

На правах рукописи



ТИЩЕНКО Александр Сергеевич

**ЭТИОЛОГИЧЕСКИЕ И ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ
АСПЕКТЫ ЭШЕРИХИОЗА ТЕЛЯТ И ПОРОСЯТ
И ЕГО ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА**

4.2.3. Инфекционные болезни и иммунология животных

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора ветеринарных наук

Краснодар – 2025

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина»

Научный консультант:	доктор биологических наук, профессор, академик РАН Кощаев Андрей Георгиевич
Официальные оппоненты:	доктор ветеринарных наук, доцент, доцент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет ветеринарной медицины» Макавчик Светлана Анатольевна доктор ветеринарных наук, доцент, доцент кафедры эпизоотологии и организации ветеринарного дела ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина» Пчельников Александр Владимирович доктор биологических наук, заведующий лабораторией бактериальных патологий животных ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» Спиридонов Геннадий Николаевич
Ведущая организация:	ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности»

Защита состоится « 18 » сентября 2025 г. в 09:00 в ауд. № 1 факультета ветеринарной медицины на заседании диссертационного совета 35.2.019.02 при ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина» по адресу: 350044, г. Краснодар, ул. Калинина, 13.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ и на сайте: [http:// www.kubsau.ru](http://www.kubsau.ru).

Автореферат размещен на официальных сайтах ВАК Минобрнауки России: <http://vak.ed.gov.ru> и ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ: <http://www.kubsau.ru>.

Автореферат разослан « ____ » _____ 2025 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Д. П. Винокурова

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Несмотря на постоянное совершенствование технологий содержания крупного рогатого скота и свиней, позволяющих повысить продуктивность животных, тем не менее, вопросы ветеринарного благополучия поголовья этих животных во всем мире остаются актуальными. Наибольшая проблема связана с желудочно-кишечными болезнями телят и поросят. Особенно актуальна эта проблема для животноводческих комплексов промышленного типа и специализированных ферм с высокой концентрацией животных, которая способствует развитию различных возбудителей, взаимодействующих с макроорганизмом в ассоциации. Причина появления этой группы патологий у телят и поросят может быть самой различной, но чаще всего она связана с агрессивным поведением кишечной палочки (*Escherichia coli*), которая может выступать как в роли самостоятельного возбудителя, так и в виде осложняющего фактора [Волкова М.В. и др., 2005; Когденко Н.В., 2001; Петрухин М.А. и др., 2012; Dubreuil J.D. et al., 2016; Veilleux S., 2006].

Кишечная палочка постоянно обитает в кишечном тракте всех животных, включая человека, в связи с чем, собственно, и получила свое название. Что касается агрессии, то, как оказалось, наряду с нормальными, т. е. симбиотическими формами этой бактерии, существуют болезнетворные (агрессивные, патогенные), обуславливающие развитие различных патологий и не обязательно связанные с поражением кишечника, например, таких как отечная болезнь у поросят, сепсис у новорожденных, целлюлит у бройлеров, пиелонефрит у кошек или мастит у коров и др. В связи с этим патогенную *E. coli* стали подразделять на кишечную, или диареогенную, и внекишечную, обуславливающую патологии, не сопровождающиеся диареей [Зароза В.Г., 1991; Карцев Н.Н., 2018; Малышева Т.В. и др., 2017; Тищенко А.С., 2020; Xu C. et al., 2023; Menge C., 2020].

Несмотря на то, что этиологическая роль *E. coli* в развитии массовых поносов у животных доказана уже более чем 150 лет тому назад, тем не менее, вопрос о том, что является триггером «плохого поведения» бактерии, остается нераскрытым. Зато с каждым годом расширяется список факторов патогенности, которые позволяют кишечной палочке, обладающей ими, активно развиваться, защищаться и агрессивно вести себя в организме хозяина. В связи с этим, возбудителя эшерихиоза следует рассматривать как опасного болезнетворного агента, способного поражать широкий круг биологических объектов и наносить существенный экономический и морально-психологический ущерб [Арушанян А.Я., 2014; Светоч Э.А. и др., 2005; Терехов В.И. и др., 2006; Девришов Д.А. и др., 1998; Шаймухаметов М.А. и др., 2018; Dubreuil J.D., 2021; Hashish E.A. et al., 2016; Guler L. et al., 2008].

Профилактика эшерихиоза, как любого другого инфекционного заболевания, должна быть комплексной и включать в себя проведение неспецифических (общих) и специфических (специальных) мероприятий. Если в основе общих мероприятий лежит обеспечение физиологически полноценного развития плода, создание оптимальных условий кормления и содержания матери и приплода, препятствие накопления и распространения возбудителя в окружающей среде, то специфические мероприятия направлены на формирование пассивного и активного искусственно-приобретенного иммунитета. Особое внимание необходимо уделять профилактическим мероприятиям с использованием биологических и фармакологических средств, в том числе пробиотиков, пребиотиков, синбиотиков, органических кислот, фитобиотиков, иммуномодуляторов, адаптогенов, бактериофагов, вакцин, сывороток и иммуноглобулинов [Караев Я.М., 2009; Куликовский А.В. и др., 1997; Тельнов С.Н. и др., 2008; Скориков А.В., 2015; Спиридонов А.Г., 2011; Терехов В., 2012; Melkebeek V. et al., 2013; Nataro J.P. et al., 1998].

Диареегенные кишечные палочки обладают большим разнообразием факторов вирулентности, за счет которых они реализуют свой патогенный потенциал в организме у животных. При этом продукция экзотоксинов является одним из важнейших факторов, отвечающих за патогенность эшерихий. Токсигенный потенциал *E. coli* связан с выработкой термолабильных (LT), термостабильных (ST), субтилазных (SubAB5), шигаподобных (STX), порообразующих (RTX), цитолетальных (Clt), цитонекротических (CNF) энтеротоксинов и различных типов гемолизинов. В связи с этим, изучение биологических свойств экзотоксинов, их влияние на развитие эшерихиозной инфекции у телят и поросят и разработка биопрепаратов на их основе представляется актуальным направлением для ветеринарной науки и практики [Джупина С.И., 2015; Коткова Н.В., 2007; Пирожков М.К., 2002; Светоч Э.А. и др., 2020; Сетдеков Р.А., 2014; Терехов В.И. и др., 2006; Pokharel P. et al., 2023; Zhang H. et al., 2018].

Степень разработанности темы. Вопросами изучения эшерихиозной инфекции у телят и поросят и разработками биологических препаратов для профилактики занимались разные ученые: этиологическими и патогенетическими аспектами эшерихиоза – А.С. Компанченко (2005), Н.В. Коткова (2007), В.Н. Псиола (2007), А.В. Моторыгин (2011), С.В. Бурлаков (2011), Н.Н. Карцев (2017), М.А. Шаймухаметов (2019), А.Г. Глотов, Т.И. Глотова (2020); вопросами иммунитета и профилактики эшерихиоза у телят и поросят – М.К. Пирожков (2002), Н.В. Чулков (2004), Я.М. Караев (2008), Ю.В. Нешумаева (2013), К.В. Татарников (2014), Д.А. Евглевский (2015), Н.В. Васильев (2017), Р.А. Сетдеков (2015), Р.Ф. Сайфутдинов (2018), В.И. Терехов (2020), Э.А. Светоч (2020), А.Г. Кошцаев (2022), А.А. Шевченко (2023).

Диссертационная работа является частью тематического плана НИОКР, утвержденного Ученым советом ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ на 2011–2015 гг. (номер госрегистрации 01201153629), на 2016–2020 гг. (номер госрегистрации АААА-А16-116021110067-4) и на 2021–2025 гг. (номер госрегистрации 121032300041-1).

Цель и задачи исследования. Целью работы является изучение этиопатогенетических аспектов эшерихиозной инфекции у телят и поросят и разработка для ее вакцинопрофилактики биологических препаратов на основе токсоидных компонентов кишечной палочки.

Для достижения намеченной цели были поставлены следующие задачи:

- провести мониторинг эпизоотической обстановки по эшерихиозу телят и поросят на территории Краснодарского края;
- исследовать состав микроорганизмов, изолированных от новорожденных телят и поросят при острых кишечных заболеваниях и определить их патогенный потенциал;
- оценить генетическое разнообразие токсигенных свойств кишечных палочек, выделенных от больных эшерихиозом телят и поросят;
- изучить влияние экзотоксинов эшерихий на гематологические параметры, уровень цитокинов в сыворотке крови, клиническую и патогистологическую картину внутренних органов и систем у различных лабораторных животных при экспериментальном заражении;
- изучить показатели крови, функциональную активность фагоцитарной и микробицидной системы нейтрофильных гранулоцитов, изменяющихся под воздействием инактивированных токсинов кишечной палочки;
- оценить влияние инактивированных экзотоксинов *E. coli* в сочетании с адъювантами на динамику образования и накопления антитоксических антител у лабораторных и сельскохозяйственных животных;
- определить иммунобиологические свойства биопрепаратов на основе токсоидных компонентов кишечной палочки для профилактики эшерихиоза и острых кишечных инфекций телят и поросят;
- рассчитать экономическую эффективность применения разработанных препаратов у крупного рогатого скота и свиней.

Научная новизна. Впервые выделены, изучены и депонированы токсигенные штаммы кишечной палочки, обладающие мультифакторной патогенностью. Определено генетическое разнообразие токсигенных штаммов кишечной палочки среди телят и поросят. Изучено влияние экзотоксинов кишечной палочки на патогенетические аспекты эшерихиозной инфекции. Оценено влияние инактивированных токсинов кишечной палочки на гематологические параметры, фагоцитарное звено иммунитета, активность микробицидной системы нейтрофильных гранулоцитов и их функциональную активность, гуморальные и клеточные

медиаторы, активирующиеся под влиянием антигенной нагрузки в виде экзотоксинов кишечной палочки. Разработаны отечественные биопрепараты на основе токсидных компонентов кишечной палочки в сочетании с адъювантами и определены их иммуногенные свойства. Установлена профилактическая и экономическая эффективность биопрепаратов на основе токсидных компонентов кишечной палочки в промышленном скотоводстве и свиноводстве.

Научная новизна подтверждена 14 патентами РФ на изобретение (№ 2429012 С1; № 2432174 С1; № 2449290 С2; № 2649831 С1; № 2650604 С1; № 2650628 С1; № 2753410 С2; № 2764600 С1; № 2766249 С1; № 2766549 С1; № 2806810 С1; № 2813752 С1; № 2813771 С1; № 2814593 С1).

Теоретическая и практическая значимость работы. При проведении молекулярно-генетических и микробиологических исследований получены новые данные по маркерам патогенности токсигенных кишечных палочек, выделенных от телят и поросят. Определено влияние экзотоксинов кишечной палочки на механизмы развития эшерихиозной инфекции. Изучено влияние инаktivированных форм кишечной палочки на факторы врожденного и приобретенного иммунитета у животных. Теоретически обосновано и практически подтверждено влияние адъювантов различной природы на иммуногенные свойства инаktivированных экзометаболитов кишечной палочки. Были разработаны опытные образцы биопрепаратов на основе экзотоксинов кишечной палочки в сочетании с адъювантами для профилактики эшерихиоза и определены оптимальные схемы иммунизации крупного рогатого скота и свиней, позволяющие воздействовать на механизмы иммунитета у подопытных животных.

Разработаны три инструкции по ветеринарному применению: колианатоксина с бактериальным липополисахаридом и полиакриловой кислотой в качестве адъювантов; колианатоксина с минерально-масляным адъювантом; ассоциированной вакцины против эшерихиоза, стрептококкоза и энтерококковой инфекции телят и поросят.

Результаты диссертационного исследования внедрены в учебную и научно-исследовательскую работу девяти аграрных вузов России: Кубанский ГАУ, Ставропольский ГАУ, Чувашский ГАУ, Волгоградский ГАУ, Уральский ГАУ, Оренбургский ГАУ, Башкирский ГАУ, Нижегородский ГАУ, ГАУ Северного Зауралья.

Результаты научных исследований были внедрены в скотоводческих и свиноводческих хозяйствах Краснодарского края: УОХ «Кубань» г. Краснодара, НПХ «Кореновское» (филиал ФГБНУ «Национальный центр зерна имени П. П. Лукьяненко») Кореновского района, АО «Приазовское» Славянского района, что подтверждается 15 актами внедрения. Подготовлены методические рекомендации «Разработка и применение иммунобиологических препаратов на основе колианатоксина

и адьювантных композиций» и «Профилактика смешанных острых кишечных инфекций телят и поросят», одобренные Ученым советом ФГБНУ «Северо-Кавказский научно-исследовательский ветеринарный институт – филиал ФГБНУ ФРАНЦ» (протокол № 8 от 13.08.2024).

Научно-исследовательская работа также выполнялась в рамках реализации проекта НИР по заказу Минсельхоза России в 2019 г. – «Исследование механизмов активации врожденного иммунитета под влиянием инактивированных токсинов кишечной палочки» (грант РФФИ и Администрации Краснодарского края № 19-416-233007 (конкурс р_мол_а), регистрационный № НИОКТР АААА-А19-119051490179-1).

Методология и методы исследований. За методологическую основу при выполнении исследований брали научные труды отечественных и зарубежных ученых по теме диссертационной работы в области ветеринарии, биотехнологии, токсикологии и фармакологии вакцинных препаратов для скотоводства и свиноводства. При выполнении научных исследований использовались микробиологические, молекулярно-генетические, фармакологические, токсикологические, физиологические, экономические и статистические методы.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Распространение и характеристика циркулирующих на фермах Краснодарского края возбудителей эшерихиоза и других острых кишечных инфекций.

2. Взаимосвязь генетических, адгезивных и токсигенных свойств *E. coli*, изолированных от телят и поросят.

3. Влияние экзотоксинов *E. coli* на гематологический и иммунологический статус лабораторных животных, а также клинические и гистопатологические изменения при экспериментальной эшерихиозной инфекции.

4. Влияние колианатоксина на гематологический статус, на фагоцитарную и микробицидную активность нейтрофильных гранулоцитов.

5. Изучение иммуногенных свойств колианатоксина, изменяющихся при помощи адьювантов.

6. Иммунологические свойства препаратов на основе колианатоксина в сочетании с бактериальным липополисахаридом и полиакриловой кислотой и колианатоксина с минерально-масляным адьювантом.

7. Влияние ассоциированной вакцины против эшерихиоза, стрептококкоза и энтерококковой инфекции на иммунный статус телят и поросят.

8. Экономическая эффективность применения препаратов у крупного рогатого скота и свиней.

Степень достоверности полученных результатов подтверждается использованием большого количества лабораторных и сельскохозяйственных животных, подбором пар-аналогов по возрасту, породе и живой массе контрольных и опытных групп, значительным объемом

микробиологических, генетических, гематологических, иммунологических и токсикологических методов исследования. Для экспериментальных работ использовано верифицированное оборудование, позволяющее получать воспроизводимые результаты. Применены современные методы сбора и обработки исходной информации, в том числе с применением методов математической статистики и экономического анализа.

Апробация работы. Материалы диссертационной работы были доложены, обсуждены и одобрены на ежегодных научных конференциях ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ (Краснодар, 2017–2024); на международных научно-практических конференциях (Екатеринбург, 2010; Краснодар, 2011, 2019, 2024; Красноярск, 2021, 2023; Уссурийск, 2021; Санкт-Петербург, 2023; Karshi, 2023, 2024); на XXVII Международной научно-производственной конференции (Майский, 2023); всероссийских (национальных) конференциях (Краснодар, 2016, 2019, 2021; пос. Персиановский, 2019; Воронеж, 2019; Брянск, 2020).

Материалы диссертационной работы стали базовыми в реализации конкурсных проектов, которые были отмечены дипломом и золотой медалью на выставке «Агрорусь – 2023», дипломом и серебряной медалью на XXV Российской агропромышленной выставке «Золотая осень 2023», дипломом и золотой медалью на XXVII Московском международном Салоне изобретений и инновационных технологий «Архимед 2024».

Публикации результатов исследований. По материалам диссертационной работы опубликовано 76 научных работ, в том числе 24 – в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки России, 6 – в международной базе данных Scopus. Изданы две методические рекомендации; две монографии. Получено 14 патентов РФ на изобретение.

Объем и структура диссертации. Диссертационная работа включает в себя следующие разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследований, заключение, список сокращений, список использованной литературы и приложения. Работа представлена на 420 страницах машинописного текста, содержит 63 таблицы, 58 рисунков, а также включает 50 приложений. Список использованной литературы содержит 485 источников, из которых 240 принадлежат иностранным авторам.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнялась в период с 2008 по 2024 гг. в ФГБОУ ВО «Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина» на кафедре биотехнологии, биохимии и биофизики. Исследования по изучению влияния инактивированных токсинов кишечной палочки на иммунную систему лабораторных животных проводили на кафедре

микробиологии, эпизоотологии и вирусологии университета. Изучение и подбор адьювантных комплексов, повышающих иммуногенные свойства колианатоксина, выполняли в лаборатории микробиологии Центра биотехнологий ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ. Гистологические исследования проводили в патоморфологическом отделе Краснодарской межобластной ветеринарной лаборатории. Экспериментальная часть исследований выполнена в скотоводческих и свиноводческих хозяйствах Краснодара и Краснодарского края: УОХ «Кубань», НПХ «Кореновское» (филиал ФГБНУ «Национальный центр зерна им. П. П. Лукьяненко») Кореновского района, АО «Приазовское» Славянского района. Схема исследований представлена на рисунке 1.

В работе использовали токсигенные штаммы *E. coli* KubGAU B-533 (O141:K99, LT, ST-II и HLY E), KubGAU B-546 (O111:F41, RTX α -гемолизин, LT, ST-II и HLY A, Д, E), KubGAU B-923 (O26:K99, Stx2e, RTX α -гемолизин, SUB AB5, колицин V и HLY E), KubGAU B-933 (O157:K88, Stx2e, RTX α -гемолизин, SUB AB5, и HLY A, Д, C, E).

Статистическим материалом для исследования распространения эшерихиоза среди телят и поросят служили данные ветеринарной отчетности государственного бюджетного учреждения ГБУ «Кропоткинская краевая ветеринарная лаборатория» в ретроспективе по годам (с 2008 по 2023 гг.). Изучение эпизоотической ситуации проводили с использованием методов сравнительно-географического и эпизоотологического анализа, а также данных лабораторных исследований.

Бактериологические исследования осуществляли согласно «Методическим указаниям по бактериологической диагностике смешанных кишечных инфекций» (Москва, 2000). Видовую идентификацию возбудителей острых кишечных болезней проводили с использованием метода MALDI-TOF MS на спектрометре VastoSCREEN при помощи прилагающегося программного обеспечения (Литех, РФ). Наличие гемолитической активности (ГА) определяли на агаре Хоттингера с добавлением 7 % крови барана, но без добавления глюкозы. Адгезивную активность микроорганизмов определяли по В.И. Брилис с соавт. (1986) с использованием нативных эритроцитов кроликов. Величину адгезивной активности оценивали по индексу адгезии микроорганизмов (ИАМ). Обнаружение фимбрий общего типа (I тип, F1, MS пили) проводили с помощью манозочувствительной реакции геммагглютинации с эритроцитами морской свинки. Антилизозимную активность (АЛА) выявляли на твёрдой питательной среде по А.В. Бухарину с соавт. (1984). Способность продуцировать экзотоксины выявляли в тесте отека лапы мыши используя 48 ч бульонные культуры, которые предварительно стерилизовали центрифугированием при 8000 об./мин в течение 60 мин.

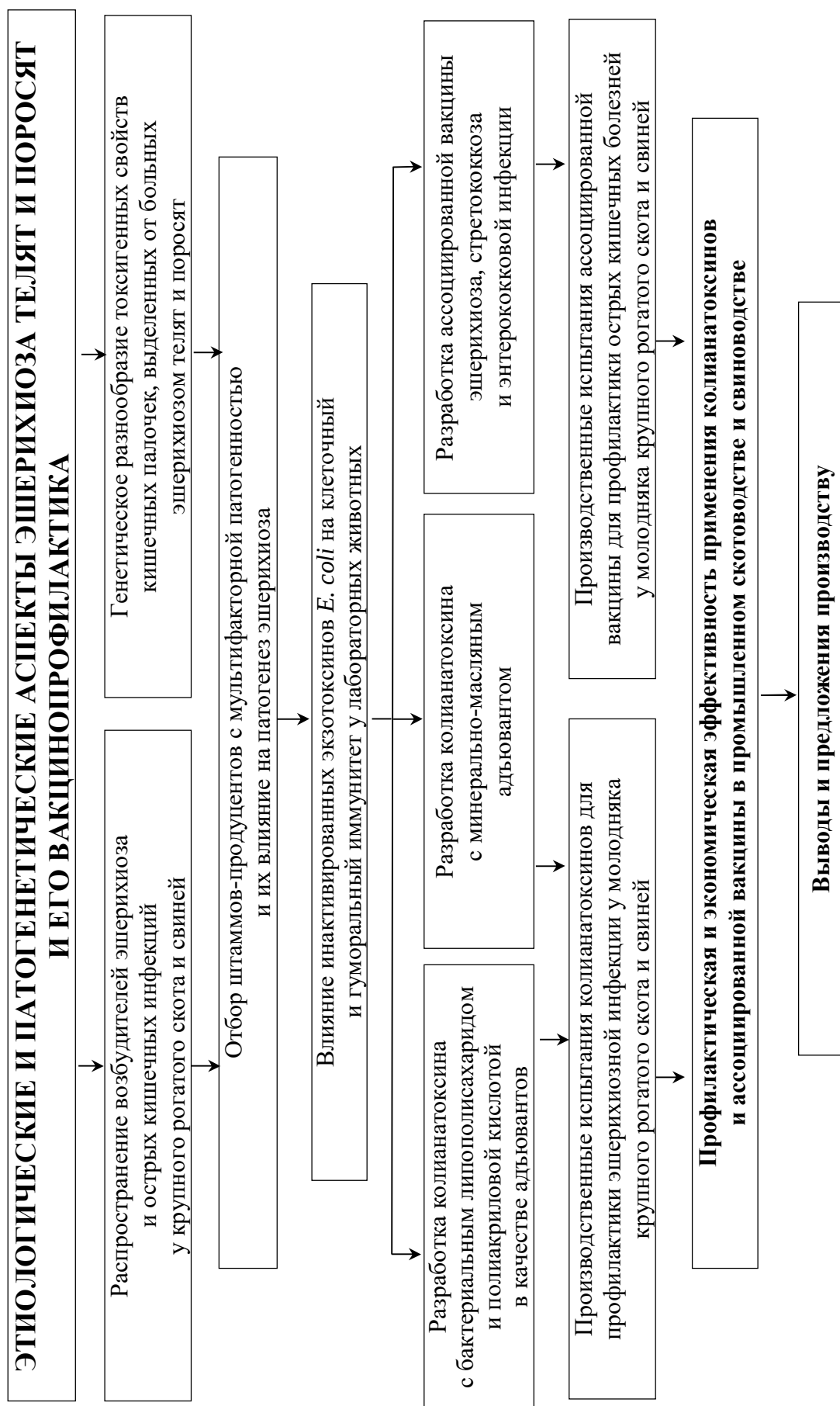


Рисунок 1 – Схема исследований

Наличие генов патогенности эшерихий для выявления специфических участков ДНК генов шигатоксина I типа (STX1), шигатоксина II типа (STX2) энтерогеморрагических *E. coli*, термостабильного (ST-I и ST-II) и термолабильного (LT) энтеротоксинов энтеротоксигенных *E. coli* были использованы тест-системы АмплиСенс Эшерихиозы-FL диареегенные *E. coli* (Москва). Обнаружение фимбрий проводили с помощью манозо-независимой реакции гемагглютинации (РГА). Вид специфического адгезина устанавливали с помощью адгезивных кописывороток в реакции агглютинации.

При помощи метода ПЦР исследовали образцы на продуцирование следующих токсинов: ST-I и ST-II, STX 1 и 2. Проводили анализ с помощью специфичных праймеров, синтезированных компанией ЗАО «Евроген» (Москва). ПЦР проводилась в амплификаторе C1000 Touch 96 («Bio-Rad», США). Для определения нуклеотидной последовательности геномов исследуемых образцов *E. coli* были подготовлены библиотеки с помощью набора DNA Preparation (M) Tagmentation Kit («Illumina Inc», США). Необходимую концентрацию библиотек подбирали в соответствии с показателями флуориметра Qubit. Полногеномное секвенирование проводили при помощи аппарата MiSeq («Illumina Inc», США).

Оценка токсигенности кишечной палочки проводилась с использованием метода биотестирования, в котором применялись инфузории рода *Stylonychia mytilus* [Терехов В.И., 2005]. Для оценки активности экзотоксинов кишечной палочки были применены два экспериментальных подхода: тест отека мышиной лапы и тест на мышцах-сосунках по В.И. Моргуновой с соавт. (1995). Тестирование штаммов на выявление шигатоксинов проводили коммерческой тест-системой RIDASCREEN VEROTOXIN (Германия).

Для изучения влияния токсических экзометаболитов *E. coli* на гематологические показатели и уровень цитокинов в сыворотке крови использовали белых крыс линии Вистар массой 175 ± 10 г, которым однократно внутрибрюшинно вводили заранее установленную сублетальную дозу (1,8 мл) культуральной среды, содержащей тот или иной вид токсинов. Через 3, 6, 12, 24 ч после введения центрифугатов (фильтратов) культуральных сред у крыс осуществляли отбор крови. Для определения гематологических показателей использовали гематологический автоматический анализатор URIT-5160 Vet (Medical Electronic Co., Китай).

Цитокиновый профиль оценивали по содержанию в сыворотке крови интерлейкина-2 (ИЛ-2), интерлейкина-6 (ИЛ-6), интерлейкина-10 (ИЛ-10) и фактора некроза опухоли альфа (ФНО- α) с использованием иммуноферментных тест-систем для определения уровней цитокинов в сыворотке крови (АО «Вектор-Бест-Юг», Ростов-на-Дону) и иммуноферментного анализатора FlexA-200 (Allsheng, Китай).

Оценку клинических и патогистологических изменений проводили на десяти 1,5–2-месячных кроликах со средней живой массой 650 ± 30 г путем экспериментального воспроизведения эшерихиозной инфекции.

Для получения колианатоксина штаммы *E. coli* KubGAU B-533, KubGAU B-546, KubGAU B-923 и KubGAU B-933 по отдельности засеивали в пробирки с 10 мл питательной средой для накопления токсинов кишечной палочки [Терехов В.И., 2008], затем в колбы объемом 250 мл. Периодическое культивирование и инактивацию штаммов эшерихий проводили в биореакторе с мешалкой объемом 100 л.

Определение в сыворотке крови животных специфических антитоксических антител осуществляли и интерпретировали в реакции непрямой гемагглютинации (РНГА) в разработанном нами эритроцитарном диагностикуме [Терехов В.И. и др., 2012].

Определение среднелетальной дозы ($ЛД_{50}$) смеси токсинов *E. coli* и протективные свойства колианатоксина проводили в опыте на белых мышах массой 18–20 г по методу Кербера.

Для изучения показателей крови и функциональной фагоцитарной активности после воздействия колианатоксином нами были отобраны 30 белых крыс, которых разделили на три группы, по 10 животных в каждой. Показатели крови у крыс на 1, 3, 5 и 7-е сутки определяли с помощью автоматического анализатора Abacus Junior Vet производства DIATRON (Австрия). Фагоцитарную активность, состояние мобилизационной способности и микробицидной активности нейтрофильных гранулоцитов определяли, используя НСТ-тест [Нестерова И.В. и др., 1993].

В качестве адъювантов для колианатоксина использовали пирогенал (ГУ НИИЭМ им Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва) в дозе 100 мкг/мл (ЛПС), алюминия гидрат окиси коллоидный (ФГУП «Армавирской биофабрики») в 20 % концентрации (ГОА), полиакриловую кислоту (ПАК) в дозе 3 мг/мл и минеральное масло марки «Маркол-52» с эмульгатором маннида монаалеата – Монтанид (90 : 10) (МА) в 50 % концентрации. Также в опытах применяли МА, состоящий из эмульгатора (биологически инертное кремнийорганическое соединение цетил-ПЭГ/ППГ-10/1-диметикон) – 1,5 % и масляной основы – вакцинное масло «М» по ТУ 381011224 – 98,5 % (патент РФ № 2510845).

Влияние адъювантов на протективные свойства анатоксина изучали на белых мышах. Было сформировано семь групп по 10 животных в каждой. Через 7 дней после последнего введения препаратов произвели отбор крови для определения титров антител, для этих целей было отобрано по три животных из каждой опытной группы. Затем провели заражение оставшихся животных смесью токсинсодержащей безмикробной культуры *E. coli* штаммов KubGAU B-533, KubGAU B-546, KubGAU B-923 и KubGAU B-933 в раннее установленной $3 ЛД_{50}$ равной 0,129 мл

путем внутрибрюшинного введения. За животными наблюдали в течение 10 дней, учитывая количество павших и выживших в каждой группе.

Для определения оптимальной схемы иммунизации с целью обеспечения колострального иммунитета у новорожденных поросят и телят было сформировано 10 групп, в каждой из которых было по три супоросных свиноматки и по пять стельных коров, 9 групп были опытными и 1 контрольная. Свиноматок и стельных коров опытных групп иммунизировали КА с ЛПС и КА с ПАК в различных дозах. У свиноматок и коров через 7–10 дней после первой и 7–10 дней после второй вакцинации исследовали сыворотку крови на наличие специфических антитоксических антител. Пробы молозива и кровь у родившихся поросят и телят для исследования уровня колостральных антитоксических антител проводили в РНГА.

Для изучения иммуногенных свойств и профилактической эффективности Колианатоксина ЛПС+ПАК на крупном рогатом скоте и свиньях была поставлена серия опытов с формированием по методу пар-аналогов опытных и контрольных групп. Колианатоксин-ЛПС+ПАК при иммунизации стельных коров вводили подкожно 1-й раз за 30 дней до отёла в дозе 5 см³, 2-й раз за 15 дней до отёла в дозе 10 см³. Свиноматок иммунизировали первый раз за 30 дней до опороса в дозе 5 см³, второй раз – за 20 дней в дозе 5 см³ внутримышечно в область основания ушной раковины. Поросят иммунизировали дважды: первый раз в возрасте 14 дней в дозе 0,25 мл, а второй через 7 дней в дозе 0,5 мл внутримышечно в области внутренней поверхности бедра.

Для свойств иммуногенных свойств и профилактической эффективности Колианатоксина ГОА+МА и свиньях была поставлена серия опытов с формированием по методу пар-аналогов опытных и контрольных групп. Стельных коров иммунизировали Колианатоксином-ГОА+МА первый раз за 45 дней, второй раз за 15 дней до отёла в дозе 5 и 10 мл, подкожно в область верхней трети шеи. Свиноматок и полученных от них поросят иммунизировали Колианатоксином-ГОА+МА первый раз за 40 дней до опороса в дозе 5 мл, второй раз – за 15 дней в дозе 5 мл внутримышечно в область основания ушной раковины. Поросят иммунизировали дважды первый раз в возрасте 21 дня в дозе 0,25 мл, а второй – через 7 дней в дозе 0,5 мл внутримышечно в области внутренней поверхности бедра.

Для разработки ассоциированной вакцины против эшерихиоза, стрептококкоза и энтерококковой инфекции использовали депонированные штаммы патогенных *E. coli* (KubGAU B-533, KubGAU B-546, KubGAU B-923, KubGAU B-933) с уже известными свойствами и эпизоотические изоляты гемолитических вариантов *Streptococcus bovis* и *Enterococcus faecalis*.

При изучении иммуногенной активности и профилактической эффективности ассоциированной вакцины против эшерихиоза, стрептококкоза и энтерококковой инфекции стельных коров и нетелей прививали дважды подкожно: первый раз – за 30 дней, а второй раз – за 15 дней до отёла в дозе 5 и 10 мл соответственно; телят также вакцинировали дважды: первый раз – в возрасте 15–20 дней, а второй – через 10–15 дней в дозе 1 и 2 мл соответственно. Супоросным свиноматкам вакцину вводили внутримышечно дважды: первый раз – за 30 дней, а второй – за 20 дней до опороса в дозе 5 мл; поросят прививали также дважды: первый раз – в возрасте 15–17 дней, а второй – в возрасте 28–30 дней в дозе 0,25 и 0,5 мл соответственно.

Полученные результаты обрабатывали математическими и статистическими методами с определением степени достоверности по распределению Стьюдента с помощью компьютерной программы Microsoft Excel 2016. Экономическую эффективность определяли согласно методу Ю. Е. Шатохина с соавторами (1997) и В. А. Лазовского (2019).

3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Распространение эшерихиоза телят и поросят в Краснодарском крае

Установлено, что по проведенным лабораторным исследованиям эшерихиозная инфекция среди молодняка крупного рогатого скота и свиней в Краснодарском крае в течение последних 15 лет регистрировалась ежегодно. За период с 2008 по 2023 гг. от павших телят было доставлено 8802 образцов патологического материала. При бактериологическом исследовании, которого, получено 3576 (46,2 %) положительных результатов на эшерихиоз. От павших поросят было доставлено 3373 образцов патологического материала, в 1600 (47,4 %) случаях диагноз на эшерихиоз был подтверждён.

Наибольшее количество положительных проб на эшерихиоз у телят зарегистрировано в 2008 г. - 470 из 989 (47,5 %). У поросят наибольшее количество подтверждённых случаев эшерихиоза приходился на 2010 г. – 408 из 515 (79,2 %). Стоит отметить, что период с 2008 по 2014 гг. был самыми неблагоприятным в отношении эшерихиоза, как у телят, так и у поросят, когда в среднем каждый 2-й лабораторный анализ на эшерихиоз был положительным, а процент регистрации болезни достигал 58 %.

Изучение динамики регистрации эшерихиоза у телят показало, что за период с 2008 по 2023 гг. было два 7-летних периода с пиками в 2010 и в 2017 г., когда процент подтвержденных диагнозов на эшерихиоз составил 82,7 и 49,3 % соответственно. Промежуточными периодами, характеризовавшимися спадом и минимальным уровнем выявления возбудителя эшерихиоза, а, следовательно, подтверждения диагноза, были

2009 г. с уровнем положительных результатов в 41,2 %, 2012 г. - в 33,0 % и 2022 г. - в 20,3 %.

В динамике количества положительных результатов на эшерихиоз поросят выявлено четыре пика с интервалом от 2 до 6 лет - в 2010 г. (79,2 %), 2014 г. (42,4 %), 2016 г. (57,3 %) и 2022 г. (21,1 %).

Таким образом, эшерихиоз в крае имеет широкое территориальное распространение, болезнь диагностируется ежегодно, количество положительных результатов (подтверждений) находится в пределах 46,2–47,4 %. В динамике выявления болезни отчетливо просматривается ее волнообразный характер с пиками каждые 3–5 лет. Исходя из этого эпизоотический процесс при эшерихиозе телят и поросят в Краснодарском крае можно охарактеризовать как напряженный, отличающийся энзоотичностью и периодичностью.

3.2 Характеристика циркулирующих на фермах Краснодарского края возбудителей эшерихиоза и других острых кишечных инфекций

В ходе бактериологических исследований патологического материала было выделено и идентифицировано 1775 изолятов бактерий, в т. ч. 1299 изолятов от телят и 476 от поросят, которые принадлежали к шести семействам: *Enterobacteriaceae*, *Streptococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Alcaligenaceae*, *Alteromonadaceae*. Установлено, что доминирующее значение в нозологическом профиле выделенных бактерий принадлежит энтеробактериям, доля которых в общем пуле изолятов составила 70,1 % (1245 изолятов), в т. ч. доля энтеробактерий, выделенных от поросят составила 69,3 % (330 изолятов), а от телят – 70,4 % (915 изолятов). На втором месте по частоте выделения оказались энтерококки, доля которых составила 15,9 % (283 изолята), причем данные бактерии чаще всего выделялись от телят (18,8 %) нежели от поросят (8,5 %). На третьем месте по числу изолятов оказались стрептококки – 11,1 % (197 изолята), которые, напротив, чаще выделялись из патологического материала от поросят (19,5 %) нежели от телят (8,0 %). Таким образом, на территории Краснодарского края ведущая роль в развитии диарей у новорожденных телят и поросят принадлежит энтеробактериям (*E. coli*), энтерококкам (*E. faecium*, *E. faecalis*) и стрептококкам (*S. bovis*).

При изучении патогенного потенциала, возбудителей эшерихий и острых кишечных болезней установили, что способностью прикрепляться к биологическим поверхностям обладало подавляющее большинство (65,5–83,1 %) выделенных кишечных палочек и энтеробактеров, но активность прикрепления в среднем не превышала четырех бактериальных клеток на одном эритроците, что характеризует изучаемые энтеробактерии как среднеадгезивные. Большинство адгезинпозитивных штаммов было среди *E. coli*, у которых показатель адгезивности и ИАМ

составил 83,1 % и $3,98 \pm 0,31$ соответственно. MS пиями обладало 31,5 % изолятов эшерихий и 25,5 % энтеробактеров. Данное обстоятельство может свидетельствовать о том, что в процессе прикрепления изучаемых энтеробактерий к эукариотической клетке доминирующую роль могут играть не MS пия, а другие факторы адгезии, в т. ч. нефимбриального происхождения.

АЛА обладали практически все тестируемые штаммы энтеробактерий. Наибольшей способностью нейтрализовывать лизоцим обладали эшерихии, АЛА которых была 3,38 мкг/мл. Наиболее выраженными гемолитическими свойствами обладали *E. coli*, штаммы которых в 42,7 % случаях обладали способностью разрушать эритроциты барана. В подавляющем большинстве случаев выделенные от телят тестируемые энтеробактерии давали α -гемолиз. Количество токсинообразующих штаммов из числа тестируемых *E. coli* было достаточно большим и находилось в пределах 43,8 %.

Фимбриальными факторами адгезии обладали 63 % изолятов эшерихий, в т. ч. 25,9 % имели фимбрии только 1 типа, 27,4 % – только 2 типа, 9,6 % – имели одновременно фимбрии 1 и 2 типа и 13,5 % изолятов содержали одновременно известные (K99, K88, 987F, F41 и A20) специфические фимбрии двух видов и такое же количество с неустановленным типом фимбрий. Установлено, что от телят в большинстве случаев выделяется *E. coli* с пилевым антигеном A20 (37,5 %) и K99 (25 %), а от поросят – K88 (42,9 %) и 987P (19,0 %). В меньшей степени выделяются эшерихии с фимбриальным адгезином F41, как у поросят (9,5 %), так и у телят (6,3 %).

На основании проведенных генетических исследований все тестируемые изоляты, обладающие маркерами токсинов, были разделены на восемь патовариантов: 1) обладающий только геном LT; 2) только геном ST-I, II; 3) только геном STX 2; 4) только геном STX 1, 2; 5) генами LT, ST-II; 6) генами LT, STX 1, 2; 7) генами LT, ST I, STX 2; 8) генами LT, ST-I и II, STX 2. От поросят были выделены семь патовариантов, а от телят - пять. От поросят ни разу не выделялся патовариант с генами STX 1 и 2. От телят ни разу не выделялись два патоварианта - LT, ST-II и LT, ST-I, ST-II, STX 2.

Наиболее часто регистрировали *E. coli* с геном LT (50,0 %), из них в 30,9 % случаях они выделялись от поросят и в 19,1 % от телят. Вторым по частоте встречаемости был патовариант с геном STX 2, он был обнаружен в 23,5 % случаев, из них в 17,6 % у эшерихий, выделенных от поросят и 5,9 % от телят. В 8,8 % случаях встречался патовариант с генами LT, STX 1 и 2, который в подавляющем большинстве случаев был изолирован от телят.

Следует отметить тот факт, что как от поросят, так и телят выделялись изоляты, обладающие сразу несколькими маркерами токсинов, та-

кими как LT, ST и STX. Их было не много, всего 4,4 %, однако важен сам факт их наличия, поскольку он свидетельствует о возможности появления особых патотипов эшерихий, которые способны вызывать заболевания (диарею) у широкого круга биологических объектов.

Взаимосвязь между наличием гена токсина и специфических фимбрий прослеживалась у изолятов *E. coli* с наличием адгезинов и маркера LT. Так, среди адгезинпозитивных изолятов было 60,5 % обладающих геном термолабильного токсина, в то время как среди адгезиннегативных таких было 36,7 %. В тоже время обратную ситуацию наблюдали у адгезиннегативных *E. coli*, которые в 2 раза чаще, чем адгезинпозитивные, обладали маркером STX 2 типа. По всей вероятности, данное обстоятельство может свидетельствовать о том, что для реализации STX 2 в большей степени принимают участие нефимбриальные факторы адгезии.

На следующем этапе была проведена генетическая характеристика штаммов-кандидатов для производства колианатоксина, обладающие сразу несколькими маркерами токсинов.

Результаты аннотации прокариотических геномов показали наличие в геномах бактерий последовательностей, кодирующих продуцирование следующих токсинов: KubGAU B-923 и KubGAU B-933 – шига-токсин Stx2e видов A и B, KubGAU B-533 и KubGAU B-546 – термолабильный энтеротоксин LT видов A и B, термостабильный энтеротоксин ST-II. При анализе результатов полногеномного секвенирования изучаемых изолятов *E. coli* было установлено, что наряду с общеизвестными маркерами токсигенности в виде LT, ST и STX токсинов, они обладали генами цикломодулинов (субтилазный токсин) и пороформирующих токсинов: колицинов, α -гемолизина и гемолизина E.

В результате секвенирования и сборки геномов были получены проекты геномов с размерами 5 274 955 п.н (KubGAU B-533), 5 109 654 п.н (KubGAU B-546), 5 271 013 п.н (KubGAU B-923), 5 276 368 п.н (KubGAU B-933). Образцы были депонированы в базу данных NCBI под общим номером BioProject PRJNA887444. Также указанные штаммы были депонированы в государственной коллекции патогенных микроорганизмов и клеточных культур «ГКПМ-Оболенск» под номерами B-15569, B-15570, B-15571, B-15572.

3.3 Получение, индикация экзотоксинов *E. coli* и их влияние на гематологический и иммунобиологический статус животных

Для выявления фенотипических способностей исследуемых штаммов эшерихий была подтверждена реализация генов экзотоксинообразования. При этом, тестированием на стилонихиях удалось выявить их общую токсичность для биообъектов. В плантарном тесте на белых мышах, специфичном для выявления термолабильного токсина, установили действительно его продукцию штаммами KubGAU B-533 и KubGAU B-546. Ре-

зультатами определения коэффициента расширения тонкого отдела кишечника у белых мышей установили способность штамма KubGAU B-546 продуцировать в большей степени термостабильный экзотоксин. С помощью иммуноферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем RIDASCREEN VEROTOXIN подтвердили способность штаммов KubGAU B-923 и KubGAU B-933 продуцировать STX токсины.

На следующем этапе изучили влияние экзотоксинов на гематологический и цитокиновый профиль животных. Результаты исследований показали, что наиболее глубокие изменения происходили у животных, которым вводили смесь токсинов, что проявлялось не только лимфоцитопенией и нейтрофилией, но и моноцитозом и эозинофилией, что свидетельствует о развитии инфекционного токсико-аллергического процесса. Эритропения и тромбоцитопения сопровождалась падением уровня гемоглобина и гематокрита, что характерно для гемолитической анемии. Наиболее выраженные изменения со стороны красных кровяных телец были зафиксированы спустя 24 ч после введения токсинов. Особенно они были выраженными у животных, которым вводили шигаподобный токсин и смесь токсинов.

Сравнивая характер цитокинового ответа на введение различных токсинсодержащих материалов установлено, что в меньшей степени он выражен у животных, которым инъецировали культуральную среду, содержащую в основном цитотонические токсины (ST, LT) и гемолизины. В большей степени по величине и продолжительности цитокинового выброса характеризовался иммунный ответ у животных, которым ввели культуральную среду шигатоксинпродуцирующей *E. coli*. Но особенно мощным выброс провоспалительных цитокинов (ИЛ-6 и ФНО- α) произошёл у крыс, которым ввели смесь культуральных сред токсигенных штаммов *E. coli*. Данное обстоятельство является доказательством того, что продуцируемые кишечной палочкой экзотоксины в своей совокупности могут усиливать свое патогенное действие на макроорганизм и это действие проявляется не только нарушением функции кишечного тракта, но и поражением других органов, вызывая в них воспалительные и дегенеративные изменения.

3.4 Клинические и патоморфологические изменения у животных после введения им смеси токсинов *E. coli*

После ректального введения кроликам смеси токсинов к особенностям клинического проявления следует отнести сочетание диарейного и невралгического синдрома. Причем развитие профузного поноса было аналогичным тому, который развивается у поросят в постотъемный период, а невралгический синдром напоминал аналогичный при отёчной болезни и при энтеропатогенном эшерихиозе у телят.

При патологоанатомическом исследовании у павших кроликов обнаружены следующие изменения: слизистая оболочка желудка в фун-

дальной части была набухшая и покрыта обилием слизи, тонкий и толстый отделы кишечника на всем их протяжении были вздуты, воспалены, отёчны, наполнены водянистым химусом. Слизистая оболочка толстого отдела кишечника местами была набухшая, покрыта слизью и усеяна множеством петехиальных кровоизлияний, а серозный и мышечный слои пропитаны студневидным экссудатом. Лимфатические узлы брыжейки местами были увеличены в размере, имели плотную консистенцию и серо-желтый цвет. Печень была увеличена в размере, плотной консистенции, имела тупые края и окрашена в темно-вишневый цвет, у некоторых трупов печень была дряблой с неравномерной окраской, что свидетельствовало о наличии токсической дистрофии. Селезенка незначительно увеличена в размере с закругленными краями, темно-вишневого цвета, плотной консистенции. Почки также были незначительно увеличены в размере, плотной консистенции, темно-вишневого цвета с поверхности и на разрезе, рисунок между корковым и мозговым слоями сглажен. В легких наблюдали обширный отек с участками ателектаза. Сердце увеличено в размере, дряблой консистенции.

Патоморфологические изменения были гораздо более разнообразными и свидетельствовали о развитии различных патологических процессов, таких как дистрофия, атрофия, некроз, гиперемия, стаз, воспаление. При этом основными мишенями были не только эпителиальные клетки всего желудочно-кишечного тракта, но и почечный и альвеолярный эпителий, гепатоциты, мышечная ткань сердца и ткань головного мозга, т. е. развивается полиорганный патологический процесс. Данная клиническая и патологоанатомическая картина свидетельствует о значительно более тяжёлом патологическом процессе, чем при эшерихиозе, обусловленном отдельными патотипами (токсинами) *E.coli*.

3.5 Получение и биологические свойства колианатоксина

Маточные культуры *E. coli* (KubGAU B-533, KubGAU B-546, KubGAU B-923, KubGAU B-933) готовили путем инокуляции штаммов в колбу Эрленмейера объемом 250 мл, содержащую 100 мл авторской питательной среды. Колбы инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 24 ч. Периодическое культивирование и инактивацию штаммов эшерихий проводили в биореакторе с мешалкой объемом 100 л, который был оснащен системой термостатирования, 6-лопастной турбиной Раштона и системами контроля температуры и pH. Штаммы, продуцирующие термолабильный и термостабильный токсины, культивировали 6 сут, а продуцирующие шигаподобный токсин – 7 сут. Перед окончанием инкубирования отобрали по 10 мл культуральной жидкости, центрифугировали при 10 тыс. об./мин в течение 30 мин и серологическими методами определяли наличие токсинов. Для этой работы использовали РДП с анти LT- и анти ST-сыворотками.

После подтверждения наличия токсинов в культуры добавили формалин до концентрации 0,3–0,4 %. Инактивацию проводили в течение 14 сут при температуре 37 °С, ежедневно дважды культуры взбалтывали. После завершения инактивации равные объемы культур объединяли, получив, таким образом, комплексный препарат, содержащий экзотоксины эшерихий. С помощью стерилизующей фильтрации отделили микробную массу от среды культивирования. Готовый препарат в асептических условиях расфасовывали в стерильные флаконы и укупоривали. Полученный колианатоксин проверяли на стерильность, безвредность, иммуногенность и протективную активность.

При контрольных высевах анатоксина на МПА, МПБ, среду Кит-Тароцци, Сабуро, Эндо рост бактериальной и грибной флоры отсутствовал, что свидетельствовало о стерильности препарата.

При внутрибрюшинном введении анатоксина в дозе 0,3 мл белым мышам массой 20–22 г, угнетения и гибели их в течение 10 дней не отмечали, что является показателем безвредности препарата.

В опыте на белых крысах установили, что в ответ на введение антигенного материала у животных всех групп уже спустя 24 ч появились специфические антитела к эшерихиозным токсинам. Уровень их накопления быстро нарастал, но уже спустя 7 дней было зафиксировано их снижение, а, следовательно, прекращение антигенного раздражения иммунокомпетентных клеток. В ответ на введение колианатоксина уровень специфических антител был в 1,2–1,8 раза более высоким, чем на введение моноанатоксинов, что можно объяснить потенцирующим действием ST, LT и STX между собой и лучшим распознаванием этого комплекса клетками иммунной системы.

Испытание протективных свойств КА проводили на белых мышах массой 20–22 г. Установили, что объем токсинов обуславливающий минимальную гибель мышей составляет 0,0125 мл. При введении мышам токсинов в объеме 0,1 мл погибли все мыши. На основании полученных данных была рассчитана среднелетальная доза смеси токсинов *E. coli* (LD₅₀), которая составила 0,043 мл. На следующем этапе животным анатоксин ввели подкожно двукратно с интервалом в 7 дней в дозе 0,1+0,1 мл. Заражение подопытных мышей провели спустя 7 дней после последнего введения анатоксина. Для заражения использовали фильтрат бульонных культур токсигенных *E. coli* в дозе 2 LD₅₀. Установили, что после иммунизации животных колианатоксином у них в 70 % случаев формируется специфическая невосприимчивость к патогенному действию токсинов эшерихий.

В результате проведенных гематологических исследований было установлено, что колианатоксин вызывает заметные изменения в картине крови у животных, проявляющиеся первоначально в течение 24 ч относительным эритроцитозом, лейкоцитозом, нейтрофилией и лимфопенией. В последующем основные события разворачиваются исклю-

чительно в лейкоцитарном пуле. Расчет лейкоформулы показал, что лейкоцитоз обусловлен в основном за счет увеличения в крови количества лимфоцитов, хотя количество нейтрофильных гранулоцитов по прежнему оставалось высоким. Эти изменения могут свидетельствовать о том, что первая фаза иммунного ответа в виде активизации системы фагоцитоза завершается к 72 ч, а затем начинала реализовываться эффекторная стадия иммунного ответа, проявляющаяся в виде увеличения количества лимфоцитов – клеток, непосредственно участвующих в регуляции иммунного ответа и выработке антител.

При изучении системы фагоцитоза установили, что колианатоксин оказал стимулирующее влияние на функциональную активность нейтрофилов (рисунок 2а). По отношению к интактным животным, у подопытных спустя 24 ч после введения достоверно увеличилась фагоцитарная активность нейтрофилов (ФАН), количество захваченных одним активным нейтрофилом бактерий и индекс заверченного фагоцитоза (ИЗФ). Показатель ФАН по отношению к интактным животным у них увеличился на 36,9 %, фагоцитарное число (ФЧ) – в 4,2 раза, переваривающая способность – на 5 %, ИЗФ – в 1,4 раза. Через 72 ч отмечали достоверное повышение переваривающей способности нейтрофилов, так у животных первой группы этот показатель увеличился на 13,8 %. Такая же тенденция сохранилась спустя 120 ч после введения колианатоксина, но оставались достоверно более высокими по отношению к интактным животным.

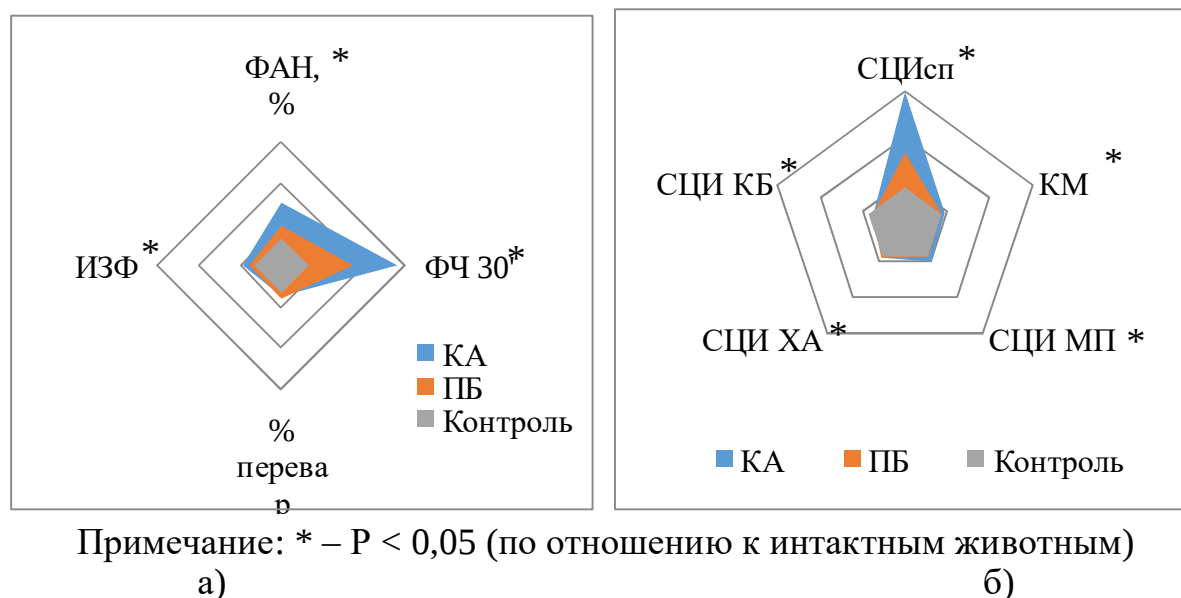


Рисунок 2 – Динамика функциональной активности нейтрофилов у белых крыс ($n = 10$) через 24 ч после введения субстратов:
а) фагоцитарной; б) микробицидной

Результаты эксперимента продемонстрировали, что введение как колианатоксина, так и питательного бульона в значительной степени

оказывали стимулирующее влияние не только на захватывающую способность нейтрофильных гранулоцитов, но и их микробицидную систему (рисунок 2б). Об этом в первую очередь свидетельствуют такие показатели как средний цитохимический индекс (СЦИ_{сп}) и коэффициент мобилизации (КМ), которые у крыс первой группы увеличились в 16 и 1,6 раза соответственно. Активация микробицидной системы нейтрофилов у животных первой группы произошла в основном за счет кислородзависимых механизмов, в частности миелопероксидазы (СЦИ_{МП}), индекс которой увеличилась в 2 раза по сравнению с интактными животными. В тоже время цитохимический индекс катионных белков (СЦИ_{КБ}) у животных, которым вводили колианатоксин снизился в 3,7 раза по сравнению с аналогичным показателем у интактных животных, что вероятно свидетельствует о блокировании этой микробицидной системы при процессинге растворимых антигенов.

Через 72 ч после введения колианатоксина миелопероксидазная кислородзависимая микробицидная система у крыс была более активна, что указывает на более выраженный и продолжительный стимулирующий эффект инактивированных токсинов кишечной палочки на нейтрофилы. В то время, как СЦИ хлорацетатэстеразы (СЦИ_{ХА}) нейтрофилов у животных первой группы увеличился на 15,4 %. Из этого следует полагать, что через 72 ч после введения колианатоксина основная антигендеградирующая функция переходит от кислородзависимых механизмов к кислороднезависимым, а именно к хлорацетатэстеразе – химотрипсин-подобному ферменту, который и обеспечивает протеолитическую и переваривающую активность нейтрофилов.

Через 120 ч СЦИ_{сп} был выше в 9,2 раза, СЦИ_{МП} – в 1,8 раза, СЦИ_{ХА} – в 1,3 раза, а СЦИ_{КБ} приблизился к таковому у интактных животных. Несмотря на то, что спустя 168 ч после введения колианатоксина показатели ферментативной системы у подопытных животных практически сравнялись с показателями интактных животных, тем не менее, метаболическая активность нейтрофилов у экспериментальных животных все еще была выше, чем у контрольных. Данное обстоятельство свидетельствует о значительном стимулирующем действии колианатоксина на систему врождённого иммунитета и его потенциальном использовании в качестве биопрепарата.

3.6 Повышение иммуногенных свойств колианатоксина

В своих исследованиях мы опробовали в качестве адъювантов для колианатоксина ГОА, полиакриловую кислоту (ПАК), липополисахарид (ЛПС) и минеральное масло (масляный адъювант, МА).

После двукратного введения КА с адъювантами установили, что у крыс, которым ввели КА с ЛПС и ПАК, через 7 дней после повторного введения уровень сывороточных антител увеличивался на 30–32,2 % по

сравнению со значениями титра, установленного в период максимального подъема (7 сут). Но через 14 дней у крыс из этих групп титр антител начал снижаться, хотя по-прежнему оставался достаточно высоким - 7,4 и 7,6 $\log_2$ соответственно. К 35 сут после повторного введения он находился в пределах 5,6–5,8 $\log_2$, что в 2,5–2,6 раза большим, чем в группе, где применялся анатоксин без адъювантов. У животных, которым инъецировали КА с ГОА через 7 дней после повторного введения уровень антител увеличился на 14 %, однако еще через 7 он увеличился еще на 15 %, таким образом, после первого введения рост титра антител произошел на 32 %. В последующем концентрация антитоксических антител у животных этой группы стала снижаться, достигнув величины 5,0 $\log_2$ к 35 дню. Интересными оказались данные, полученные по группе животных, которых дважды иммунизировали КА с МА. Оказалось, что в этой группе был получен самый высокий показатель прироста поствакцинальных антител. Так, через 7 дней зафиксировали его увеличение на 34,5 %, через 14 дней - на 37,9 %, а через 21 день - на 62,1 %. В последующие дни происходило снижение количества антител и к 35 дню после повторного введения КА с МА в сыворотке крови крыс титр специфических антител составил 7,0 $\log_2$. Это был самый высокий показатель по группам. При этом он превышал таковой по группе крыс, которым вводили КА без адъювантов в 3,2 раза.

При проведении исследований по влиянию адъювантов на протективные свойства колианатоксина двукратно иммунизированных мышей через 7 дней после последнего введения КА заразили смесью токсинов в объеме 3 LD₅₀ (0,129 мл). При этом для иммунизации использовали КА без адъювантов и с адъювантами – ЛПС и ПАК, так как именно эти адъюванты обеспечивали наиболее быстрое накопление антитоксических антител, чем ГОА и МА. При этом установили, что протективный эффект анатоксина зависит от адъюванта, дозы и кратности иммунизации. Однократная иммунизация не обеспечивает защиту животных. При этом повышение иммунизирующей дозы ведет к иммунобиологической толерантности. Между тем, использование КА с ЛПС и ПАК при двукратном введении в дозе 0,1 мл обеспечивает 100%-ю защиту белых мышей. У этих животных титр антитоксических антител достигал 7,2 и 6,8 $\log_2$ соответственно. После двукратной иммунизации мышей КА без адъювантов уровень специфических антитоксических антител достигал титра 4,8 $\log_2$. Это количество антител способно было обеспечить сохранность только 57,1 % зараженных животных. Следовательно, для того чтобы животные были защищены от токсинов *E. coli* у них в сыворотке крови должны быть антитоксические антитела в концентрации не менее чем 6,0–7,0 $\log_2$.

На следующем этапе иммуногенные свойства колианатоксина с адъювантами изучали на продуктивных животных – свиньях и крупном рогатом скоте. Двукратное введение свиноматкам КА в сочетании с адъювантами в дозе 5 мл приводило к выработке у них антитоксических антител, концентрация которых в сыворотке крови на 9,2–33,3 % была выше по сравнению с однократным введением и в 1,5–2 раза выше по сравнению с двукратным введением только КА. Тот уровень антител, который накапливается в молозиве свиноматок, двукратно иммунизированных в дозе 5 мл КА с ЛПС и ПАК, может обеспечивать защиту новорожденных поросят в течение первых пяти дней после рождения. В последующем колостральный иммунитет в отношении токсинов *E. coli* состоит, что предусматривает стимуляцию активного иммунитета посредством иммунизации поросят.

Двукратное введение коровам КА с ЛПС и ПАК способствовало увеличению на 9,7–19,2 % титра антитоксических антител в сыворотке крови по сравнению с однократным введением. При этом наиболее продуктивной оказалась схема иммунизации, предусматривающая двукратное введение КА в дозе 5 и 10 мл, в этом случае титр антител повышался на 5,3–8,3 % по сравнению с использованием КА в других дозах. Двукратное введение глубокопестельным коровам КА с ЛПС и ПАК в дозах 5 и 10 мл обеспечивает достаточно высокий уровень колостральных антител у телят и может обеспечить их защиту от токсинов *E. coli* не более 7 дней.

3.7 Повышение иммуногенности колианатоксина с помощью адъювантных композиций

Первой адъювантной композицией для колианатоксина была комбинация ЛПС+ПАК (фармацевтический препарат пирогенал (липолисахарид, выделенный из микробных клеток *Salmonella typhi*, производитель ФГБУ НИЦЭМ им Н.Ф. Гамалеи Минздрава России) в 0,01 % концентрации (раствор для внутримышечного введения 1 мл которого содержит 100 мкг действующего вещества) и 3%-й водный раствор полиакриловой кислоты (производство ООО Химдирект сервис, Москва)).

Двукратная иммунизация коров КА с ЛПС+ПАК способствовала увеличению выработки у них защитных клеток (таблица 1). Максимальное значение титра антител отмечали у животных в 3-й опытной группе – 8,8 log₂. У коров в опытных группах 1 и 2 эти значения находились в пределах 7,2–7,6 log₂. Следовательно, КА с ЛПС+ПАК сильнее стимулировал выработку антител у стельных коров, при этом оптимальной дозой можно считать 5 + 10 мл при двукратной иммунизации.

При изучении иммуногенности КА с ЛПС+ПАК на супоросных свиноматках установили, что после второй иммунизации у свиноматок 2-й и 3-й опытных групп количество иммуноглобулинов стало в пределах 8,3 и 8,6 log₂ соответственно (таблица 2). В молозиве у свиноматок уровень антитоксических антител был высоким. Так, животных опыт-

ных групп они составляли $8,6 \log_2$, $9,2 \log_2$ и $9,8 \log_2$ соответственно, при контрольных значениях $8,6$ и $8,8 \log_2$. Таким образом, двукратная иммунизация свиноматок КА с ЛПС+ПАК в дозе 5 мл была предпочтительней и стимулировала образование максимального количества антител.

Таблица 1 – Титр специфических антитоксических антител в сыворотке крови коров и полученных от них телят после иммунизации КА с адъювантами (n = 25)

Группа	Доза препарата, мл	Титр антитоксических антител, $\log_2$			
		Через 7 дней после 1-й иммунизации	Через 7 дней после 2-й иммунизации	Телята на 2-й день после рождения	Телята на 7-й день после рождения
1 (КА+ЛПС+ПАК)	3+5	$6,4 \pm 0,35$	$7,2 \pm 0,14$	$8,4 \pm 0,17^*$	$6,4 \pm 0,14^*$
2 (КА+ЛПС+ПАК)	5+5	$7,2 \pm 0,26$	$7,6 \pm 0,23$	$8,6 \pm 0,15^*$	$6,6 \pm 0,13^*$
3 (КА+ЛПС+ПАК)	5+10	$7,8 \pm 0,09^*$	$8,8 \pm 0,11^*$	$9,4 \pm 0,12^*$	$7,4 \pm 0,12^*$
4 (КА+ЛПС)	5+10	$7,4 \pm 0,14$	$8,2 \pm 0,24$	$6,6 \pm 0,18$	$5,8 \pm 0,12$
5 (КА+ПАК)	5+10	$7,1 \pm 0,21$	$7,6 \pm 0,14$	$6,4 \pm 0,23$	$5,5 \pm 0,11$

Примечание: * – статистическая достоверность различий по отношению к группам 4–5, $P < 0,05$.

В свою очередь, у телят в опытных группах на 2-й день после рождения титр антител оставался достаточно высоким и превышал значения контрольных групп. Максимальное количество защитных клеток было у животных 3-й опытной группы – $7,4 \log_2$ (рисунок 3а).

Таблица 2 - Титр специфических антитоксических антител в сыворотке крови и молозиве свиноматок после иммунизации КА с адъювантами (n = 25)

Группа	Доза препарата, мл	Титр антитоксических антител, $\log_2$		
		Через 7 дней после 1-й вакцинации	Через 7 дней после 2-й вакцинации	В молозиве на 1-й день после опороса
1 (КА+ЛПС+ПАК)	3+3	$7,0 \pm 0,18$	$7,6 \pm 0,15$	$8,6 \pm 0,06$
2 (КА+ЛПС+ПАК)	3+5	$7,1 \pm 0,15$	$8,3 \pm 0,16$	$9,2 \pm 0,08^*$
3 (КА+ЛПС+ПАК)	5+5	$7,6 \pm 0,04^*$	$8,6 \pm 0,07^*$	$9,8 \pm 0,07^*$
4 (КА+ЛПС)	5+5	$7,3 \pm 0,12$	$8,3 \pm 0,07$	$8,8 \pm 0,18$
5 (КА+ПАК)	5+5	$7,2 \pm 0,13$	$8,0 \pm 0,12$	$8,6 \pm 0,15$

Примечание: * – статистическая достоверность различий по отношению к группам 4–5, $P < 0,05$.

У родившихся поросят на 2-й день титр антител сохранялся в опытных группах в пределах $7,7$ – $8,6 \log_2$, в контрольных группах $7,2$ – $7,5 \log_2$ (рисунок 3б). На 14-й день у поросят 1 и 2 опытных групп произошло снижение уровня колострального иммунитета до $4,2$ и $5,4 \log_2$ соответственно. У животных 3-й опытной группы также

наблюдали снижение антител, но их уровень был самым высоким среди всех испытуемых – $6,3 \log_2$.

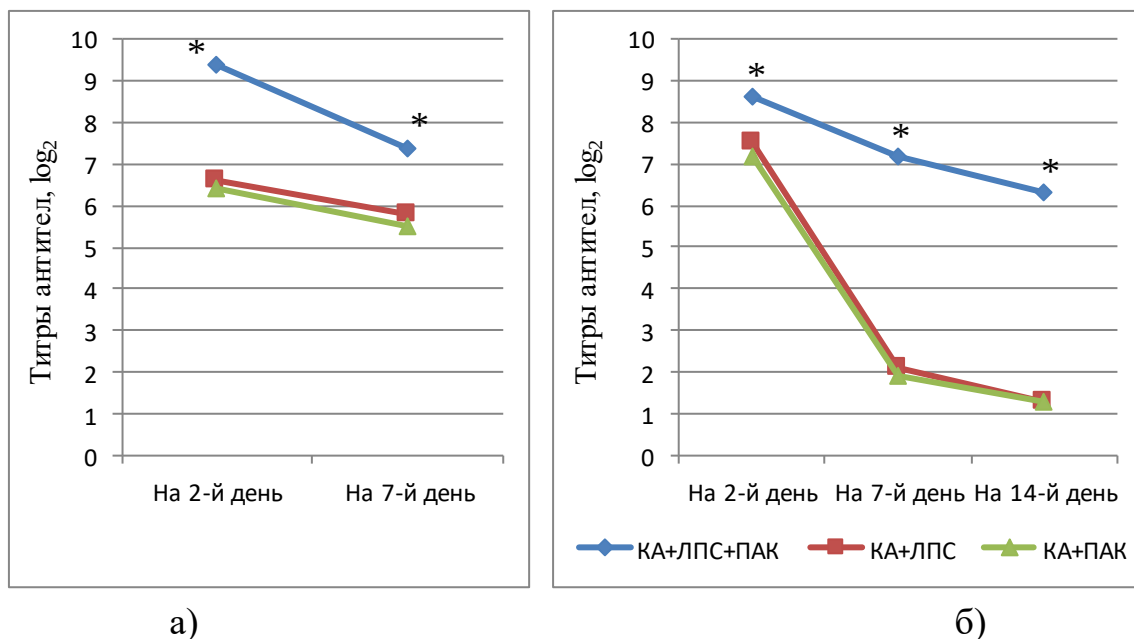


Рисунок 3 – Динамика накопления колостральных антител:
а) у телят; б) у поросят

(примечание: * – $P < 0,05$ по отношению к 2 и 3 группам животных)

Таким образом, КА с ЛПС+ПАК при двукратной иммунизации стельных коров в дозе 5+10 мл обеспечивает защиту телят от эшерихиозной инфекции в течение 7 дней после рождения. Двукратная вакцинация супоросных свиноматок в дозе 5 мл обеспечивает максимальное накопление антитоксических антител в сыворотке крови и молозиве, а у поросят количество колостральных антител сохранялся в защитных титрах до 14 дней.

Для профилактики отечной болезни необходимо было провести дополнительные исследования по применению колианатоксина с ЛПС+ПАК в схемах, включающих вакцинацию беременных животных и двукратную иммунизацию народившегося поголовья.

В результате установили, что иммунизация поросят в дозе 0,25 мл способствует накоплению антител до значения $7,2 \log_2$. При введении 0,5 мл (2 и 3 группа) количество иммуноглобулинов стало $7,8$ – $7,6 \log_2$ соответственно. Однако после второй иммунизации дозами 0,5 мл (1 и 2 группа) и 1 мл (3 группа) титр антител увеличился до $9,2 \log_2$, $8,2$ и $7,8 \log_2$ соответственно. Через 14 дней у поросят вакцинированных дозами 0,25+0,5 мл количество защитных клеток был максимальным – $8,6 \log_2$, при значениях в других группах (2-й и 3-й) – $7,2$ и $6,8 \log_2$. Через 28 и 56 дней количество антител снизилось, в 1-й группе до $7,4 \log_2$

и 5,8 log₂, во второй группе – до 6,2 и 4,8 log₂, в третьей – до 5,6 log₂ и 4,2 log₂ соответственно.

Таким образом, для профилактики отечной болезни у поросят следует их вакцинировать КА с ЛПС+ПАК через 14 дней после рождения в дозе 0,25 мл и ревакцинировать дозой 0,5 мл через 7 дней. При этом титр защитных антител сохраняется в течение 28 дней.

Результаты проведенных производственных испытаний на поголовье свиней и крупного рогатого скота показали, что профилактическая эффективность КА с ЛПС+ПАК достаточно высока. Сохранность у иммунизированных телят составила 100 %, при защитном эффекте в 92 %, а у поросят эти показатели были на уровне 96,4 и 84,5 % соответственно. Следовательно, серия препаратов на основе комплексного токсоидного компонента в сочетании с адьювантами – ЛПС и ПАК при иммунизации супоросных свиноматок и стельных коров обеспечивает профилактический защитный эффект в отношении эшерихиозной инфекции.

Второй адьювантной композицией для колианатоксина была комбинация ГОА и МА (2%-я суспензия AL(OH)₃ (ГОА) и масляный адьювант (МА).

При изучении влияния сочетания ГОА и МА на иммуногенность колианатоксина на крупном рогатом скоте установили (таблице 3), что иммунный ответ, обусловленный введением инактивированных токсинов *E. coli* и масляно-минерального адьюванта, был более выражен и продолжителен, чем использование адьювантов по-отдельности.

Таблица 3 – Титр специфических антитоксических антител в сыворотке крови коров и полученных от них телят после иммунизации КА с адьювантами (n = 25)

Группа	Титр антитоксических антител, log ₂			
	Через 7 дней после 1-й иммунизации	Через 7 дней после 2-й иммунизации	Телята на 2-й день после рождения	Телята на 7-й день после рождения
1 КА+ГОА+МА	5,8±0,15	7,7±0,17	8,2±0,14*	8,4±0,16
2 КА+ГОА+МА	6,2±0,16*	7,9±0,15*	8,4±0,18*	8,6±0,15*
3 КА+ГОА+МА	6,4±0,14*	8,2±0,14*	8,8±0,15*	9,2±0,14*
4 КА+ГОА	5,2±0,12	6,4±0,16	7,4±0,17	7,8±0,15
5 КА+МА	5,6±0,17	7,6±0,14	7,8±0,14	8,2±0,12

Примечание: * – статистическая достоверность различий по отношению к группам 4–5, P < 0,05.

После двукратной иммунизации КА с ГОА+МА стимулировал выработку антител у стельных коров, примерно в 1,1–1,3 раза. Титр антител у коров 1–3 опытных групп сохранялся в пределах 7,7–8,2 log₂ соответственно.

Влияние применения комбинаций адъювантов и инактивированных экзотоксинов эшерихий на титр антител у супоросных свиноматок представлены в таблице 4. Так, через 7 дней после повторной вакцинации уровень антител в контрольных группах находился в пределах $7,3\text{--}7,6 \log_2$, когда как в опытных $7,8\text{--}8,6 \log_2$. Такая тенденция сохранилась при исследовании молозивных антител у иммунизированных свиноматок. Вакцинация КА с ГОА+МА в дозе 5+5 мл обеспечила накопление антитоксических антител в молозиве $9,6 \log_2$, что было максимальным среди других опытных и контрольных групп.

Таблица 4 - Титр специфических антитоксических антител в сыворотке крови и молозиве свиноматок после иммунизации КА с адъювантами (n = 25)

Группа	Титр антитоксических антител, $\log_2$		
	Через 7 дней после 1-й вакцинации	Через 7 дней после 2-й вакцинации	В молозиве на 1-й день после опороса
1 КА+ГОА+МА	$6,4 \pm 0,18$	$7,8 \pm 0,17$	$8,8 \pm 0,14^*$
2 КА+ГОА+МА	$6,8 \pm 0,15^*$	$8,2 \pm 0,15^*$	$9,2 \pm 0,16^*$
3 КА+ГОА+МА	$7,2 \pm 0,14^*$	$8,6 \pm 0,12^*$	$9,6 \pm 0,13^*$
4 КА+ГОА	$5,8 \pm 0,13$	$7,3 \pm 0,12$	$8,2 \pm 0,18$
5 КА+МА	$6,2 \pm 0,12$	$7,6 \pm 0,18$	$8,4 \pm 0,16$

Примечание: * – статистическая достоверность различий по отношению к группам 4–5, $P < 0,05$.

В свою очередь у телят на 2-е сутки после рождения максимальный уровень антитоксических антител составил $8,8 \log_2$, что в 1,1–1,2 раза превышало значение опытных групп (рисунок 4а). На 7-й день максимальное количество антител составило $9,2 \log_2$ у телят 3-й опытной группы, что в 1,1–1,2 раза превышало значения 5 и 4 групп соответственно, где адъюванты применялись по-отдельности. В 1-й и 2-й опытных группах у телят количество антител находилось в пределах $8,4\text{--}8,6 \log_2$ соответственно.

У поросят на 2-й день после рождения уровень колостральных антител сохранялся в пределах $7,2\text{--}8,8 \log_2$. На 7-е сутки после рождения во всех группах наблюдали постепенное снижение титра антител во всех группах (рисунок 4б). При этом максимальное количество защитных клеток было у поросят в 3-й опытной группы – $8,2 \log_2$. На 21-й день после рождения максимальный уровень колостральных защитных клеток ($6,4 \log_2$) сохранился в группе поросят, чьи матери были иммунизированы КА+ГОА+МА двукратно в дозе 5 мл. Таким образом, применение КА+ГОА+МА стельным коровам в дозе 5+10 мл, а супоросным свиноматкам 5+5 мл, обеспечивает накопление колостральных антител у новорожденных телят и поросят в течение 7 и 14 дней после рождения.

Для профилактики отечной болезни поросят провели дополнительные исследования по применению КА с ГОА+МА в схемах, включающих вакцинацию беременных животных и двукратную иммунизацию народившегося поголовья.

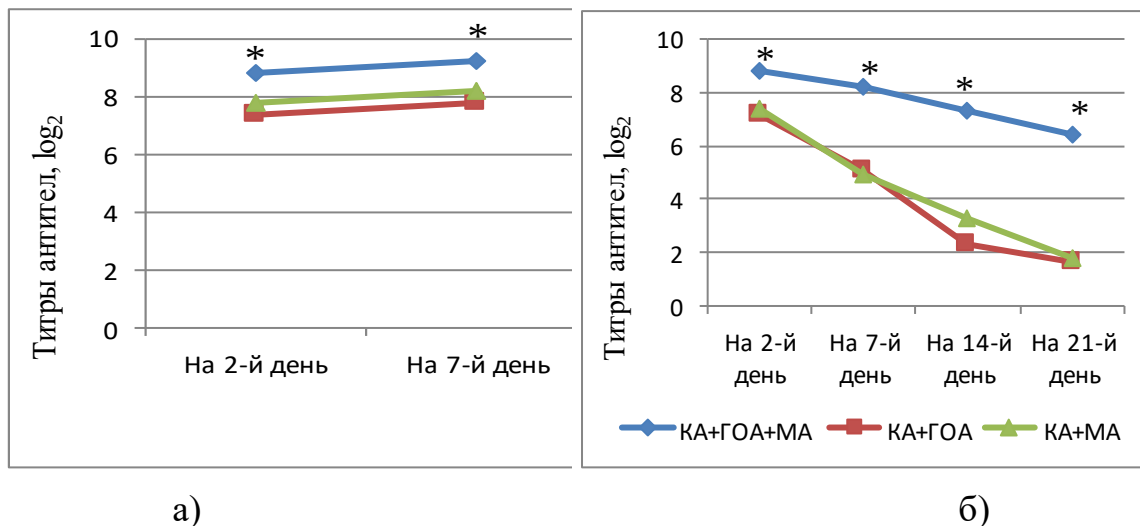


Рисунок 4 – Динамика накопления колостральных антител:
а) у телят ; б) у поросят

(примечание: * – $P < 0,05$ по отношению 2 и 3 группам животных)

Исследования показали, что на 7 день после первой вакцинации поросят количество иммуноглобулинов находилось в пределах 6,2–6,8 $\log_2$. Максимальный титр антител регистрировали у животных во 2-й группе (6,8 $\log_2$). На 7 день после 2-й вакцинации в группе животных, где применяли инактивированные токсины с минерально-масляным адьювантом в дозе 0,5 мл, уровень антител находился в пределах 7,2–8,2 $\log_2$. Повышение дозы ревакцинации до 1 мл (3 группа) способствовало повышению антител до 6,8 $\log_2$. На 14 день после последней вакцинации титр антитоксических иммуноглобулинов был максимальным во всех группах животных. У животных в 1-й группе количество иммуноглобулинов по-прежнему оставался выше, что в других группах и составил 8,8 $\log_2$. Через 28 и 56 дней количество антител снизилось, в 1-й группе до 7,6 и 6,3 $\log_2$, во второй группе – до 6,4 и 5,4 $\log_2$, в третьей – до 6,6 и 5,2 $\log_2$ соответственно.

Следовательно, для профилактики отечной болезни у поросят следует их вакцинировать КА с ГОА+МА через 21 день после рождения в дозе 0,25 мл и ревакцинировать дозой 0,5 мл через 7 дней. При этом титр защитных антител сохраняется в течение 56 дней.

Результаты проведенных производственных испытаний на свиньях показали, что в группе животных, иммунизированных КА с ГОА+МА,

заболеваемость составила 14,5 %, смертность – 3,6 %, профилактическая эффективность – 85,5 % при сохранности поросят 96,4 %. При этом заболеваемость снизилась по сравнению с аналогом на 10,9 %, а в сравнении группой контроля – на 36,4 %, при этом падеж сократился в 2,5–6 раз. У крупного рогатого скота профилактическая эффективность КА с ГОА+МА составила 88 %, при 100%-й сохранности у телят. Заболеваемость снизилась по сравнению с группой положительного контроля на 12 %, и на 36 % – с группой отрицательного контроля. Полученные данные свидетельствуют о высокой эффективности КА с ГОА+МА при профилактике эшерихиозной инфекции у телят и поросят.

3.8 Профилактика кишечных инфекций телят и поросят с использованием ассоциированной вакцины против эшерихиоза, стрептококкоза и энтерококковой инфекции

Как показали результаты наших исследований, в этиологии неонатальных диарей у молодняка крупного рогатого скота и свиней преобладают *E. coli*, *S. bovis* и *E. faecalis*. Однако, в настоящее время ни одна биофабрика страны не выпускает вакцину в состав которой входили бы одновременно антигены патогенных *E. coli*, *S. bovis* и *E. faecalis*, что побудило нас к разработке такой вакцины с целью применения в хозяйствах неблагополучных по кишечным инфекциям новорождённых телят и поросят.

Для получения вакцины ассоциированной против эшерихиоза, стрептококкоза и энтерококковой инфекции использовали депонированные штаммы патогенных *E. coli* (KubGAU B-533, KubGAU B-546, KubGAU B-923, KubGAU B-933) с уже известными свойствами и эпизоотические изоляты гемолитических вариантов *Streptococcus bovis* и *Enterococcus faecalis*.

Иммуногенные свойства вакцины проверяли на кроликах. После двукратного введения вакцины уровень специфических антител к вакцинным антигенам увеличился в 4–8 раз, что свидетельствует о выраженных иммуногенных свойствах препарата.

Защитные свойства ассоциированной вакцины против колибактериоза, стрептококкоза и энтерококковой инфекции проверяли на модели острых инфекций при внутрибрюшинном заражении белых мышей. Установили, что разработанная нами вакцина обеспечивает защиту от 80 до 100 % животных при их экспериментальном заражении.

На введение вакцины каких-либо общих и местных побочных явлений отмечено не было.

При изучении иммуногенной активности ассоциированной вакцины установили, что у свиноматок из опытных групп уровень специфических антител в сыворотке крови и в молозиве после опороса в отноше-

нии экзотоксинов кишечной палочки и капсульным антигенам стрепто- и энтерококков был в 4–30 раз большим, чем у животных в контроле. У поросят, полученных от иммунизированных свиноматок на 3-й день после рождения уровень специфических антител в сыворотке крови был выше в 4–16 раз, чем у поросят из контрольной группы. Наибольшую продукцию поствакцинальных антител наблюдали во второй опытной группе, где свиноматки иммунизировались дважды в дозе 5 мл.

При исследовании иммуногенности ассоциированной вакцины на крупном рогатом скоте установили, что наибольший титр иммуноглобулинов к трем антигенам регистрировали в молозиве у коров из второй опытной группы, где они находились в диапазоне 1:64–1:256. При этом разные дозировки препарата по-разному влияли на клетки, отвечающие за выработку антител. Наибольшее количество иммуноглобулинов наблюдали в группе стельных коров, иммунизированных двукратно в дозах 5 и 10 мл. У телят, полученных от иммунизированных коров уровень колострального иммунитета в отношении факторов патогенности эшерихий, стрепто- энтерококков был также более выраженным, поскольку уровень специфических антител у них в сыворотке крови был выше в 4–16 раз, чем у телят из контрольной группы.

Производственные испытания показали, что профилактика острых кишечных болезней у свиней с использованием ассоциированной вакцины позволила снизить заболеваемость по сравнению с аналогом на 17,6 %, при этом падеж поголовья сократился в 2,5–4,5 раз. Профилактическая эффективность ассоциированной вакцины составила 84,9 % при сохранности поросят в группе 96,2 %. Применение ассоциированной вакцины для профилактики острых кишечных заболеваний у крупного рогатого скота позволило снизить заболеваемость по сравнению с аналогом на 12 % и добиться сохранности телят до 100 %. При этом профилактическая эффективность ассоциированной вакцины составила 92 %.

Таким образом, за счет создания более напряженного специфического иммунитета применение ассоциированной вакцины позволяет с большей эффективностью осуществлять профилактику острых кишечных заболеваний у телят и поросят и обеспечивать их сохранность.

3.9 Экономическая эффективность применения колианатоксина и ассоциированной вакцины крупному рогатому скоту и свиньям

На основе результативных экспериментов был проведён расчет экономической эффективности применения различных форм препаратов колианатоксина в сочетании с ЛПС и ПАК, а также с ГОА и МА, а также ассоциированной вакцины против эшерихиоза, стрептококкоза, энтерококковой инфекции телят и поросят. Результаты представлены в таблице 5.

Таблица 5 – Экономическая эффективность профилактических мероприятий при эшерихиозе и острых кишечных инфекциях телят и поросят

Группа	Экономический эффект, руб.	Экономическая эффективность ветеринарных мероприятий на рубль затрат, руб.
Профилактика эшерихиоза телят (n = 25)		
Опытная 1 (КА-ЛПС+ПАК)	11333	2,6
Опытная 2 (КА-ГОА+МА)	10576,2	2,2
Опытная 3 (Коли-Вак)	2830,2	0,47
Контроль (интактные)	– 7463,2	– 0,85
Профилактика эшерихиоза поросят (n = 55)		
Опытная 1 (КА-ЛПС+ПАК)	3465,5	2,2
Опытная 2 (КА-ГОА+МА)	3656,5	2,4
Опытная 3 (Коли-Вак)	-543,7	– 0,33
Контроль (интактные)	– 7463,2	–
Профилактика острых кишечных инфекций телят (n = 25)		
Опытная (вакцина ассоциированная)	6587,4	1,3
«+» Контроль (вакцина ОКЗ)	– 1357,2	0,16
«–» Контроль (интактные)	– 28889,4	– 1,64
Профилактика острых кишечных инфекций поросят (n = 53)		
Опытная (вакцина ассоциированная)	7218,4	1,6
«+» Контроль (вакцина ОКЗ)	– 1270,1	– 0,2
«–» Контроль (интактные)	– 880	–

Применение колианатоксина с адъювантными комплексами ЛПС и ПАК и колианатоксина с минерально-масляным адъювантом в профилактической схеме мероприятий при эшерихиозе телят и поросят экономически выгодно. При этом у телят профилактический эффект с экономической стороны выражен лучше у колианатоксина с ЛПС и ПАК, который превышает эффективность КА с ГОА и МА в 1,2 раза. Окупаемость ветеринарных мероприятий на рубль затрат при профилактике эшерихиоза составил 2,6 и 2,2 руб. соответственно. В свою очередь, у поросят профилактический эффект с экономической стороны выражен лучше у КА с ГОА и МА, который превышает эффективность колианатоксина с ЛПС и ПАК в 1,1 раза. Экономическая эффективность на рубль затрат при профилактике эшерихиоза составил 2,4 и 2,2 руб. соответственно.

Применение ассоциированной вакцины против эшерихиоза, стрептококкоза, энтерококковой инфекции в системе профилактических мероприятий острых кишечных болезней у телят и поросят экономически целесообразно. Окупаемость профилактических мероприятий на рубль затрат в опытах на телятах составила 1,3 руб., а на поросятах – 1,6 руб.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании проведенных исследований можно сделать следующие **выводы**:

1. Эшерихиоз в Краснодарском крае имеет широкое территориальное распространение, болезнь диагностируется ежегодно, количество положительных результатов лабораторных исследований находится в пределах 46,2–47,4 %. В динамике выявления болезни отчетливо просматривается ее волнообразный характер с пиками каждые 3–5 лет, эпизоотический процесс можно охарактеризовать как напряженный, отличающийся энзоотичностью и периодичностью.

2. На территории Краснодарского края в развитии диарей у новорожденных телят и поросят принимают участие бактерии, принадлежащие к таким семействам как *Enterobacteriaceae*, *Streptococcaceae*, *Enterococcaceae*, *Pseudomonadaceae*, *Alcaligenaceae*, *Alteromonadaceae*. Ведущая роль в этиологии острых кишечных заболеваний у телят и поросят принадлежит энтеробактериям, энтерококкам и стрептококкам, доля которых в общем пуле изолятов составила 70,1; 15,9 и 11,1 % соответственно. При этом среди энтеробактерий, выделенных как от телят, так и поросят, преобладающим видом был *E. coli* (55,6 %), стрептококков – *S. bovis* (24,9 %), энтерококков – *E. faecium* и *E. faecalis* (88,3 %).

3. Патогенный потенциал у *E. coli* в 83,1 % составляют адгезивные свойства, при этом у 31,5 % адгезины представлены общими пиллями, количество гемолитических штаммов составило 42,7 %, а экзотоксинпродуцирующих – 43,8 %. Среди *Enterobacter cloacae* количество штаммов, обладающих подобными свойствами было – 65,5; 25,5; 23,6 и 41,8 %; *Klebsiella pneumoniae* – 78,3; 13,0; 34,8 и 30,4 %; *Citrobacter freundii* – 66,7; 23,3; 16,7 и 13,3 % соответственно.

4. У 61,8 % изолятов патогенных *E. coli*, выделенных от телят, и у 64,2 %, изолированных от поросят, обнаружили фимбриальные факторы адгезии. При этом у 52,4 % адгезинпозитивных изолятов, полученных от телят, адгезины были представлены фимбриями I типа, в большинстве случаев это были антигены A20 (39,7 %) и K99 (25,0 %). У 48,8 % изолятов, полученных от поросят, адгезины были представлены фимбриями II типа, чаще всего K88 (43,3 %) и 987P (19,4 %). Более 50 % исследованных штаммов имеют гены токсинообразования, среди которых чаще всего встречается LT и STX 2 типа. У 56 % штаммов с маркерами экзотоксинов имеются факторы адгезии, а другие штаммы являются адгезиннегативными.

5. Генетическое разнообразие изолятов *E. coli*, выделенных от телят и поросят с диареей, представлено генами вирулентности синтеза тер-

молабильного энтеротоксина (50 %) и шигаподобного токсину 2 типа (23,5 %). Четыре штамма эшерихий демонстрировали высокое генетическое разнообразие, обладая генами термолабильного токсина, термостабильного токсина ST-I, ST-II и шигаподобных токсинов 2 типа. Полногеномным секвенированием установили, что их патогенный потенциал штаммов *E. coli* также связан с наличием нуклеотидных детерминант субтилазного токсина AB5, колицина B, E1, V, токсина RTX α -гемолизина и гемолизина E. Были отобраны и депонированы четыре кандидных вакцинных штамма – KubGAU B-533, KubGAU B-546, KubGAU B-923 и KubGAU B-933.

6. При экспериментальной энтеротоксемии после введения экзотоксинов у крыс в крови регистрировали лейкопению и лимфоцитопению. Через 12 ч на фоне увеличения доли лимфоцитов у крыс прогрессировала нейтрофилия, при этом у животных, которым вводили культуральную смесь из нескольких экзотоксинов, инфекционный процесс сопровождался токсико-аллергическим течением, что выражалось моноцитозом и эозинофилией. Со стороны клеток красных кровяных телец через 6 ч после заражения у крыс наблюдали эритропению и тромбоцитопению, с развивающимися признаками анемии к 24 ч наблюдений. Установили, что цитокиновый ответ в течение первых 6 ч характеризовался выработкой провоспалительных медиаторов – ИЛ-6 и ФНО- α , через 12 ч – ИЛ-2 и противовоспалительного ИЛ-10.

7. При моделировании смешанной токсикоинфекции эшерихиозного происхождения к особенностям клинического проявления следует отнести сочетание диарейного и невралгического синдрома. Патоморфологические изменения свидетельствовали о развитии различных патологических процессов, таких как дистрофия, атрофия, некроз, гиперемия, стаз, воспаление. При этом основными мишенями были не только эпителиальные клетки всего желудочно-кишечного тракта, но и почечный и альвеолярный эпителий, гепатоциты, мышечная ткань сердца и ткань головного мозга.

8. В ответ на введение колианатоксина у крыс изменения в крови проявлялись в виде эритроцитоза, нейтрофилии в первые сутки и последующим лимфоцитозом. Неспецифическое звено иммунитета у белых крыс выражалось повышением фагоцитарной активности в первые 24 ч и переваривающей способности нейтрофилов через 72 ч. Активность микробицидных систем нейтрофилов наиболее выражена у животных в течение 3 сут после иммунизации. Иммунизация животных колианатоксином способствовала потенцирующему действию на фагоцитарную активность нейтрофилов, что позволяет добиться активации кислородзависимых и кислороднезависимых ферментных систем нейтрофилов с сохранением их резервных возможностей.

9. После введения КА, антитела к токсинам *E. coli* появляются у животных уже через 24 ч, а пик их накопления происходит на 5-е сутки. Адьюванты не только активизируют гуморальный иммунный ответ на введение КА, но и увеличивают продолжительность продуцирования антител. Максимальный подъем уровня специфических антител при введении КА с ЛПС и ПАК происходит через 7 дней, при введении КА с ГОА – через 14 дней, а при введении КА с МА – через 21 день. При повторном введении анатоксина с адьювантами наиболее быстрое и высокое накопление антитоксических антител установили при использовании КА с ЛПС и ПАК.

10. Максимальный уровень специфических антител у иммунизированных свиноматок был установлен после двукратного применения КА с ЛПС и ПАК в дозе 5 см³ (8,3 log₂ и 8,0 log₂ соответственно). При этом в молозиве у иммунизированных свиноматок уровень антител к токсинам *E. coli* был в 1,9–3,5 раз выше, чем у не иммунизированных. Наиболее эффективной схемой иммунизации коров анатоксином с ЛПС и ПАК была та, которая предусматривает двукратное введение в дозе 5 и 10 см³. При этом уровень антитоксических антител в молозиве этих животных в 1,2 раза выше, чем при иммунизации КА без адьювантов и 1,8–2,1 раза выше, чем у не иммунизированных коров.

11. Применение Колианатоксина-ЛПС+ПАК способствует увеличению количественного состава антител, как в молозиве у коров, так и в сыворотке крови новорожденных животных. Так, у поросят минимальным уровнем накопления колостральных антител был на 14-й день исследования 6,3 log₂, у телят на 7-й день – 7,4 log₂. При этом профилактический защитный эффект в отношении энтеротоксигенного эшерихиоза у телят, иммунизированных Колианатоксином-ЛПС+ПАК, составил 92 % со 100%-й сохранностью, а у поросят – 85,5 % при сохранности 96,4 %.

12. Применение комбинированного минерально-масляного адьюванта повышает иммуногенность инактивированных токсинов *E. coli*, что выражается в усилении антителообразования и продолжительности иммунного ответа у животных. Максимальное количество колостральных антител у телят регистрировали на 7-й день после вакцинации их матерей – 9,2 log₂, у поросят на 14-й день – 7,3 log₂ соответственно. По истечении 56 дней после введения Колианатоксина-ГОА+МА титр антител у поросят оставался на уровне 6,3 log₂. При этом профилактическая эффективность препарата у телят составила 88 % при сохранности 100 %, а у поросят – 85,5 % и 96,4 % соответственно.

13. Двукратная вакцинация супоросных свиноматок за 30 и 20 дней и стельных коров за 30 и 15 дней до родов разработанной ассоциированной вакциной против колибактериоза, стрептококкоза и энтерокок-

ковой инфекции позволяет формировать у них выраженный иммунный ответ в виде продуцирования специфических антител. Иммунизация супоросных свиноматок в дозе 5 см³ позволила обеспечить содержание у них в молозиве специфических антител в среднем в количестве 1:96–1:144, а у новорожденных поросят, полученных от этих свиноматок – 1:48–1:72. Иммунизация стельных коров в дозе 5 и 10 см³ позволила обеспечить содержание у них в молозиве специфических антител в среднем в количестве 1:108–1:164, а у новорожденных телят, полученных от этих коров – 1:54–1:82. При этом профилактическая эффективность препарата у телят составила 92 % при сохранности 100 %, а у поросят – 84,9 % и 96,2 % соответственно.

14. Окупаемость ветеринарных мероприятий при использовании Колианатоксина-ЛПС+ПАК при профилактике эшерихиоза у телят составляет 2,6 руб., у поросят – 2,2 руб. на один рубль затрат. Экономическая эффективность профилактических мероприятий с применением Колианатоксина-ГОВА+МА при эшерихиозе телят и поросят составляет соответственно 2,2 и 2,4 руб. на один рубль затрат. Окупаемость ветеринарных мероприятий при использовании ассоциированной вакцины при профилактике острых кишечных болезней телят и поросят составляет 1,3 и 1,6 руб. на один рубль затрат соответственно.

Исходя из полученных в ходе выполнения исследований результатов, были сделаны следующие **предложения производству**:

1. Для повышения иммунобиологической реактивности и предотвращения возникновения эшерихиозной инфекции иммунизировать стельных коров Колианатоксином-ЛПС+ПАК подкожно в область верхней трети шеи: первый раз – за 30 дней до отёла в дозе 5 см³, второй раз – за 15 дней до отёла в дозе 10 см³. Свиноматок иммунизировать в дозе 5 см³ внутримышечно в область основания ушной раковины: первый раз – за 30 дней до опороса, второй раз – за 20 дней до опороса. Для профилактики отечной болезни поросят иммунизировать дважды внутримышечно в области внутренней поверхности бедра: первый раз – в возрасте 14 дней в дозе 0,25 см³, а второй раз – через 7 дней в дозе 0,5 см³ (методические рекомендации).

2. Для повышения иммунобиологической реактивности и предотвращения возникновения эшерихиозной инфекции иммунизировать стельных коров Колианатоксином-ГОВА+МА подкожно в область верхней трети шеи: первый раз – за 45 дней до отёла в дозе 5 см³, второй раз – за 15 дней до отёла в дозе 10 см³. Свиноматок иммунизировать Колианатоксином-ГОВА+МА внутримышечно в область основания ушной раковины в дозе 5 см³: первый раз – за 40 дней до опороса, второй раз – за 15 дней до опороса. Для профилактики отечной болезни поросят им-

мунизировали дважды внутримышечно в области внутренней поверхности бедра: первый раз – в возрасте 21 дней в дозе 0,25 см³, а второй раз – через 7 дней в дозе 0,5 см³ (методические рекомендации).

3. Для повышения иммунобиологической реактивности и предотвращения возникновения острых кишечных инфекций стельных коров и нетелей прививать вакциной, ассоциированной против эшерихиоза, стрептококкоза и энтерококковой инфекции, дважды подкожно: первый раз – за 30 дней до отела в дозе 5 см³, а второй раз – за 15 дней до отела в дозе 10 см³; телят также прививать дважды: первый раз – в возрасте 15–20 дней в дозе 1 см³, а второй раз – через 10–15 дней в дозе 2 см³ соответственно. Супоросным свиноматкам вакцину вводить внутримышечно дважды в дозе 5 см³: первый раз – за 30 дней до опороса, а второй раз – за 20 дней до опороса; поросят прививать дважды: первый раз – в возрасте 15–17 дней в дозе 0,25 см³, а второй раз – в возрасте 28–30 дней в дозе 0,5 см³ соответственно (методические рекомендации).

Перспективы дальнейшей разработки темы исследований

В перспективе планируется продолжение исследований по применению разработанных иммунобиологических препаратов для профилактики эшерихиозной инфекции и ассоциированных кишечных болезней у молодняка крупного рогатого скота и свиней.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Публикации в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ:

1. Тищенко, А. С. Влияние различных адъювантов на свойства эшерихиозного анатоксина, изменяющие функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов / **А. С. Тищенко**, В. И. Терехов // Ветеринария Кубани. – 2010. – № 6. – С. 11–13.

2. Терехов, В. И. Влияние адъювантов на иммуногенные свойства эшерихиозного анатоксина при вакцинации стельных коров / В. И. Терехов, **А. С. Тищенко** // Ветеринария Кубани. – 2011. – № 3. – С. 19–21.

3. Тищенко, А. С. Оценка гуморального иммунного ответа у супоросных свиноматок, иммунизированных эшерихиозным анатоксином в сочетании с адъювантами / **А. С. Тищенко**, В. И. Терехов // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2011. – № 29. – С. 144–147.

4. Терехов, В. И. Факторы адгезии и колициногенная активность *Escherichia coli* / В. И. Терехов, **А. С. Тищенко**, И. В. Сердюченко // Вестник ветеринарии. – 2015. – № 3(74). – С. 41–45.

5. Сравнительный анализ состава микроорганизмов, изолированных от новорожденных телят и поросят при острых кишечных заболеваниях / В. И. Терехов, **А. С. Тищенко**, Т. В. Малышева, Я. Н. Мартыненко // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2017. – № 132. – С. 728–741. – DOI 10.21515/1990-4665-132-058.

6. Патогенный потенциал энтеробактерий, выделенных от новорожденных телят при острых кишечных заболеваниях / Т. В. Малышева, **А. С. Тищенко**, Н. С. Мусатова, В. И. Терехов // Ветеринария Кубани. – 2017. – № 2. – С. 11–13.
7. Тищенко, А. С. Изменение гематологических показателей у животных после введения им инаktivированных токсинов *Escherichia coli* / **А. С. Тищенко**, В. И. Терехов // Ветеринария Кубани. – 2017. – № 4. – С. 6–9.
8. Распространение эшерихиоза поросят и способ его специфической профилактики / **А. С. Тищенко**, Е. Н. Новикова, Д. П. Винокурова [и др.] // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2018. – № 137. – С. 220–229. – DOI 10.21515/1990-4665-137-036.
9. Новикова, Е. Н. Распространение колибактериоза свиней в Краснодарском крае / Е. Н. Новикова, **А. С. Тищенко**, Я. Н. Мартыненко // Политематический сетевой электронный научный журнал Кубанского государственного аграрного университета. – 2018. – № 136. – С. 201–210. – DOI 10.21515/1990-4665-136-029.
10. Тищенко, А. С. Влияние инаktivированных токсинов кишечной палочки на микробицидные свойства нейтрофильных гранулоцитов / **А. С. Тищенко**, В. И. Терехов, А. В. Степаненко // Научная жизнь. – 2019. – Т. 14, № 11(99). – С. 1757–1764. – DOI 10.35679/1991-9476-2019-14-11-1757-1764.
11. Тищенко, А. С. Специфическая профилактика острых кишечных заболеваний у телят / **А. С. Тищенко**, В. И. Терехов, Я. Н. Мартыненко // Ветеринарная патология. – 2019. – № 4(70). – С. 55–61.
12. Тищенко, А. С. Влияние инаktivированных токсинов кишечной палочки на показатели крови у животных / **А. С. Тищенко**, Е. Н. Новикова, А. В. Степаненко // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2019. – № 79. – С. 214–220. – DOI 10.21515/1999-1703-79-214-220.
13. Тищенко, А. С. Оценка иммуногенных качеств вакцины против острых кишечных болезней поросят / **А. С. Тищенко** // Научная жизнь. – 2019. – Т. 14, № 5(93). – С. 684–692. – DOI 10.26088/INOV.2019.93.31124.
14. Тищенко, А. С. Влияние инаktivированных токсинов кишечной палочки на антителообразование / **А. С. Тищенко** // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2020. – № 1. – С. 49–51. – DOI 10.17238/issn2072-6023.2020.1.49.
15. Тищенко, А. С. Особенности взаимодействия клеток крови и инаktivированных токсинов кишечной палочки / **А. С. Тищенко**, Я. Н. Мартыненко, А. В. Степаненко // Труды Кубанского государственного аграрного университета. – 2020. – № 82. – С. 159–165. – DOI 10.21515/1999-1703-82-159-165.

16. Тищенко, А. С. Экзотоксины патогенных *Escherichia coli* / **А. С. Тищенко**, А. В. Степаненко, В. И. Терехов // Ветеринария Кубани. – 2020. – № 5. – С. 3–7. – DOI 10.33861/2071-8020-2020-5-3-7.

17. Кощев, А. Г. Влияние обезвреженных форм экзотоксинов кишечной палочки на гуморальные факторы защиты у животных / А. Г. Кощев, В. И. Терехов, **А. С. Тищенко** // Ветеринария Кубани. – 2021. – № 3. – С. 15–16. – DOI 10.33861/2071-8020-2021-3-15-16.

18. Проблемы антибиотикотерапии энтеротоксигенного эшерихиоза телят и поросят и пути их решения / **А. С. Тищенко**, А. Г. Кощев, П. П. Яковенко [и др.] // Ветеринария Кубани. – 2022. – № 3. – С. 8–11. – DOI 10.33861/2071-8020-2022-3-8-11.

19. Распространенность острых кишечных инфекций телят и поросят в Краснодарском крае / А. Г. Кощев, О. Ю. Черных, **А. С. Тищенко** [и др.] // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2023. – № 10. – С. 65–75. – DOI 10.36871/vet.zoo.bio.202310008.

20. Тищенко, А. С. Распространение возбудителя эшерихиоза среди телят и поросят в Краснодарском крае / **А. С. Тищенко** // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н. Э. Баумана. – 2024. – Т. 257. – № 1. – С. 244–250. – DOI 10.31588/2413_4201_1883_1_257_244.

21. Тищенко, А. С. Гистопатологические изменения при экспериментальной эшерихиозной инфекции, вызванной экзотоксинами *Escherichia coli* / **А. С. Тищенко** // Вестник КрасГАУ. – 2024. – № 4. – С. 128–135. – DOI 10.36718/1819-4036-2024-4-128-135.

22. Влияние экзотоксинов кишечной палочки на гематологические показатели и цитокиновый профиль в кровяном русле у крыс / **А. С. Тищенко**, В. И. Терехов, А. Г. Кощев [и др.] // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2024. – № 6. – С. 71–81. – DOI 10.36871/VET.ZOO.BIO.202406009.

23. Тищенко, А. С. Влияние адъювантных композиций на иммуногенность обезвреженных экзотоксинов *Escherichia coli* / **А. С. Тищенко**, И. В. Сердюченко // Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии. – 2024. – № 2(66). – С. 156–162. – DOI 10.18286/1816-4501-2024-2-156-162.

24. Генетический потенциал токсигенных *Escherichia coli*, выделенных от телят и поросят / **А. С. Тищенко**, А. Г. Кощев, А. В. Милованов [и др.] // Аграрный вестник Урала. – 2024. – Т. 24, № 08. – С. 1071–1081. – DOI 10.32417/1997-4868-2024-24-08-1071-1081.

25.

В международной реферативной базе данных Scopus:

25. Tishchenko, A. The effects of inactive toxins of escherichia coli on hematological parameters in animals / **A. Tishchenko**, V. Terekhov, E. Bua-beng // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Krasnoyarsk,

16–19 июня 2021 года / Krasnoyarsk Science and Technology City Hall of the Russian Union of Scientific and Engineering. – Vol. 839. – Krasnoyarsk : IOP Publishing Ltd, 2021. – 52003. – DOI 10.1088/1755-1315/839/5/052003.

26. Effect of Inactivated *Escherichia coli* Exotoxins on the Phagocytic Properties of Neutrophils / **A. Tishchenko**, E. Novikova, V. Terekhov, I. Koba // Fundamental and Applied Scientific Research in the Development of Agriculture in the Far East : Agricultural Innovation Systems, Vol. 2, Ussuriysk, 21–22 июля 2021 года. – Vol. 354. – Ussuriysk, 2022. – P. 18–25. – DOI 10.1007/978-3-030-91405-9_3.

27. Immunobiological resistance and humoral protection factors in animals / V. Terekhov, **A. Tishchenko**, N. Pimenov, R. Ivannikova // AIP Conference Proceedings : 2, Krasnoyarsk, 29–31 июля 2021 года. – Krasnoyarsk, 2022. – P. 070067. – DOI 10.1063/5.0092550.

28. Prevention of enterotoxigenic escherichiosis as a way to stabilize the ecological situation of anthropogenic pollution by antibiotic-resistant strains / **A. Tishchenko**, V. Terekhov, N. Pimenov, R. Ivannikova // IOP Conference Series: Earth and Environmental Science, Krasnoyarsk, 18–20 ноября 2021 года. – Krasnoyarsk : IOP Publishing Ltd, 2022. – DOI 10.1088/1755-1315/981/4/042067.

29. Relationship of Adhesive and Toxigenic Properties of *Escherichia Coli* Isolated from Calves and Piglets / **A. Tishchenko**, V. Terekhov, N. Pimenov [et al.] // Sustainable Development: Agriculture, Veterinary Medicine and Ecology (VMAEE-II-2023) : II International Conference, Karshi, 21–22 апреля 2023 года. – Vol. 3011. – New York : AIP PUBLISHING, 2023. – P. 20032. – DOI 10.1063/5.0161303.

30. Histopathological manifestation of *Escherichia* toxicoinfection in rabbits in acute experience / **A. Tishchenko**, V. Terekhov, N. Pimenov [et al.] // AIP Conf. Proc., 14 June 2024. – № 3184(1). – P. 020011. – DOI 10.1063/5.0212020.

Патенты РФ на изобретения

31. Патент № 2429012 С1 Российская Федерация, МПК А61К 39/116, А61К 39/09, А61К 39/108. Способ изготовления ассоциированной вакцины против колибактериоза, стрептококкоза и энтерококковой инфекции телят и поросят : № 2010131633/15 : заявл. 27.07.2010 : опубл. 20.09.2011 / Терехов В. И., Скориков А. В., Иванов А. В., **Тищенко А. С.** [и др.] ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ. – 6 с.

32. Патент № 2432174 С1 Российская Федерация, МПК А61К 39/108, С12N 1/20, А61Р 1/00. Способ получения эшерихиозного анатоксина : № 2010131645/15 : заявл. 27.07.2010 : опубл. 27.10.2011 / Терехов В. И., Караев Я. М., **Тищенко А. С.** [и др.] ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ. – 5 с.

33. Патент № 2449290 С2 Российская Федерация, МПК G01N 33/556, G01N 33/569. Способ получения эритроцитарного антигенного диагностикума : № 2009129696/15 : заявл. 03.08.2009 : опубл. 27.04.2012 / Терехов В. И., Караев Я. М., **Тищенко А. С.**, Иванов А. В. ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ. – 6 с.

34. Патент № 2649831 С1 Российская Федерация, МПК A61K 39/00, A61K 39/09, A61K 39/108. Способ профилактики острых кишечных заболеваний у поросят : № 2017118737 : заявл. 29.05.2017 : опубл. 04.04.2018 / Терехов В. И., **Тищенко А. С.**, Мартыненко Я. Н. ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ. – 6 с.

35. Патент № 2650604 С1 Российская Федерация, МПК A61K 39/09, A61K 39/108, A61K 39/116. Способ профилактики острых кишечных заболеваний у телят : № 2017118739 : заявл. 29.05.2017 : опубл. 16.04.2018 / Терехов В. И., **Тищенко А. С.**, Мусатова Н. С. ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ. – 6 с.

36. Патент № 2650628 С1 Российская Федерация, МПК A61K 39/116. Способ получения вакцины ассоциированной против колибактериоза, стрептококкоза и энтерококковой инфекции телят и поросят : № 2017118742 : заявл. 29.05.2017 : опубл. 17.04.2018 / Терехов В. И., **Тищенко А. С.** ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ. – 8 с.

37. Патент № 2753410 С2 Российская Федерация, МПК A61K 39/108, A61K 39/39, A61K 31/78. Способ получения анатоксин-вакцины против эшерихиоза животных : № 2020101538 : заявл. 14.01.2020 : опубл. 16.08.2021 / Терехов В. И., **Тищенко А. С.**, Ратников А. Р. ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ. – 14 с.

38. Патент № 2764600 С1 Российская Федерация, МПК A61K 39/108, A61K 39/39, A61K 31/739. Вакцина против эшерихиоза телят и поросят : № 2021106771 : заявл. 15.03.2021 : опубл. 18.01.2022 / **Тищенко А. С.**, Терехов В. И. ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ. – 13 с.

39. Патент № 2766249 С1 Российская Федерация, МПК A61K 39/108, A61K 31/739, A61K 31/78. Способ профилактики эшерихиоза у телят : № 2021106438 : заявл. 11.03.2021 : опубл. 10.02.2022 / **Тищенко А. С.**, Терехов В. И., Степаненко А. В. ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ. – 12 с.

40. Патент № 2766549 С1 Российская Федерация, МПК A61K 39/108, A61K 39/39, A61K 31/739. Способ профилактики эшерихиоза у поросят : № 2021106288 : заявл. 10.03.2021 : опубл. 15.03.2022 / Терехов В. И., **Тищенко А. С.**, Рогач К. И. ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ. – 7 с.

41. Патент № 2806810 С1 Российская Федерация, МПК A61K 39/108, A61K 39/39, C12N 1/20. Вакцина гидроокись алюминиевая масляная против

эшерихиоза телят и поросят : № 2022129944 : заявл. 17.11.2022 : опубл. 07.11.2023 / **Тищенко А. С.**, Терехов В. И., Кощаев А. Г., Алферов Д. О. ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ. – 13 с.

42. Патент № 2813752 С1 Российская Федерация, МПК А61К 39/108, А61К 39/39, С12N 1/20. Способ получения гидроокись алюминиевой масляной вакцины против эшерихиоза телят и поросят : № 2022129945 : заявл. 17.11.2022 : опубл. 16.02.2024 / **Тищенко А. С.**, Терехов В. И., Кощаев А. Г. [и др.] ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ. – 9 с.

43. Патент № 2813771 С1 Российская Федерация, МПК А61К 39/108. Способ профилактики эшерихиоза у телят : № 2022129934 : заявл. 17.11.2022 : опубл. 16.02.2024 / **Тищенко А. С.**, Терехов В. И., Кощаев А. Г. [и др.] ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ. – 10 с.

44. Патент № 2814593 С1 Российская Федерация, МПК А61D 99/00, А61К 39/108, А61К 39/116. Способ профилактики эшерихиоза у поросят : № 2022129936 : заявл. 17.11.2022 : опубл. 01.03.2024 / **Тищенко А. С.**, Терехов В. И., Кощаев А. Г. [и др.] ; заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО Кубанский ГАУ. – 12 с.

Монографии, рекомендации

45. Терехов, В. И. Возбудитель эшерихиоза телят и поросят : монография / В. И. Терехов, **А. С. Тищенко**. – Краснодар : КубГАУ, 2022. – 168 с.

46. Тищенко, А. С. Профилактика эшерихиоза у телят и поросят : монография / **А. С. Тищенко**, В. И. Терехов, А. Г. Кощаев. – Краснодар : КубГАУ, 2024. – 226 с.

47. Разработка и применение иммунобиологических препаратов на основе колианатоксина и адьювантных композиций : методические рекомендации / сост. А. Г. Кощаев, А. С. Тищенко, В. В. Чекрышева [и др.]. – Краснодар : КубГАУ, 2024. – 45 с.

48. Профилактика смешанных острых кишечных инфекций телят и поросят : методические рекомендации / сост. А. С. Тищенко, А. Г. Кощаев, В. В. Чекрышева [и др.]. – Краснодар : КубГАУ, 2024. – 35 с.

Публикации в других изданиях

49. Тищенко, А. С. Влияние адьювантов на иммуногенные свойства эшерихиозного анатоксина : автореф. дис. ... канд. вет. наук : 06.02.02 / **Тищенко Александр Сергеевич**. – Краснодар, 2011. – 25 с.

50. Тищенко, А. С. Влияние адьювантов на иммуногенные свойства эшерихиозного анатоксина : дис. ... канд. вет. наук : 06.02.02 / **Тищенко Александр Сергеевич**. – Краснодар, 2011. – 136 с.

51. Киященко, А. А. Иммуногенные свойства эшерихиозного полианатоксина при совместном использовании с масляным адьювантом / А. А. Киященко, А. Р. Белик, **А. С. Тищенко** // Вестник научно-

технического творчества молодежи Кубанского ГАУ : сб. ст. по материалам науч.-исслед. Работ : В 4-х т., Краснодар, 22–25 марта 2017 года / сост. А. Я. Барчукова, Я. К. Тосунов; под ред. А. И. Трубилина, отв. ред. А. Г. Кощев. Т. 4. – Краснодар : КубГАУ, 2017. – С. 32–35.

52. Мусатова, Н. С. Эпизоотологические особенности энтеротоксической формы эшерихиоза поросят / Н. С. Мусатова, **А. С. Тищенко** // Научное обеспечение агропромышленного комплекса : сб. ст. по материалам 72-й науч.-практ. конф. студентов по итогам НИР за 2016 год, Краснодар, 1 февраля 2017 года. – Краснодар : КубГАУ, 2017. – С. 107–110.

53. Тищенко, А. С. Иммуногенность эшерихиозного анатоксина при использовании с пирогеналом и полиакриловой кислотой / **А. С. Тищенко**, В. И. Терехов, И. В. Сердюченко // Научное обеспечение агропромышленного комплекса : сб. ст. по материалам X Всерос. конф. молодых ученых, посвященной 120-летию И. С. Косенко, Краснодар, 26–30 ноября 2016 года / отв. за вып. А. Г. Кощев. – Краснодар : КубГАУ, 2017. – С. 287–288.

54. Тищенко, А. С. Иммуногенные свойства эшерихиозного полианатоксина в сочетании с гидратом окиси алюминия / **А. С. Тищенко** // Научное обеспечение агропромышленного комплекса : сб. ст. по материалам 72-й науч.-практ. конф. преподавателей по итогам НИР за 2016 г., Краснодар, 29 марта 2017 года. – Краснодар : КубГАУ, 2017. – С. 199–200.

55. Мартыненко, Я. Н. Влияние основных факторов патогенности кишечной палочки на развитие болезни при эшерихиозе / Я. Н. Мартыненко, **А. С. Тищенко** // Научное обеспечение агропромышленного комплекса : сб. ст. по материалам 73-й науч.-практ. конф. студентов по итогам НИР за 2017 год, Краснодар, 25 апреля 2018 года / отв. за вып. А. Г. Кощев. – Краснодар : КубГАУ, 2018. – С. 193–195.

56. Тищенко, А. С. Специфическая профилактика коли-инфекции у кроликов с помощью эшерихиозного полианатоксина в сочетании с адъювантами / **А. С. Тищенко** // Итоги научно-исследовательской работы за 2017 год : сб. ст. по материалам 73-й науч.-практ. конф. преподавателей, Краснодар, 14 марта 2018 года. – Краснодар : КубГАУ, 2018. – С. 183–184.

57. Тищенко, А. С. Видовой состав микроорганизмов семейства *Enterobacteriaceae*, выделенных от телят при острых кишечных болезнях / **А. С. Тищенко** // Итоги научно-исследовательской работы за 2017 год : сб. ст. по материалам 73-й науч.-практ. конф. преподавателей, Краснодар, 14 марта 2018 года. – Краснодар : КубГАУ, 2018. – С. 181–182.

58. Мартыненко, Я. Н. Применение ассоциированной вакцины с целью профилактики острых кишечных инфекций у поросят / Я. Н. Мартыненко, В. И. Терехов, **А. С. Тищенко** // Наука и образование на современном этапе развития: опыт, проблемы и пути их решения : материалы национальной науч.-практ. конф., Воронеж, 26–27 ноября 2019 года. – Воронеж : Воронежский ГАУ, 2019. – С. 222–224.

59. Мартыненко, Я. Н. Эффективность специфической профилактики острых кишечных заболеваний у поросят / Я. Н. Мартыненко, **А. С. Тищенко** // Научное обеспечение агропромышленного комплекса : сб. ст. по материалам 74-й науч.-практ. конф. студентов по итогам НИР за 2018 год, Краснодар, 26 апреля 2019 года / отв. за вып. А. Г. Кощев. – Краснодар : КубГАУ, 2019. – С. 112–114.

60. Тищенко, А. С. Изменение фагоцитарных свойств нейтрофилов под влиянием инактивированных экзотоксинов *Escherichia coli* / **А. С. Тищенко**, В. И. Терехов // Актуальные вопросы управления производством растениеводческой и животноводческой продукции АПК и здоровьем сельскохозяйственных животных : материалы Всерос. (национальной) науч.-практ. конф., пос. Персиановский, 20 декабря 2019 года. – пос. Персиановский : ДонГАУ, 2019. – С. 405–409.

61. Тищенко, А. С. Сравнительная характеристика препаратов при профилактике острых кишечных заболеваний у телят / **А. С. Тищенко**, Я. Н. Мартыненко // Актуальные вопросы управления производством растениеводческой и животноводческой продукции АПК и здоровьем сельскохозяйственных животных : материалы Всерос. (национальной) науч.-практ. конф., пос. Персиановский, 20 декабря 2019 года. – пос. Персиановский : ДонГАУ, 2019. – С. 401–405.

62. Тищенко, А. С. Проблема острых кишечных болезней у поросят и пути ее решения / **А. С. Тищенко**, Я. Н. Мартыненко // Современные проблемы в животноводстве: состояние, решения, перспективы : материалы Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 85-летию юбилею академика РАН В. Г. Рядчикова, Краснодар, 17–18 октября 2019 года. – Краснодар : ФГБУ «Российское энергетическое агентство» Минэнерго России Краснодарский ЦНТИ – филиал ФГБУ «РЭА» Минэнерго России, 2019. – С. 262–267.

63. Тищенко, А. С. Профилактическая эффективность ассоциированной вакцины при острых кишечных инфекциях у поросят / **А. С. Тищенко**, Я. Н. Мартыненко // Научное обеспечение агропромышленного комплекса : сб. тез. по материалам Всерос. (национальной) конф., Краснодар, 19 декабря 2019 года / отв. за вып. А. Г. Кощев. – Краснодар : КубГАУ, 2019. – С. 121–122.

64. Tishchenko, A. S. Influence of inactivated toxins of *E.coli* on phagocytic properties of neutrophilic granulocytes / **A. S. Tishchenko**, V. I. Terekhovich // Journal of Agriculture and Environment. – 2019. – № 4(12). – P. 20–24. – DOI 10.23649/jae.2019.4.12.5.

65. Мартыненко, Я. Н. Совершенствование профилактики острых кишечных болезней у телят и поросят / Я. Н. Мартыненко, И. А. Родин, **А. С. Тищенко** // Научное обеспечение агропромышленного комплекса : сб. ст. по материалам 75-й науч.-практ. конф. студентов по итогам НИР за

2019 год, Краснодар, 2–16 марта 2020 года / отв. за вып. А. Г. Кощаев. – Краснодар : КубГАУ, 2020. – С. 102–104.

66. Тищенко, А. С. Исследование микробицидных свойств нейтрофильных гранулоцитов под влиянием инактивированных токсинов кишечной палочки / **А. С. Тищенко**, А. В. Степаненко // Актуальные проблемы интенсивного развития животноводства : сб. науч. тр. национальной науч.-практ. конф., посвященной памяти доктора биологических наук, профессора Е. П. Ващекина, заслуженного работника Высшей школы РФ, Почетного работника высшего профессионального образования РФ, Почетного гражданина Брянской области, Брянск, 22–23 января 2020 года. Ч. 1. – Брянск : Брянский государственный аграрный университет, 2020. – С. 178–182.

67. Микробицидные свойства нейтрофилов при взаимодействии с экзотоксинами кишечной палочки / **А. С. Тищенко**, В. И. Терехов, А. В. Степаненко [и др.] // Вестник Донского государственного аграрного университета. – 2020. – № 1-1(35). – С. 47–53.

68. Тищенко, А. С. Динамика продукции антител при энтеротоксигенном эшерихиозе / **А. С. Тищенко** // Год науки и технологий 2021 : сб. тез. по материалам Всерос. науч.-практ. конф., Краснодар, 9–12 февраля 2021 года / отв. за вып. А. Г. Кощаев. – Краснодар : КубГАУ, 2021. – С. 76.

69. Тищенко, А. С. Специфическая профилактика эшерихиоза, вызванного энтеротоксигенными вариантами *Escherichia coli* / **А. С. Тищенко**, Е. И. Семенова // Эффективное животноводство. – 2022. – № 2(177). – С. 62–63. – DOI 10.24412/cl-33489-2022-2-62-63.

70. Тищенко, А. С. Энтеротоксигенный эшерихиоз и его специфическая профилактика / **А. С. Тищенко** // Итоги научно-исследовательской работы за 2021 год : материалы Юбилейной науч.-практ. конф., посвященной 100-летию Кубанского ГАУ, Краснодар, 6 апреля 2022 года / отв. за вып. А. Г. Кощаев. – Краснодар : КубГАУ, 2022. – С. 207–208.

71. Алферов, Д. О. Биотехнология иммунобиологического препарата для профилактики токсигенного эшерихиоза / Д. О. Алферов, **А. С. Тищенко** // Интеллектуальный потенциал молодых ученых как драйвер развития АПК : материалы Междунар. науч.-практ. конф. молодых ученых и обучающихся, Санкт-Петербург – Пушкин, 15–17 марта 2023 года. – Санкт-Петербург : СПбГАУ, 2023. – С. 173–175.

72. Биотехнология иммунобиологического препарата для профилактики токсигенного эшерихиоза / **А. С. Тищенко**, П. П. Яковенко, А. П. Седашев, А. В. Елисютикова // Вызовы и инновационные решения в аграрной науке : материалы XXVII Междунар. науч.-производ. конф., Майский, 12 апреля 2023 года. Т. 2. – Майский : Белгородский государственный аграрный университет имени В. Я. Горина, 2023. – С. 13–14.

73. Тищенко, А. С. Профилактическая эффективность экспериментальной вакцины против токсигенной эшерихиозной инфекции / **А. С. Ти-**

щенко, А. Г. Кощачев, Т. В. Малышева // Научное обеспечение животноводства Сибири : материалы VII Междунар. науч.-практ. конф., Красноярск, 18–19 мая 2023 года. – Красноярск : ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук», 2023. – С. 291–293.

74. Тищенко, А. С. Повышение иммуногенности анатоксин-вакцины против эшерихиоза / **А. С. Тищенко, П. П. Яковенко, Д. О. Алферов** // Точки научного роста: на старте десятилетия науки и технологии : материалы ежегодной научно-практической конференции преподавателей по итогам НИР за 2022 г., Краснодар, 12 мая 2023 года. – Краснодар : КубГАУ, 2023. – С. 242–244.

75. Тищенко, А. С. Применение минерально-масляного адъюванта для повышения иммуногенности колианатоксина / **А. С. Тищенко** // Современные векторы развития науки : сб. ст. по материалам ежегодной науч.-практ. конф. преподавателей по итогам НИР за 2023 год, Краснодар, 6 февраля 2024 года. – Краснодар : КубГАУ, 2024. – С. 182–184.

76. Тищенко, А. С. Ветеринарные решения для повышения продуктивности сельскохозяйственных животных / **А. С. Тищенко, А. П. Седашев, К. К. Дубенцов** // Современные проблемы в животноводстве: состояние, решения, перспективы : сб. ст. по материалам II Междунар. науч.-практ. конф., посвященной 90-летию академика В. Г. Рядчикова, Краснодар, 25–26 января 2024 года. – Краснодар : КубГАУ, 2024. – С. 512–517.

ТИЩЕНКО Александр Сергеевич

**ЭТИОЛОГИЧЕСКИЕ И ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ
АСПЕКТЫ ЭШЕРИХИОЗА ТЕЛЯТ И ПОРОСЯТ
И ЕГО ВАКЦИНОПРОФИЛАКТИКА**

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора ветеринарных наук

Подписано в печать « 23 » июня 2025 г. Уч.-изд. л. – 2.

Тираж 100 экз. Заказ № .

Типография Кубанского государственного аграрного университета.
350044, г. Краснодар, ул. Калинина, 13