3 книгах. Барнаул, Издат.: АГАУ, 2016. – С. 298-299.
123. Редкозубова Л.И. Контроль Клостридий – систематическая вакцинация // Ветеринария. – 2016. - № 1. – С. 9-12.
124. Результаты испытания вакцины ассоциированной против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят на лабораторных животных / А.А. Иванов, Г.Н. Спиридонов, Х.Н. Макаев и др. // Ветеринарный врач. – 2012. - № 2. – С. 10-12.
125. Результаты клинических исследований безопасности, антигенной активности и эффективности применения инактивированной вакцины против эшерихиоза и клостридиозов свиней. / А.В. Капустин, А.И. Лаишевцев, Т.И. Алипер и др. // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. – 2017. – Т. 66, - № 6. – С. 352-248.
126. Салимов В.А. Патологоанатомическая и дифференциальная диагностика эшерихиозов, сальмонеллезов, пастереллезов, анаэробных энтеротоксе-

мий, кандидамикоза, их ассоциаций и осложнений у молодняка сельскохозяйственных животных // Атлас. – 2001. – 178 с.

127. Салимов В.А. Некоторые особенности патологоанатомической диагностики анаэробной энтеротоксемии телят, вызванной *Cl. perfringens* типа А, В / В.А. Салимов, Н.П. Салимова // Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях. – 2002. – С. 527-528.

128. Салимов В.А. Особенности проявления и патологоанатомической диагностики анаэробной энтеротоксемий, эшерихиозов и пастереллезов у молодняка животных / В.А. Салимов, А.А. Жаров // Всероссийская ассоциация патологоанатомов ветер. мед.: матер. сбор. науч. труд.: Всероссийская научно-методическая конф. патологоанатомов ветер. мед., 2000. – С. 134-137.

129. 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.

130. 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.

131. Скляр О.Д. Изучение иммуногенной активности столбнячного компонента в составе ассоциированной вакцины против клостридиозов крупного рогатого скота // Ветеринария Кубани. – 2016. - № 4. – С. 15-17.

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

133. Спиридонов Г.Н. Анаэробная энтеротоксемия и эшерихиозная диарея телят: этиология, лечение и специфическая профилактика / Г.Н. Спиридонов, А.Ф. Махмутов, А.Г. Спиридонов и др. // БИО – технология реальность и перспективы в сельском хозяйстве. – 2013. – С. 123-125.

134. 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): Матер. Междунар. науч. конф. – М., 2011. – С. 62-63.

135. Спиридонов Г.Н. Изыскание вакцины против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят / Г.Н. Спиридонов, А.А. Иванов, А.Г. Спиридонов и др. // Современные проблемы и инновационные подходы к диагностике, лечению и профилактике больных животных и птиц. – 2012. – С. 217-220.

136. Спиридонов, А.Г. Инфекционная энтеротоксемия молодняка сельскохозяйственных животных в регионе Среднего Поволжья и Предуралья / А.Г. Спиридонов, А.Ф. Махмутов, М.Т. Хурамшина и др. // Актуальные вопросы ветеринарной медицины Сибири. – Краснообск, 2010. – С. 134-139.

137. Спиридонов А.Г. Мониторинг анаэробной энтеротоксемии молодняка животных в регионах Среднего Поволжья и Предуралья / А.Г. Спиридонов, Х.Н. Макаев, А.Ф. Махмутов // Обеспечение продовольственной безопасности России. Если не мы, то кто?! – Курск, 2010. – С. 270-272.

138. Спиридонов А.Г. Разработка и оценка эффективности вакцины ассоциированной против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят: Автореф. дис. канд. биол. наук. – Казань, 2013. – 18 с.

139. Спиридонов А.Г. Способ получения лечебно-профилактической сыворотки против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят / А.Г. Спиридонов, Р.Х. Юсупов, Д.Д. Несертдинов и др. // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумона. – Казань, 2014. – Т. 220, – С. 208-212.

140. Спиридонов А.Г. Экономическая эффективность применения вакцины ассоциированной против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят / А.Г. Спиридонов, А.И. Акмуллин, Г.Н. Спиридонов и др. // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумона. – Казань, 2014. – Т. 220, – С. 212-215.

141. Спиридонов А.Г. Этиология желудочно-кишечных заболеваний телят и поросят в хозяйствах Среднего Поволжья и Предуралья // Ученые записки КГАВМ им. Н.Э. Баумана. – Казань, 2011. – Т. 206, – С. 200-204.
142. Спиридонов А.Г. Этиология инфекционных диарей новорожденных поросят и телят / А.Г. Спиридонов, А.Ф. Махмутов // Ветеринарная медицина: Межведомственный темат. науч. сб. – Харьков, 2011. – Вып. 95. – С.264-265.
143. Стротанова Е.Н. *Clostridium perfringens* типа А как возбудитель острых желудочно-кишечных заболеваний у детей раннего возраста // Гигиена и санитария. – 1969. - № 6. – С. 6-9.
144. Субботин В.В. Основные элементы профилактики желудочно-кишечной патологии новорожденных животных / В.В. Субботин, М.А. Сидоров // Ветеринария. – 2004. - № 1. – С. 3-6.
145. Тонков В.Д. Изучение биологических свойств Клостридиум перфрингенс типа А / В.Д. Тонков, И.Н. Хайруллин // Межвуз. сб. науч. тр. КВИ. – Издательство Казань. – 1993. – С. 11-16.
146. Ургуев К.Р. Анаэробная энтеротоксемия крупного рогатого скота // Клостридиозы животных. – М., Издат.: Россельхоз. 1987. – С. 99-107.
147. Ургуев, К.Р. Иммуногенез при вакцинации овец полианатоксином против клостридиозов // Проблемы ветеринарной иммунологии. – 1987. – С. 98-101.
148. Ургуев К.Р. Инфекционная энтеротоксемия у сайгаков // Ветеринария. – 1965. - № 3. – С. 5-8.
149. Ургуев К.Р. Энтеротоксемия крупного рогатого скота // Ветеринария. – 1965. - № 4. – С. 10-12.
150. Федоров Ю.Н. Иммунопрофилактика болезней новорожденных телят // Ветеринария. – 1996. - № 11. – С. 3-6.
151. Хоустова И.М. Сравнительные данные по очистке токсинов и анатоксинов *Cl. perfringens* различными методами // Вопросы медицинской химии. – 1963. – Т. 9, – Вып. 2. – С. 22-27.

152. Шахов А.Г. Этиология и профилактика желудочно-кишечных и респираторных болезней телят и поросят // Ветеринарная патология. – 2003. - № 2(6). – С. 25-28.
153. Шевченко А.А. Лабораторная диагностика инфекционных болезней животных / А.А. Шевченко, Л.В. Шевченко, О.Ю. Черных // Метод. указ., 2003. – 25 с.
154. Шевченко А.А. Профилактика и мероприятия по ликвидации анаэробной энтеротоксемии крупного рогатого скота / А.А. Шевченко, Д.Ю. Зеркалев, Л.В. Шевченко / Метод. указ., 2013. – 32 с.
155. Черкас Г.П. Концентрация токсинов *Cl. perfringens* // Тр. Харьковского научно-исслед. инстит. вакцин и сывороток им. Мечникова. – Харьков, 1957. – Т. 25, – С. 21.
156. Черкас Г.П. Методы получения анатоксинов *Cl. perfringens* высокой активности // Тр. Харьковского научно-исслед. инстит. вакцин и сывороток им. Мечникова. – Харьков, 1957. – Т. 25, – С. 11-14.
157. Черная Л.А. Некоторые экспериментальные данные о механизме действия противогангренозных сывороток // ЖМЭИ. – 1943. - № 9. – С. 13-16.
158. Эльмурадов Б.А. Смешанные инфекции телят // Ветеринарная патология. – 2003. - № 2(6). – С. 52-53.
159. Энтеротоксемия телят и поросят / А.Г. Шахов, А. Ануфриев, Ю. Бригодинов и др. // Животноводство России. – 2006. - № 1. – С. 49-50.
160. Энтеротоксемия телят, обусловленная *Cl. perfringens* / В.И. Ленков, В.А. Ленкова, Е.П. Якубо и др. // Ветеринария. – 1965. - № 1. – С. 17-24.
161. Эпизоотическая ситуация в Российской Федерации, 2008-2019 гг. [Электронный ресурс]. URL: <https://www.fsvps.ru>
162. Эпизоотологический мониторинг желудочно-кишечных заболеваний новорожденных телят / М.Т. Хурамшина, А.Ф. Махмутов, Г.Н. Спиридонов и др. // Новости науки в АПК. – 2019. - № 3(12). – С. 265-267.

163. Арзымбетов Д.Е. Биологические свойства штаммов *Cl. perfringens* / Д.Е. Арзымбетов, Д. Сарыбаева, А. Елубай // Вестник Кыргызского национального аграрного университета им. К.И. Скрябина. – 2017. - № 7(45). – С. 265-267.
164. 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, // Can. J. comp. med. 1975. – № 39. – P. 116-132.
165. 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. – Vol. 68. – № 3. – P. 373-402.
166. Beer I. Enterotoxaemia der Kalber durch *Clostridium perfringens* Typ B / I. Beer, Al. Khatib, H. Pilz // Mh. Vet. – Med. 1968. – Jg. 23. – P. 18-25.
167. Blood D.C. Enterotoxaemia of Calves / D.C. Blood, D.M. Helwig // The Australian Veterinary Journal. 1957. Vol. 33, – № 6.
168. Bosworth T.I. Necrotic enterotoxaemia in E. coli due to *Cl. Welchii* type B // Comp. Path. 1943. – № 53. – P. 245-255.
169. 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.
170. Ceci L. Haemorrhagic bowel syndrome in dairy cattle: possible role of *Clostridium perfringens* type A in the disease complex / L. Ceci, P. Paradies, M. Sasanelli, D. de Caprariis, F. Guarda // J. Vet. Med. 2006. – № 53. – P. 518-523.
171. 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.
172. 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.

173. Ferrarezi M.C. Genotyping of *Clostridium perfringens* isolated from calves with neonatal diarrhea / M.C. Ferrarezi, T.C. Cardoso, I.S. Dutra // *Anaerobe*. – 2008. - № 14. – P. 328-331.
174. Griesemer R.A. Enterotoxaemia in beef calves – 30 years observation / R.A. Griesemer, W.R. Krill // *American Vet. Med. Assoc.* 1953. – № 911. – P. 99-122.
175. Griner L.A. *Cl. perfringens* (Type C) in acute hemorrhagic enteritis of calves / L.A. Griner, F.K Bracken // *Am. Med. Assoc.* 1953. – T. 122. – № 911. – P. 99.
176. Griner L.A. Further work on hemorrhagic enterotoxaemia of infant calves and lambs / L.A. Griner, E.N. Baldwin // *Proceedings Book. Am. Vet. Med. Assoc. Annual Meeting.* 1954. – T. 91. – P. 45-51.
177. Griner L.A. *Clostridium perfringens* type D-epsilon enterotoxaemia in brown swindairy calves // L.A. Griner, Aigeulman, W.A. Braung // *Amer. Vet. Med. Ass.* 1956. – № 129. – P. 375-376.
178. Gurjar A. Characterization of Toxin Plasmids in *Clostridium perfringens* type C isolates / A. Gurjar, J. Li, B.A. McClane // *Infection and Immunity*. 2010. – Vol. 78. – № 11. – P. 4860-4869.
179. Hatheway C.L. Toxigenic *Clostridia* // *Clin. Microb. Rev.* 1990. – № 3. – P. 77-81.
180. Hatheway C.L. Toxigenic *Clostridia* // *Clin. Microbiol. Rev.* 1990. – № 3. – P. 66-98.
181. Hepple I.R. Necrotic enterotoxaemia in a calf due to *Clostridium Welchii* type B // *The Vet. Rec.* 1952. – Vol. 64. – № 43. – P. 15-18.
182. Holland R.E. Some infectious causes of diarrhea in young farm animals // *Clinical Microbiology Reviews.* 1990. – Vol. 3. – № 4. – P. 345-375.
183. James E.E. Field experience with *Clostridium* enterotoxaemia in young animals // *J. of the American Vet. Med. Assoc.* 1966. – Vol. 149. – № 2. – P. 24- 31.

184. Katayama S.B. Genome mapping of *Clostridium perfringens* strains with I-Ceul shows many virulence genes to be plasmid-borne / S.B. Katayama, B. Dupuy, T. Gamier, S.T. Cole // Mol. Gen. Genet. 1996. – № 251. – P. 720-726.
185. Khatib-Al. Enterotoxaemia durch *Clostridium perfringens* typ A bei Hirschen und einem Elch in einem quarantaenegehege / Al. Khatib, B. Konler, G. Ilchman // Mh. Vet. Med. 1969. – Jg. 24. – T. 10. – P. 381-384.
186. 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.
187. Kovaleva E. N. Ecosystems' monitoring with purpose for phage detection of pathogen microorganisms as part of agricultural foresight // Advances in Environmental Biology. – 2016. – Vol. 10. - № 3. – P. 1-3.
188. Lebrun M. The expression of *Clostridium perfringens* consensus beta2 toxin is associated with bovine enterotoxaemia syndrome / M. Lebrun, P. Filee, B. Mousset, D. Desmecht // Vet. Microbiol. – 2007. - № 120. – P. 151-157.
189. Lebrun M. The expression of *Clostridium perfringens* consensus beta2-toxin is associated with bovine enterotoxaemia syndrome / M. Lebrun, P. Filee, B. Mousset, D. Desmecht, M. Galleni / Vet. Microbiol. 2007. – № 120. – P. 151-157.
190. Mac Lennan J.D. The histotoxic *Clostridial* infections of man // Infection and Immunity. 1962. – № 26. – P. 177-184.
191. Mac Rae D.R. Enterotoxaemia in young suckled calves / D.R. Mac Rae, E.G. Murray, I.G. Grant // Vet. Res. 1943. – P. 55, 203.
192. 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.
193. Morailon P. Contribution a l'etude etologique des welchiasés animaux / P. Morailon, N. Valcin // Bull. Office intern. epizooties. 1967. – № 9-10. – P. 1329-1350.

194. 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.
195. Hiilo L. *Cl. perfringens* types isolated from animal sources in Alberta and Saskatchewan / L. Hiilo, R. Avery // Canad. Vet. J. 1963. – № 2. – P. 31-36.
196. 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.
197. 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.
198. 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. – Vol. 182. – № 8. – P. 2096-2103.
199. 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. Sakurai // Infect. Immun. 2011. – Vol. 79. – № 11. – P. 4353-4360.
200. Niilo L. Bovine Enterotoxemia. Experimental reproduction of the disease / L. Niilo, R.E. Moffatt, R.J. Avery // Can. Vet. Journal. 1963. – Vol. 4. – № 11. – P. 288-298.
201. Niilo L. Clinical and antibody responses to *Clostridium perfringens* type A enterotoxin in experimental sheep and calves / L. Niilo, H.J. Cho // Can. J. Comp. Med. 1985. – № 49. – P. 145-148.
202. Niilo L. Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type A isolated from intestinal contents of cattle, sheep and chickens // Can. J. comp. Med. 1978. – № 42. – P. 357-363.
203. Niilo L. Measurement of biological activities of purified and crude enterotoxin of *Clostridium perfringens* // Infect. Immunit. 1975. – Vol. 12. – № 2. – P. 440-442.

204. 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. – Vol. 58. – № 8. – P. 2487-2492.
205. Petit L. *Cl. perfringens* toxin type and genotype / L. Petit, M. Gibert, M.R. Popoff // Trends Microb. 1999. – № 7. – P. 104-110.
206. Popovic M. *Clostridium perfringens* u sllazi / M. Popovic, Z. Forzek // Veterinaria. 1969. – Vol. 18. – № 1. – P. 111-115.
207. Prevot A.R. Recrudescence des infections animales a *Welchia perfringens* A / A.R. Prevot, H. Jacotot, A. Vallee // Bull. de l'academie vet. de France. 1961. – P. 7, 34.
208. Rood J.I. Molecular genetics and pathogenesis of *Clostridium perfringens* / J.I. Rood, S.T. Cole // Microb. Rev. 1991. – Vol. 55. – № 4. – P. 621-648.
209. Rood J.I. Virulence genes of *Clostridium perfringens* // Annu. Rev. Microbiology. 1998. – № 52. – P. 333-360.
210. Ross H. *Clostridium perfringens* iota toxinist activation by trypsin / H. Ross, M. Warren, V. Barnes // Comp. Path. a Ther. 1949. – № 11. – P. 134.
211. 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.
212. Sandercock R. *Clostridium enteritis* in cattle // Vet. Rec. 1958. – P. 70, 566.
213. 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.
214. Sayeed S. Characterization of virulence plasmid diversity among *Clostridium perfringens* type B isolates / S. Sayeed, J. Li, B.A. McClane // Infection and Immunity. 2010. – Vol. 78. – № 1. – P. 495-504.

215. Schoffild F.W. Enterotoxaemia (Sudden Death) in calves due to *Cl. Welchii* // Amer. Vet. Med. Ass. 1955. – P. 126, 129-194.
216. 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. – Vol. 78. – № 9. – P. 3957-3968.
217. Shirley G. *Clostridium enteritis* in cattle // Vet. Rec. 1958. – P. 70, 478.
218. 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.
219. 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.
220. Songer J.G. Clostridial enteric diseases of domestic animals // Clin. Microbiol. Rev. 1996. – № 9. – P. 216-234.
221. 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. – Vol. 54. – № 3. – P. 683-688.
222. Сугирбаева Г.Д. Получение специфического антигена к возбудителю *Clostridium perfringens* / Г.Д. Сугирбаева, М.Б. Матраимов, Ж.К. Кошематов // Наука, новые технологии и инновации Кыргызстана. – 2015. - № 4. – С. 132-133.
223. 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.
224. 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. – Vol. 57. – № 2. – P. 367-376.

225. Titball R.W. The *Clostridium perfringens* alpha-toxin / R.W. Titball, C.E. Naylor, A.E. Basak // Anaerobe. 1999. – № 5. – P. 51-64.
226. Uzal F.A. Recent progress in understanding the pathogenesis of *Clostridium perfringens* type C infections / F.A. Uzal, B.A. McClane // Vet. Microbiol. 2011. – № 153. – P. 37-43.
227. Vance H.N. *Clostridium perfringens* as a pathogen of cattle: a literature review // Can. J. comp. Med. Vet. Sei. 1967. – № 31. – P. 248-250.
228. 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. – Vol. 76. – № 10. – P. 4396-4404.
229. Yoo H.S. Molecular typing and epidemiological survey 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.
230. Zaharija I. Enterotoxaemia krava usakovana sa *Cl. perfringens* / I. Zaharija, P. Zelenka // Vet. Arch. 1958. – № 1-2. – P. 28.

ПРИЛОЖЕНИЯ

К диссертационной работе прилагаются следующие копии документов:

№	Документ	Стр.
1	Паспорт штамма микроорганизмов <i>Clostridium perfringens</i> тип С № 3	143
2	Паспорт штамма микроорганизмов <i>Clostridium perfringens</i> тип А № 28	145
3	Паспорт штамма микроорганизмов <i>Clostridium perfringens</i> тип D № 91	147
4	Инструкция по применению поливалентного анатоксина <i>Clostridium perfringens</i> против анаэробной энтеротоксемии телят	149
5	СТО 00507243-005-2019. Поливалентный анатоксин <i>Clostridium perfringens</i> против анаэробной энтеротоксемии телят	152
6	Промышленный технологический регламент на производство и контроль качества поливалентного анатоксина <i>Clostridium perfringens</i> против анаэробной энтеротоксемии телят	165
7	Акт производственных испытаний лекарственного препарата для ветеринарного применения «Поливалентного анатоксина <i>Clostridium perfringens</i> против анаэробной энтеротоксемии телят»	166
8	Патент на изобретение № 2699035. Поливалентная вакцина против анаэробной энтеротоксемии молодняка крупного рогатого скота и способ её применения	170

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЦЕНТР КАЧЕСТВА И СТАНДАРТИЗАЦИИ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ И КОРМОВ» (ФГУ «ВГНКИ»)

« » Г.
123022, Москва, Д-22, Звенигородское шоссе, 5
тел., факс (095) 253-14-91, E-mail: Vgnki-vet@mtu-net.ru
ИНН 7703056867

ПАСПОРТ

1.	Наименование рода, вида, подвида микроорганизма	<i>Clostridiaceae, Clostridia, Clostridium perfringens</i>
2.	Номер штамма или условное обозначение, присвоенный депозитором. Дата депонирования штамма	<i>Cl.perfringens</i> mun C № 3, 1999 г
3.	Номер штамма или условное обозначение в других коллекциях	<i>Cl.perfringens</i> mun C № 3
4.	Учреждение-депозитор с указанием почтового адреса	Свинокомплекс с/х «Ефремовский», Тульская область
5.	Автор (авторы) штамма: ФИО	Сторожев Л.И., Кириллов Л.В.
6.	Источник выделения штамма: субстрат, географический пункт, дата выделения	Выделен от павшего поросенка. Свинокомплекс с/х «Ефремовский», Тульская область, 1988 г.
7.	Из какого учреждения получен данный штамм	Из с/х «Ефремовский», Тульская область, 1988 г.
8.	Методы идентификации штамма, кем идентифицирован (фамилия, имя, отчество), ссылка на использованные определители	Бактериологические, реакция нейтрализации
9.	Основание для депонирования (практическая ценность культуры, антагонист, продуцент физиологически активных веществ и т.д.)	Производственный
10.	Культурально-морфологические свойства штамма и генетические особенности штамма	Характерные для <i>Clostridium perfringens</i>
11.	Физиолого-биохимические свойства штамма	Характерные для <i>Clostridium perfringens</i>
12.	Условия культивирования: - наименования питательных сред; - pH среды. - температура и продолжительность выращивания. Срок хранения и периодичность пересева культуры штамма в нативной форме	Среда Китта-Тароцци, МПБ, МППБ, МПА; - pH 7,0 – 7,4; - температура 37±0,5, на питательной среде в пробирках 24 часа; - один раз в месяц
13.	Применяемый способ и условия	В лиофилизированном виде в ампулах под вакуумом при

	хранения штамма в коллекции	температуре 2-8 °С
14.	Рекомендуемые способы и условия хранения (если известно). Лиофилизация: продолжительность выращивания на питательной среде (возраст культуры), состав защитной среды, титр клеточной суспензии, режим сублимационного высушивания, температура хранения, срок хранения Криоконсервация: продолжительность выращивания на питательной среде (возраст культуры), состав защитной среды, титр клеточной суспензии, скорость замораживания (град/мин), температура хранения, срок хранения.	Культивировать на среде Китта-Тароцци при температуре 37° в течение 18-24 часов, защитная среда высушивания – сахарозно-желатиновая ВГНКИ №3 или обезжиренное молоко, температура хранения 2-8 °С, срок хранения 5 лет.
15.	Диссоциация культуры в зависимости от метода хранения: описание морфологических типов колоний на конкретной среде и, более подробно, тип, сохраняющий полезный или диагностический признак	Штамм должен находиться в «S» форме
16.	Антигенные свойства	Токсичен для белых мышей и кроликов
17.	Биологические свойства	Патогенен для морских свинок, кроликов, овец и крупного рогатого скота
18.	Пассажиrowан через животных	Пассаж не проводится
19.	На какой среде высылается штамм, количество и род упаковки	В лиофилизированном виде в ампулах.
20.	Дополнительные сведения	Штамм предназначен для производства и контроля препаратов против клостридиозов

Зав. лабораторией
качества и стандартизации
бактерийных лекарственных средств



О.Д. Складов

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЦЕНТР КАЧЕСТВА И СТАНДАРТИЗАЦИИ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ И КОРМОВ» (ФГУ «ВГНКИ»)

“ ” Г.
123022, Москва, Д-22, Звенигородское шоссе, 5
тел., факс (095) 253-14-91, E-mail: Vgnki-vet@mtu-net.ru
ИНН 7703056867

ПАСПОРТ

1.	Наименование рода, вида, подвида микроорганизма	<i>Clostridiaceae, Clostridia, Clostridium perfringens</i>
2.	Номер штамма или условное обозначение, присвоенный депозитором. Дата депонирования штамма	<i>Clostridium perfringens</i> mun A №28, 1997 г.
3.	Номер штамма или условное обозначение в других коллекциях	<i>Clostridium perfringens</i> mun A №28
4.	Учреждение-депозитор с указанием почтового адреса	Государственный национальный ветеринарный институт, Польша
5.	Автор (авторы) штамма: ФИО	Не установлен
6.	Источник выделения штамма: субстрат, географический пункт, дата выделения	выделили в США
7.	Из какого учреждения получен данный штамм	Государственный национальный ветеринарный институт, Польша, 1952 г.
8.	Методы идентификации штамма, кем идентифицирован (фамилия, имя, отчество), ссылка на использованные определители	Бактериологические, реакция нейтрализации
9.	Основание для депонирования (практическая ценность культуры, антагонист, продуцент физиологически активных веществ и т.д.)	Производственный
10.	Культурально-морфологические свойства штамма и генетические особенности штамма	Характерные для <i>Clostridium perfringens</i>
11.	Физиолого-биохимические свойства штамма	Характерные для <i>Clostridium perfringens</i>
12.	Условия культивирования: - наименования питательных сред; - pH среды. - температура и продолжительность выращивания. Срок хранения и периодичность посева культуры штамма в	Среда Китта-Тароцци, МПБ, МППБ, МПА; -pH 7,0 – 7,4; -температура 37±0,5 °С, на питательной среде в пробирках 24 часа; - один раз в месяц

	нативной форме	
13.	Применяемый способ и условия хранения штамма в коллекции	В лиофилизированном виде в ампулах под вакуумом при температуре 2-8 °С; срок хранения 5 лет
14.	Рекомендуемые способы и условия хранения (если известно). Лиофилизация: продолжительность выращивания на питательной среде (возраст культуры), состав защитной среды, титр клеточной суспензии, режим сублимационного высушивания, температура хранения, срок хранения Криоконсервация: продолжительность выращивания на питательной среде (возраст культуры), состав защитной среды, титр клеточной суспензии, скорость замораживания (град/мин), температура хранения, срок хранения.	Культивировать на среде Китта-Тароцци при температуре 37° в течение 18-24 часов, защитная среда высушивания – сахарозно-желатиновая ВГНКИ №3 или обезжиренное молоко, температура хранения 2-8 °С, срок хранения 5 лет.
15.	Диссоциация культуры в зависимости от метода хранения: описание морфологических типов колоний на конкретной среде и, более подробно, тип, сохраняющий полезный или диагностический признак	Штамм должен находиться в «S» форме
16.	Антигенные свойства	Токсичен для белых мышей
17.	Биологические свойства	Патогенен для морских свинок, кроликов, овец и крупного рогатого скота
18.	Пассажиrowан через животных	Пассаж не проводится
19.	На какой среде высылается штамм, количество и род упаковки	В лиофилизированном виде в ампулах.
20.	Дополнительные сведения	Штамм предназначен для производства и контроля вакцин против клостридиозов

/Зав. лабораторией
качества и стандартизации
бактериальных лекарственных средств



О.Д. Склиров

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ВСЕРОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ ЦЕНТР КАЧЕСТВА И СТАНДАРТИЗАЦИИ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЖИВОТНЫХ И КОРМОВ» (ФГУ «ВГНКИ»)

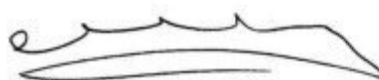
« » Г.
123022, Москва, Д-22, Звенигородское шоссе, 5
тел., факс (095) 253-14-91, E-mail: Ygnki-vet@mfu-net.ru
ИНН 7703056867

ПАСПОРТ

1.	Наименование рода, вида, подвида микроорганизма	<i>Clostridiaceae, Clostridia, Clostridium perfringens</i>
2.	Номер штамма или условное обозначение, присвоенный депозитатором	<i>Clostridium perfringens</i> mun D №91
3.	Номер штамма или условное обозначение в других коллекциях	<i>Clostridium perfringens</i> mun D №91
4.	Учреждение-депозитор с указанием почтового адреса	Южно-Казахстанской НИВС
5.	Автор (авторы) штамма: ФИО	Не установлен
6.	Источник выделения штамма: субстрат, географический пункт, дата выделения	Выделен Южно-Казахстанской НИВС от овцематки в Кызыл-Ордынской обл., 1958 г.
7.	Из какого учреждения получен данный штамм	Южно-Казахстанской НИВС, 1958 г.
8.	Методы идентификации штамма, кем идентифицирован (фамилия, имя, отчество), ссылка на использованные определители	Бактериологические, реакция нейтрализации
9.	Основание для депонирования (практическая ценность культуры, антагонист, продуцент физиологически активных веществ и т.д.)	Производственный
10.	Культурально-морфологические свойства штамма и генетические особенности штамма	Характерные для <i>Clostridium perfringens</i>
11.	Физиолого-биохимические свойства штамма	Характерные для <i>Clostridium perfringens</i>
12.	Условия культивирования: - наименования питательных сред; - pH среды. - температура и продолжительность выращивания. Срок хранения и периодичность посева культуры штамма в нативной форме	Среда Китта-Тароцци, МПБ, МППБ, МПА; - pH 7,0 – 7,4; - температура 37±0,5, на питательной среде в пробирках 24 часа; - один раз в месяц
13.	Применяемый способ и условия хранения штамма в коллекции	В лиофилизированном виде в ампулах под вакуумом при температуре 2-8 °C

14.	Рекомендуемые способы и условия хранения (если известно). Лиофилизация: продолжительность выращивания на питательной среде (возраст культуры), состав защитной среды, титр клеточной суспензии, режим сублимационного высушивания, температура хранения, срок хранения Криоконсервация: продолжительность выращивания на питательной среде (возраст культуры), состав защитной среды, титр клеточной суспензии, скорость замораживания (град/мин), температура хранения, срок хранения.	Культивировать на среде Китта-Тароцци при температуре 37° в течение 18-24 часов, защитная среда высушивания – сахарозно-желатиновая ВГНКИ №3 или обезжиренное молоко, температура хранения 2-8 °С, срок хранения 5 лет.
15.	Диссоциация культуры в зависимости от метода хранения: описание морфологических типов колоний на конкретной среде и, более подробно, тип, сохраняющий полезный или диагностический признак	Штамм должен находиться в «S» форме
16.	Антигенные свойства	Токсичен для белых мышей
17.	Биологические свойства	Патогенен для морских свинок, кроликов, овец и крупного рогатого скота
18.	Пассажирован через животных	Пассаж не проводится
19.	На какой среде высылается штамм, количество и род упаковки	В лиофилизированном виде в ампулах.
20.	Дополнительные сведения	Штамм предназначен для производства вакцин против клостридиозов

Зав. лабораторией
качества и стандартизации
бактериальных лекарственных средств



О.Д. Скларов



УТВЕРЖДАЮ

Ректор академии
ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА
имени К.И. Скрябина
академик РАН, профессор, доктор
ветеринарных наук
Ф.И. Василевич

« 06 » февраля 2019 г.



ИНСТРУКЦИЯ

по применению поливалентного анатоксина *Clostridium perfringens*
против анаэробной энтеротоксемии телят
(организация-разработчик – ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И.
Скрябина, г. Москва)

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Торговое наименование: «Поливалентный анатоксин *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят»

2. Лекарственная форма – суспензия для инъекций. Поливалентный анатоксин *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят (анатоксин) состоит из *C. perfringens* типов А, С и D, инаktivированных формалином и адсорбированных на гидроокиси алюминия.

По внешнему виду анатоксин представляет собой суспензию желто-серого цвета, при хранении которой образуется рыхлый серовато-белый осадок, легко разбивающийся при взбалтывании в гомогенную взвесь.

Препарат расфасован по 100 см³, в стеклянные или пластиковые флаконы соответствующей вместимости, укупоренные резиновыми пробками, укрепленными алюминиевыми колпачками.

3. Флаконы с препаратом упакованы в картонные коробки с разделительными перегородками. В каждую коробку с анатоксином вложена инструкция по ее применению.

Срок годности поливалентного анатоксина *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят 18 месяцев с даты выпуска при соблюдении условий хранения и транспортирования. По истечении срока годности препарат к применению не пригоден.

4. Анатоксин хранят и транспортируют в сухом темном месте при температуре от 2 °С до 8 °С.

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

6. Анатоксин во флаконах без маркировки, с нарушением целостности и/или герметичности укупорки, с измененным внешним видом, подвергшейся замораживанию, с истекшим сроком годности, не использованный в течение 6 часов после вскрытия флакона, бракуют, обеззараживают кипячением в течение 30 минут и утилизируют.

Утилизация обеззараженного анатоксина не требует соблюдения специальных мер предосторожности.

II. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

7. Поливалентный анатоксин *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят вызывает формирование иммунитета у стельных коров и молодняка крупного рогатого скота против анаэробной энтеротоксемии через 2 недели после повторного введения, продолжительностью не менее 12 месяцев.

Анатоксин безвредный, лечебными свойствами не обладает.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

8. Анатоксин предназначен для профилактики анаэробной энтеротоксемии телят, вызванной *C. perfringens* типов А, С и D.

9. Запрещено иммунизировать клинически больных и/или ослабленных животных.

10. Запрещено применять гипериммунные сыворотки или иммунодепрессанты в течение 1 месяца после иммунизации.

11. Анатоксин применяют для профилактики анаэробной энтеротоксемии телят в угрожаемых, стационарно неблагополучных и условно благополучных хозяйствах по данному заболеванию. Специфическую профилактику начинают с иммунизации стельных коров и нетелей, которых иммунизируют подкожно двукратно с интервалом 21 ± 3 дней, в объеме 5 см³. Телятам препарат вводят

двукратно с интервалом 21 ± 3 дней подкожно в объеме 3 см^3 , с 14-20-дневного возраста.

Перед применением флаконы с анатоксином необходимо тщательно встряхивать, а в холодное время – подогревать в водяной бане до $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

При проведении иммунизации необходимо соблюдать правила асептики и антисептики: место инъекции дезинфицировать 70 %-ным раствором этилового спирта, использовать стерильные шприцы и иглы, отдельные для каждого животного.

В случае угрозы заражения возбудителями указанных болезней допускается повторное применение анатоксина для животных через 6 месяцев.

12. Симптомов анаэробной энтеротоксемии или других патологических признаков при передозировке анатоксина не выявлено.

13. Особенности системных реакций при первичном и последующих введениях анатоксина не установлено. Допускается у животных в месте введения анатоксина образование припухлости, которая самостоятельно исчезает в течение 5-10 дней.

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

В случае проявления у животных аллергических реакций на введение препарата необходимо применить антигистаминные препараты.

15. Молоко и продукты убоя, полученные от иммунизированных животных, в любое время реализуются без ограничений.

IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

17. При работе с анатоксином следует соблюдать общие правила личной гигиены и техники безопасности, предусмотренные при работе с лекарственными средствами ветеринарного назначения.

18. Все лица, участвующие в проведении иммунизации должны быть обеспечены спецодеждой (резиновые сапоги, халат, брюки, головной убор, очки закрытого типа, резиновые перчатки). В местах работы должна быть аптечка первой доврачебной помощи.

19. При попадании препарата на кожу и/или слизистые оболочки их промывают чистой водой. При случайном введении анатоксина человеку, место введения необходимо обработать антисептиком (5 %-ным раствором йода или 70 %-ным раствором этилового спирта) и обратиться в медицинское учреждение.

СОГЛАСОВАНО

Профессор кафедры биологии
и патологии мелких домашних,
лабораторных и экзотических
животных
доктор биологических наук,
профессор Н.В. Пименов


«05» февраля 2019 г.

УТВЕРЖДАЮ

Ректор академии
ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА
имени К.И. Скрябина
академик РАН, доктор ветеринарных
наук, профессор Ф.И. Василевич



«06» февраля 2019 г.

**Поливалентный анатоксин *Clostridium perfringens* против анаэробной
энтеротоксемии телят**

СТО 00507243-005-2019

2019 г.

Содержание:

	стр.
1. Область применения.....	4
2. Нормативные ссылки.....	4
3. Термины и определения.....	6
4. Требования безопасности и охраны окружающей среды.....	7
5. Технические требования.....	7
6. Правила приемки.....	9
7. Методы испытания.....	10
8. Транспортирование и хранение.....	13
9. Указания по применению.....	13
10. Гарантии производителя.....	13

Введение

Настоящий стандарт организации является составной частью системы качества продукции и устанавливает требования к поливалентному анатоксину *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят, предназначенному для иммунизации.

Настоящий стандарт разработан в соответствие с требованиями Федерального закона «О техническом регулировании» № 184-ФЗ от 27 декабря 2004 года, ГОСТ Р 1.5-2004, ГОСТ Р 1.4-2004 и устанавливает единые нормы и требования к номенклатуре показателей качества, а также методам их контроля, транспортированию, хранению и применению, обеспечивающим безопасность вакцины при производстве и использовании.

Соблюдение изложенных требований и норм обеспечит поступление на потребительский рынок качественной, безопасной и конкурентноспособной продукции.

**Поливалентный анатоксин *Clostridium perfringens* против анаэробной
энтеротоксемии телят**

СТО 00507243-005-2019

Дата введения 2019 г.

1 Область применения

1.1 Настоящий стандарт распространяется на поливалентный анатоксин *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят (Анатоксин).

Анатоксин предназначен для профилактической иммунизации крупного рогатого скота от инфекций, вызываемых бактериями рода клостридии вида перфрингенс (*Clostridium perfringens* типов А, С и D).

1.2 Препарат состоит из анатоксинов производственных штаммов *C. perfringens* типов А, С и D, инаktivированных формалином и сорбированных на гидроокиси алюминия в качестве адьюванта.

1.3 Положения настоящего стандарта обязательны для применения предприятием, осуществляющим производство и контроль качества Анатоксина.

1.4 Настоящий стандарт может быть использован контролирующими организациями с целью подтверждения соответствия препарата установленным требованиям, в том числе для сертификации.

2 Нормативные ссылки

В настоящем стандарте организации даны ссылки на следующие нормативные и технические документы:

ГОСТ 31929-2013	Средства лекарственные для ветеринарного применения. Правила приемки, методы отбора проб.
ГОСТ Р 52683-2006	Средства лекарственные для животных. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение.
ГОСТ 12.0.004-90	Организация обучения безопасности труда. Общие

	положения.
ГОСТ 12.1.005-88	ССБТ. Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху рабочей зоны.
ГОСТ 12.1.008-76	ССБТ. Биологическая безопасность. Общие требования.
ГОСТ 12.2.003-91	ССБТ. Оборудование производственное. Общие требования безопасности.
ГОСТ 12.3.002-75	ССБТ. Процессы производственные. Общие требования безопасности.
ГОСТ 12.4.001-91	ССБТ. Средства защиты работающих. Общие требования и классификация.
ГОСТ 17.0.0.01-76	Система стандартов в области охраны природы и улучшения использования природных ресурсов. Основные положения.
ГОСТ 17.2.3.02-78	Охрана природы. Атмосфера. Правила установления допустимых выбросов вредных веществ промышленными предприятиями.
ГОСТ 14192-96	Маркировка грузов.
ГОСТ 17768-90	Средства лекарственные. Упаковка, маркировка, транспортирование и хранение.
ГОСТ 9142-90	Ящики из гофрированного картона. Общие технологические условия.
ГОСТ Р ИСО 7864-2009	Иглы инъекционные однократного применения стерильные.
ГОСТ 25336-82Е	Посуда и оборудование лабораторные и стеклянные. Типы, основные параметры и размеры.
ГОСТ 27840-93	Тара для посылок и бандеролей. Общие технологические условия.
ГОСТ 28085-2013	Препараты биологические. Метод бактериологического контроля стерильности.

ГОСТ 29230-91	Посуда лабораторная стеклянная. Пипетки градуированные. Часть 4. Пипетки выдувные.
ГОСТ 51652-2000	Спирт этиловый ректифицированный из пищевого сырья. Технические условия.
ТУ 38-006-108-95	Резиновые пробки для укупорки пенициллиновых флаконов с лекарственными средствами.
ТУ 9461-003-05766126	Флаконы стеклянные для разлива, хранения биопрепаратов и бактериофага.
ГФ XIII	ГФ XIII, т. 1, с. 113. Определение концентрации водородных ионов (рН).
СП 1.2.036	Порядок учета, хранения, передачи и транспортирования микроорганизмов I - IV групп патогенности.
СП 1.3.2322	Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней.

3 Термины и определения

3.1 концентрация водородных ионов (рН): Реакция среды (кислая, щелочная, нейтральная) рН – отрицательный логарифм концентрации водородных ионов при основании 10;

3.2 безвредность: Отсутствие вредных для организма последствий местного и общего характера после введения препарата в тест-дозе;

3.3 иммуногенность: Способность Анатоксина вызывать у иммунизированных особей формирование состояния невосприимчивости противанаэробной энтеротоксемии;

3.4 документ о качестве: Документ, подтверждающий соответствие качества анатоксин требованиям стандарта;

3.5 серия: Определенное количество Анатоксина, изготовленное за один технологический цикл в одних и тех же производственных условиях из однородного сырья, расфасованное в потребительскую тару, однородную по

показателям качества, получившее свой номер серии, номер контроля и оформленное одним документом о качестве (удостоверением).

4 Требования безопасности и охраны окружающей среды

4.1 Производственные штаммы *Clostridium perfringens* тип А - № 28, *C. perfringens* тип С - № 3 и *C. perfringens* тип D - № 91 относятся к микроорганизмам 4 группы патогенности по СП 1.3.2322 и СП 1.2.036.

4.2 По биологической безопасности Анатоксин должен соответствовать требованиям ГОСТ 12.1.008.

4.3 Производственный процесс должен быть организован в соответствии с требованиями ГОСТ 12.3.002.

4.4 Производственное оборудование должно соответствовать требованиям ГОСТ 12.2.003.

4.5 Общие санитарно-гигиенические требования к воздуху в рабочей зоне должны соответствовать требованиям ГОСТ 12.1.005.

4.6 Средства защиты работающих должны соответствовать требованиям ГОСТ 12.4.011.

4.7 Обучение рабочего персонала безопасности труда должно быть организовано в соответствии с требованиями ГОСТ 12.0.004.

4.8 В процессе производства должен быть налажен контроль допустимых выбросов в атмосферу согласно ГОСТ 17.2.3.02.

4.9 Требования безопасности, производственной санитарии выполняют в соответствии с «Правилами безопасности, производственной санитарии, охранно-карантинного и ветеринарно-санитарного режимов на предприятиях биологической промышленности», утвержденными Департаментом ветеринарии Минсельхозпрода РФ 07.06.1999 г.

4.10 Утилизация Анатоксина, не прошедшего контроль и с истекшим сроком годности, осуществляется с соблюдением требований ГОСТ 17.0.0.01 путем кипячения в течение 15 минут. Утилизация обезвреженного кипячением Анатоксина не требует специальных мер предосторожности.

5 Технические требования

5.1 Поливалентный анатоксин *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят по своим органолептическим, физико-химическим и

биологическим свойствам должен соответствовать требованиям и нормам настоящего стандарта, изложенным в таблице 1.

Табл. № 1

Показатели качества поливалентного анатоксина *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят

Наименование показателя	Характеристика и норма	Метод испытания
Внешний вид, цвет	Суспензия желто-серого цвета, при хранении которой образуется рыхлый серовато-белый осадок, легко разбивающийся при взбалтывании в гомогенную взвесь	По п. 7.1
Наличие посторонней примеси, трещин флаконов, нарушение маркировки, качества укупорки	Не допускается	По п. 7.1
Концентрация водородных ионов (рН), в пределах	7,0 – 7,7	По п. 7.2
Стерильность	Должен быть стерильным	По п. 7.3
Безвредность	Должен быть безвредным	По п. 7.4
Антитоксическая активность	Должен быть активным	По п. 7.5

5.2 Маркировка и упаковка

5.2.1 Анатоксин расфасовывают в стеклянные или пластиковые флаконы вместимостью 100,0 см³ по ТУ 10.09-202 или ТУ 9461-003-05766126 или ТУ 9461-023-00480678. Погрешность фасовки ± 3 %.

5.2.2 Флаконы укупоривают стерильными резиновыми пробками ТУ 38-006-108 и обкатывают алюминиевыми колпачками по ГОСТ Р 51314.

5.2.3 Флаконы с анатоксином упаковывают в картонные или пенопластовые коробки с разделительными перегородками, обеспечивающими сохранность вакцины.

5.2.4 На каждый флакон наклеивают этикетки, на которых указывают: страну, наименование и/или товарный знак организации-производителя, наименование вакцины, номер серии, дату выпуска (месяц, год), срок годности (месяц, год), количество доз во флаконе, способ применения, номер регистрационного удостоверения, обозначение СТО, условия хранения и транспортирования, условия отпуска, надпись «Для ветеринарного применения», штрих-код, информацию о подтверждении соответствия.

5.2.5 На каждый ящик наклеивают этикетки, на которых указывают: наименование организации-производителя, наименование препарата, количество флаконов в ящике, номер серии, дату выпуска, срок годности, условия хранения и транспортирования, обозначение ТУ.

5.2.6 На ящики наносят транспортную маркировку по ГОСТ 14192 с указанием манипуляционных знаков «Хрупкое. Осторожно», «Пределы температуры» и надписи «Для ветеринарного применения».

5.2.7 В каждый ящик вкладывают по одному экземпляру инструкции по применению Анатоксина и упаковочный лист с указаниями: наименования организации-производителя, наименование вакцины, количество флаконов в ящике, номера или фамилии упаковщика. Масса ящиков с Анатоксином – не более 15 кг.

5.2.8 Совмещение транспортной маркировки, характеризующей данные об упакованной продукции, на одной стороне транспортной тары не допускается.

6 Правила приемки

6.1 Каждая серия Анатоксина должна быть принята (проверена) организацией-производителем.

6.2 Для контроля качества анатоксина, от каждой серии делают выборку согласно ГОСТ Р 52684. Из выборки выделяют среднюю пробу в количестве, необходимом для проведения испытаний в 3-х повторностях, и столько же для хранения в архиве (по 3 флакона).

6.3 Направляемые в архив образцы анатоксина (арбитражные пробы) маркируют согласно п. 5.4.1 дополнительно указывая: дату отбора проб, объем серии, срок хранения проб, должность и подпись лица, отобравшего пробы. На этикетку ставят штамп «Архив». Флаконы с препаратом хранят в архиве организации-производителя в течение срока годности.

6.4 При получении отрицательных результатов хотя бы по одному из показателей, по нему проводят повторные испытания на удвоенном количестве образцов Анатоксина, взятых из той же серии и на удвоенном количестве материалов и животных. Результаты повторных испытаний считаются окончательными и распространяются на всю серию. В случае получения отрицательных результатов в повторном испытании серию препарата считают несоответствующей требованиям настоящего стандарта и выбраковывают.

6.5 Контроль Анатоксина, поступающего с рекламацией проводит организация-производитель, а при разногласиях в оценке качества вакцины между потребителями и производителем, контроль проводит профильный отдел ФГБУ «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» (ФГБУ «ВГНКИ»).

7 Методы испытания

7.1 Определение внешнего вида, цвета, наличия посторонней примеси, трещин флаконов, качества укупорки

7.1.1 Внешний вид, цвет Анатоксина, наличие посторонней примеси, трещин флаконов, качество укупорки определяют визуально. Одновременно все флаконы проверяют на правильность маркировки.

7.1.2 Учет результатов

По внешнему виду Анатоксин должен представлять собой суспензию желто-серого цвета, при хранении которой образуется рыхлый серовато-белый осадок, легко разбивающийся при взбалтывании в гомогенную взвесь. Во флаконах с препаратом не должно быть посторонней примеси, трещин. Одновременно все флаконы проверяют на правильность маркировки.

7.2 Определение концентрации водородных ионов (рН)

Для всех последующих исследованиях поливалентный анатоксина *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят готовят смешанную пробу, содержимое трех флаконов с препаратом объединяют в

отдельном стерильном флаконе в количестве, необходимом для исследования по всем показателям.

Концентрацию водородных ионов (рН) определяют согласно ГФ XIII, т. 1, с. 113. Концентрация водородных ионов должна быть в пределах 7,0-7,7.

7.3 Определение стерильности

7.3.1 Определение стерильности проводят согласно по ГОСТ 28085-2013 «Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения».

7.3.2 Учет результатов

Анатоксин должен быть стерильным.

7.4 Определение безвредности анатоксина

7.4.1 Материалы и животные:

- иглы инъекционные однократного применения стерильные ГОСТ Р ИСО 7864;
- шприцы инъекционные медицинские вместимостью 1-2 см³ ГОСТ 22967;
- спирт этиловый ректификованный ГОСТ 18300;
- белые мыши беспородные массой 16-18 гр;
- морские свинки массой 350-400 гр.

7.4.2 Проведение испытания

Для проверки безвредности анатоксина используют смешанную пробу, приготовленную по пункту 7.2.

Проверку безвредности определяют на десяти белых мышах и пяти морских свинок. Препарат вводят подкожно в область спины морским свинкам – в дозе 2,0 см³ и белым мышам – в дозе 0,5 см³. За животными наблюдают в течение 10 суток.

7.4.3 Учет результатов

Препарат считается безвредным, если в течение 10 суток наблюдения все животные остаются живыми и клинически здоровыми. Допускается образование на месте введения ограниченного безболезненного уплотнения.

При выявлении случаев падежа животных проверку на безвредность повторяют на удвоенном количестве белых мышей и морских свинок.

При повторном выявлении случаев заболевания и гибели лабораторных животных от введения анатоксина, серию препарата бракуют.

7.5 Определение антитоксической активности Анатоксина в отношении *Clostridium perfringens* типов А, С и D

При проверке антитоксической активности используют смешанную пробу, приготовленную по п. 7.2.

7.5.1 Материалы, животные:

- флаконы стеклянные по ТУ 10.09.202;
- пробирки стеклянные по ГОСТ 25336;
- пипетки стеклянные градуированные вместимостью 1 и 10 см³ по ГОСТ 29230;
- иглы инъекционные однократного применения стерильные ГОСТ Р ИСО 7864;
- шприцы инъекционные медицинские вместимостью 3 см³ ГОСТ 22967;
- спирт этиловый ректификованный ГОСТ 18300;
- стандартизованные токсины *Cl. perfringens* типов А, С и D;
- изотонический раствор натрия хлорида 0,9 %, по ГФ Х, стр. 442 с рН 7,2-7,4;
- кролики породы шиншилла массой 2,5-3,0 кг;
- белые мыши беспородные массой 16-18 гр.

7.5.2 Проведение испытаний

Активность Анатоксина по отношению к *C. perfringens* типов А, С и D, определяют путем постановки реакции нейтрализации токсинов указанных типов клостридий антителами сыворотки крови иммунизированных кроликов.

Определение активности Анатоксина проверяют на пяти кроликах. Препарат вводят двукратно с интервалом 21 ± 3 дней, подкожно в дозе 2 см³. Через 14 дней после повторного введения препарата проводят взятие крови у иммунизированных кроликов из ушной вены и получают сыворотку. Полученную сыворотку объединяют и разливают по отдельным пробиркам. В полученную сыворотку добавляют стандартизованные токсины *C. perfringens* типов А, С и D с установленной активностью 20 Длм/см³ в соотношении 1:1. Смесь токсинов и сыворотки инкубируют при + 37 °С в течение 45 минут с целью нейтрализации токсинов, затем вводят внутривенно по 0,5 см³ пяти белым мышам на каждую смесь.

Параллельно ставят контроль активности токсинов. Используемые токсины разбавляют 0,9 % раствором хлорида натрия до содержания 2 Длм в 1 см³, выдерживают в течение 45 минут при температуре + 37 °С. Белым мышам вводят внутривенно 0,5 см³ одну смертельную дозу токсина бактерий *C. perfringens* типов А, С и D, используя по 5 мышей на каждую пробу. Срок наблюдения – 3 суток.

7.5.3 Учет результатов

Серию Анатоксина считают соответствующей показателю антитоксическая активность, если после введения белым мышам смеси токсина

с сывороткой живыми остаются не менее 4 из 5 использованных животных в каждой группе при гибели не менее 4 контрольных белых мышей. Срок наблюдения за животными – трое суток.

При несоответствии проверяемой серии препарата требованиям СТО по антитоксической активности хотя бы по одному из перечисленных токсинов, проверку активности повторяют на удвоенном количестве животных. В случае повторного несоответствия серию препарата бракуют.

8 Транспортирование и хранение

8.1 Анатоксин транспортируют всеми видами транспорта в соответствии с ГОСТ 17768 и ГОСТ 52683.

8.2 Анатоксин хранят в сухом темном месте при температуре от 2 °С до 8 °С.

9 Указания по применению

Поливалентный анатоксин *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят применяют в соответствии с Инструкцией по применению.

10 Гарантии производителя

10.1 Организация-производитель гарантирует соответствие качества анатоксина требованиям настоящего СТО при соблюдении условий хранения, транспортирования, установленных настоящим Стандартом.

10.2 Срок годности Анатоксина 18 месяцев от даты выпуска. Датой выпуска считают дату подписания документа о качестве. Датой изготовления препарата считают дату расфасовки.

УТВЕРЖДАЮ

Ректор академии
ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА
имени К.И. Скрябина
академик РАН, профессор, доктор
ветеринарных наук
Ф.И. Василевич



« 16 » февраля 2019 г.

**ПРОМЫШЛЕННЫЙ
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ РЕГЛАМЕНТ**

НА ПРОИЗВОДСТВО И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА ПОЛИВАЛЕНТНОГО
АНАТОКСИНА *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* ПРОТИВ АНАЭРОБНОЙ
ЭНТЕРОТОКСЕМИИ ТЕЛЯТ

2019 г.

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское»
 С.М. Горячев
« 29 » июня 2018 г.

АКТ

о производственных испытаниях лекарственного препарата для ветеринарного применения «Поливалентного анатоксина *Clostridium* *perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят»

Комиссия в составе: директора ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское» Сергиев-Посадского района Московской области Горячева С.М., главного ветеринарного врача Гаврюшенко И.В., профессора кафедры биологии и патологии мелких домашних, лабораторных и экзотических животных (БПМДЛиЭЖ) ФГБОУ ВО «МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина» Пименова Н.В. и аспиранта кафедры БПМДЛиЭЖ ФГБОУ ВО «МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина» Крамер Ю.Н. – провела производственные испытания лекарственного препарата «Поливалентного анатоксина *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят» (серия № 3, срок годности до 10.2018г.), по следующим показателям: безвредность, эффективность и антигенная активность.

За период с октября 2016 г. по апрель 2017 г. на молочно-товарной ферме «Озерецкое» было получено 416 телят, из них заболело 14 голов, пало 7, вынужденно убили 5 животных и 2 теленка переболели с клиническим выздоровлением, но значительным отставанием в росте. В начале вспышки заболевали, в основном, телята неонатального возрастного периода, а, в дальнейшем, заболеваемость фиксировали у более старшего молодняка.

При проведении лабораторных исследований в ФГБУ «ВГНКИ» на наличие возбудителей клостридиозных инфекций из содержимого кишечника и печени от павших и вынужденно убитых телят выделили *C. perfringens*.

На основании анализа эпизоотической ситуации, клинических признаков, патологоанатомических изменений и лабораторных исследований был установлен диагноз – анаэробная энтеротоксемия крупного рогатого скота, вызванная *C. perfringens* типами А, С и D.

1. Определение специфической эффективности «Поливалентного анатоксина *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят» в сравнении с вакциной против клостридиозов крупного рогатого скота «ТОКСИПРА ПЛЮС».

Для этого сформировали две подопытные группы. Первая подопытная группа состояла из 70 стельных коров, нетелей, а также полученных от них 70 телят. Животных иммунизировали «Поливалентным анатоксином *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят». Коровам анатоксин вводили подкожно в заднюю треть шеи в дозе 5 см³ двукратно с интервалом 3 недели так, чтобы вторая доза препарата была введена за 3 недели до отела коров, нетелей. Телят иммунизировали двукратно с 14-16-дневного возраста, с интервалом 21 день в дозе 3 см³.

Вторая подопытная группа состояла из 70 стельных коров, нетелей и полученных от них 68 телят. Животных данной группы вакцинировали вакциной против клостридиозов крупного рогатого скота «ТОКСИПРА ПЛЮС» (Испания, разработана фирмой Лабораториес Хипра С.А.). Коровам вакцину вводили согласно инструкции подкожно по 4,0 см³ двукратно с интервалом 20-25 дней, вторая вакцинация приходилась за 3 недели до отёла. Телят иммунизировали также двукратно с 35-дневного возраста с интервалом 20-25 дней по 2 см³.

В первой подопытной группе после первой и второй иммунизации животных системных осложнений не выявляли, в том числе и аборт стельных коров и нетелей.

Во второй подопытной группе после первой вакцинации у большинства животных наблюдали на месте введения реакцию, сопровождавшуюся повышением местной температуры тела, болезненным отеком, хромотой (у теленка), данные симптомы полностью исчезали только через 10 дней. После повторной вакцинации местные реакции были выражены сильнее и проявлялись также отеками на месте инъекции, которые через 5 суток переходили в безболезненные уплотнения, рассасывающиеся в течение 20 дней.

От коров первой группы получено 70 телят (для дальнейшего исследования взяли 68, для соответствия группе аналогов), второй – 68 (1 аборт, 1 случай гибели в двухсуточном возрасте, диагноз – диспепсия

новорожденных). В течение годового периода наблюдения случаи анаэробной энтеротоксемии фиксировали во второй опытной группе.

В первой подопытной группе заболеваемость стельных коров и нетелей отсутствовала, а сохранность молодняка составила 98,5 %, 1 теленок пал от полученной травмы, тогда как во второй подопытной группе, сохранность составила 89,7 %, то есть на 8,8 % ниже, чем в первой группе. Из семи 5 телят пали от анаэробной энтеротоксемии с характерными клинικο-морфологическими изменениями: диарея с примесью крови, подкожные инфильтраты, зернистая гепатодистрофия, спленомегалия, анемия и отек легких, кровонаполненность почек с геморрагиями под капсулой. При бактериологическом исследовании патологоанатомического материала, выделили изоляты *C. perfringens* серотипа С и А.

2. Оценка антигенной активности «Поливалентного анатоксина *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят» и вакцины «Клостбовак-8» на восприимчивых животных.

В МТФ «Озерецкое» сформировали 3 группы по 10 стельных коров и нетелей разного возраста. Первую подопытную группу иммунизировали «Поливалентным анатоксином *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят», препарат инъектировали подкожно в дозе 5 см³, двукратно с интервалом 21 день, вторую дозу препарата вводили за 3 недели до отёла. Вторую подопытную группу иммунизировали вакциной «Клостбовак-8», которую вводили подкожно в области средней трети шеи двукратно с интервалом 21 день в объеме 3 см³, вторую вакцинацию проводили за 28-30 дней до отёла, согласно инструкции по применению вакцины против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентной инактивированной «Клостбовак-8». Третья группа служила контролем, животных не иммунизировали.

За животными: стельными коровами и нетелями полученными от них телятами вели наблюдения в течение 100 и 80 суток соответственно. У коров и нетелей первой и второй группы после первой, а также после повторной иммунизации не отмечали никаких системных и местных нежелательных реакций на введение препаратов, в том числе анафилактики и аборт. На месте введения у животных первой и второй группы наблюдались безболезненные отеки размером от 3 до 5 см², которые исчезали в первой группе через 3-5 дней и во второй группе через 7-18 дней после иммунизации.

Из двух подопытных групп от 20 иммунизированных коров и нетелей получили 20 жизнеспособных телят. Заболевания и гибели телят

неонатального периода с признаками анаэробной энтеротоксемии не наблюдали. В контрольной группе также получены 10 телят от 10 коров.

Новорожденных телят первой подопытной группы иммунизировали на 14 день жизни, препарат вводили двукратно с интервалом 3 недели подкожно в объеме 3 см³. Телят второй подопытной группы иммунизировали в 40-дневном возрасте, вакцину вводили двукратно с интервалом 21 суток, подкожно в объеме 3 см³. У новорожденных телят первой и второй опытной группы на второй день жизни, перед первой вакцинацией, а, затем, через 14 дней после повторной вакцинации брали кровь для оценки титров антитоксических антител. Также исследование провели в 75-дневном возрасте. Полученную сыворотку исследовали в реакции анитоксинсвязывания на белых мышах.

Двукратная иммунизация «Поливалентным анатоксином *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят» способствовала значительному увеличению специфических антител в крови животных. В среднем показатели титров антител по каждому антигену в первой подопытной группе иммунизированных поливалентным анатоксином телят были на сопоставимых уровнях и выше, чем у телят, вакцинированных «Клостбовак-8».

Проведенные исследования показали, что изготовленный «Поливалентный анатоксин *Clostridium perfringens* против анаэробной энтеротоксемии телят» – безвредный в применении, не обладает выраженной реактогенностью для животных, обладает высокой анитоксической активностью и выраженными защитными свойствами.

Главный ветеринарный врач

ЗАО «Племрепродуктор «Васильевское»


(подпись)

/Гаврюшенко И.В./
ФИО

Профессор кафедры БПМДЛиЭЖ
ФГБОУ ВО «МГАВМиБ – МВА
им. К.И. Скрябина»


(подпись)

/Пименов Н.В./
ФИО

Аспирант кафедры БПМДЛиЭЖ
ФГБОУ ВО «МГАВМиБ – МВА
им. К.И. Скрябина»


(подпись)

/Крамер Ю.Н./
ФИО

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2699035

ПОЛИВАЛЕНТНАЯ ВАКЦИНА ПРОТИВ АНАЭРОБНОЙ ЭНТЕРОТОКСЕМИИ МОЛОДНЯКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И СПОСОБ ЕЕ ПРИМЕНЕНИЯ

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина" (ФГБОУ ВО МГАВМиБ - МВА имени К.И. Скрябина) (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2017117751

Приоритет изобретения 22 мая 2017 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 03 сентября 2019 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 22 мая 2037 г.



Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ильин

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 699 035** (13) **C2**

(51) МПК
A61K 39/08 (2006.01)
A61K 39/116 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК
A61K 39/08 (2019.05); A61K 39/116 (2019.05); A61P 31/00 (2019.05)

(21)(22) Заявка: 2017117751, 22.05.2017

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.05.2017

Дата регистрации:
03.09.2019

Приоритет(ы):
(22) Дата подачи заявки: 22.05.2017

(43) Дата публикации заявки: 22.11.2018 Бюл. № 33

(45) Опубликовано: 03.09.2019 Бюл. № 25

Адрес для переписки:
109472, Москва, ул. Академика Скрябина, 23,
Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Московская государственная
академия ветеринарной медицины и
биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина",
научно-исследовательский отдел

(72) Автор(ы):

Пименов Николай Васильевич (RU),
Колесникова Юлия Николаевна (RU),
Капустин Андрей Владимирович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего
образования "Московская государственная
академия ветеринарной медицины и
биотехнологии - МВА имени К.И. Скрябина"
(ФГБОУ ВО МГАВМиБ - МВА имени К.И.
Скрябина) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: RU 2428202 C1, 10.09.2011. RU
2288002 C1, 27.11.2006. RU 2589819 C1,
10.07.2016. US 0004292307 A1, 29.09.1981.
СПИРИДОНОВ А.Г. и др. Специфическая
профилактика анаэробной энтеротоксемии и
эшерихиозной диареи телят // УЧЕНЫЕ
ЗАПИСКИ КАЗАНСКОЙ
ГОСУДАРСТВЕННОЙ АКАДЕМИИ
ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ ИМ. Н.Э.
БАУМАНА, 2012, том 209, стр. 284-289,
[онлайн], (см. прод.)

(54) ПОЛИВАЛЕНТНАЯ ВАКЦИНА ПРОТИВ АНАЭРОБНОЙ ЭНТЕРОТОКСЕМИИ МОЛОДНЯКА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА И СПОСОБ ЕЕ ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области
медицины, а именно к иммунологии и
ветеринарной медицине, и может быть
использована для получения поливалентной
вакцины против анаэробной энтеротоксемии
молодняка крупного рогатого скота. Для этого
вакцина изготовлена из культур *Cl. perfringens*
типов А - №28, С - №3 и D - №91, которые
выращивали на мясо-казеиновой среде в реакторе
при +37°C в течение 4-16 часов в зависимости от
времени токсинообразования конкретного
штамма. Использовали полученные культуры,

содержащие высокоактивные токсины с
накоплением: *Cl. perfringens* тип D не менее 2000
ДЛМ/см³, тип А не менее 100 ДЛМ/см³ и тип С
не менее 6000 ДЛМ/см³ для белых мышей, в
которые после проведенного культивирования в
реактор с культурой добавили формалин с
содержанием 37% формальдегида к объему
культуральной жидкости, предварительно
установив pH 7,2. Инактивацию проводили при
+37°C в течение 7 суток, полученные культуры
центрифугировали, надосадок использовали для

Стр.: 1