

УДК 619.4:616.9

## ПРИМЕНЕНИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ЭШЕРИХИОЗА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

**Волкова Марина Владиславовна**, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

**Малинин Михаил Леонидович**, доктор биологических наук, заведующий лабораторией биохимии

ФГБНУ «Саратовский научно-исследовательский ветеринарный институт»

410028, г. Саратов, ул. 53 Стрелковой дивизии, 6, тел. (8452)200830

e-mail: volkovamv78@mail.ru

**Ключевые слова:** эшерихиоз, колибактериоз, живые вакцины, профилактика, иммунитет, энтеротоксины

В статье представлены результаты многолетней работы по применению штамма *Escherichia coli* Б-5, обладающего высокой иммунологической и протективной активностью. Установлено, что штамм является авирулентным; иммунизация штаммом *E. coli* Б-5 обеспечивает защиту сельскохозяйственных животных от колибактериоза.

### Введение

Эшерихиоз (колибактериоз) на современном этапе развития животноводства считается наиболее распространённой инфекцией среди прочих, вызываемых бактериями семейства *Enterobacteriaceae*. Колибактериозом болеют новорожденные телята в первые 2-3 недели жизни, новорождённые поросята (до 3-4-недельного возраста). У птиц колибактериоз представляет собой типичную секундарную инфекцию, развивающуюся на фоне сниженного иммунитета. В условиях интенсификации производства до 50% всех инфекционных заболеваний желудочно-кишечного тракта обусловлено вирулентными штаммами кишечной палочки [1,2,3].

Вакцинные препараты нового поколения против колибактериоза должны обеспечивать эффективную защиту иммунизированных животных от заболевания, стимулируя формирование в организме животных не только антиклеточного, но и антитоксического иммунитета. Существующие в настоящее время методы специфической профилактики недостаточно эффективны; это подтверждается тем, что заболеваемость и смертность животных от эшерихиоза остается на высоком уровне и регистрируется в большинстве хозяйств Российской Федерации.

Можно определить 4 основные группы биологических препаратов, применяемых для иммунопрофилактики и иммуноте-

рапии кишечных инфекций:

- вакцины, создающие активный иммунитет;

- иммунные сыворотки и иммуноглобулины;

- бактериофаги и биологические иммуностимуляторы. Наиболее эффективным средством раннего предупреждения инфекционных болезней, на наш взгляд, остаются вакцинные препараты.

Одним из возможных путей решения этой проблемы может стать разработка и применение живых вакцин, которые обеспечат нейтрализацию энтеротоксинов эшерихий. Многие вирулентные штаммы *Escherichia coli* являются токсинообразующими. В источниках научно-технической и патентной документации данные о создании живых вакцин немногочисленны. По-видимому, это связано с тем, что изготовление таких препаратов сопряжено с определенными сложностями, связанными с аттенуацией инфекционного агента. Однако, без сомнения, живые вакцины имеют преимущества перед инактивированными и химическими вакцинами, так как создают прочный и длительный иммунитет, по напряженности приближающийся к постинфекционному [4].

Целью настоящих исследований было выделение перспективного штамма *E. coli*, разработка экспериментальной вакцины и апробация ее в условиях производства.

#### **Объекты и методы исследований**

В экспериментах и наблюдениях были использованы белые мыши, кролики, свиноматки (за 7-14 дней до опороса), поросята в возрасте 2-7 дней, поросята-отъемыши, телята, цыплята яйценосского кросса «Родонит-2». Исследования *in vitro* проводили по общепринятым методикам. Скрининг штаммов *E. coli* на присутствие плазмидных репликонов проводили по методу С. I. Kado, S.-T. Liu [5] с использованием щелочного лизиса и фенольной экстракции ДНК.

Вакцину из штамма *E. coli* Б-5 готовили в лабораторных условиях на базе ФГБНУ «Саратовский НИВИ» и использовали в течение 6 месяцев со дня изготовления.

Производственные испытания проводились на комплексах по выращиванию крупнорогатого скота, свиней и птицефабриках Саратовской, Пензенской и Рязан-

ской областей.

Вакцину вводили телятам внутримышечно однократно после первой выпойки молозива в дозе 2,5 мл/гол. в концентрации 12 млрд. микробных клеток в 1 см<sup>3</sup> физиологического раствора.

Иммунизацию свиноматок проводили за 7-14 дней до опороса, вакцину вводили внутримышечно однократно в область шеи в объеме 2 мл/гол. Эффективность вакцины оценивали по клиническим признакам и сохранности поросят к отъемному возрасту.

Цыплятам вводили взвесь микробных клеток штамма *E. coli* Б-5 в возрасте 22 дней в дозе 0,5 млн. микробных клеток в объеме 0,5 мл однократно, перорально.

Исследования проводились с 2001-2013 гг.

#### **Результаты исследований**

Нами выделен и всесторонне изучен штамм *E. coli* Б-5 (Пат. РФ № 2248393, справка о депонировании № 1807/15), на основе которого сконструирована живая вакцина против эшерихиоза поросят, телят и кур (Пат. РФ № 2404803, Пат. РФ № 2248806, Пат. РФ № 2288006).

Отобранный штамм является авирулентным; в клетках штамма *E. coli* Б-5 обнаружен дополнительный внехромосомный репликон размером 0,3 kb. Максимальная кодирующая емкость обнаруженного репликона может реализоваться в полипептиде молекулярной массой 11,1-11,2 кДа. Так как известно, что термолабильный токсин состоит из двух белков -11,5-25,0 кДа [5], предполагаем, что на этом репликоне находится только ген, кодирующий В-субъединицу термолабильного токсина, который и обуславливает иммунологическую активность штамма. Кодирующей информации 0,3 kb для этого достаточно, так как по итогам молекулярного клонирования В-субъединица ТЛ токсина имеет молекулярную массу 11,8-12,0 кДа.

Иммунизация штаммом *E. coli* Б-5 усиливает фагоцитарную реакцию нейтрофилов крови и повышает уровень специфических антител в сыворотках крови опытных животных [7].

Вакцинации в условиях производства были подвергнуты телята в возрасте 2-7 дней в количестве 409 голов. В результате падеж телят снизился по сравнению с пре-

дыдущим годом в три раза (с 118 до 36 гол.). Получено телят больше на 12,2 %.

Применение экспериментальной вакцины на свиноматках показало, что от 5604 опоросившихся свиноматок получено 41469 поросят, т.е. 7,40 на каждую свиноматку, тогда как при применении ГОА формол-тиомерсальной вакцины от 3749 свиноматок – 26122 поросёнка (6, 97 на 1 свиноматку).

Для изучения протективных свойств вакцины на птице использовали цыплят яйценосского кросса «Родонит-2». В результате ряда исследований было показано, что у цыплят, зараженных вирулентными штаммами *E. coli* без предварительной иммунизации, по сравнению с интактными цыплятами, отмечено увеличение активности аланинаминотрансферазы (АЛТ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и концентрации общего белка, уменьшение активности аспаратаминотрансферазы (АСТ) и креатинкиназы (КК).

У цыплят, зараженных вирулентными штаммами *E. coli* после предварительной иммунизации штаммом *E. coli* Б-5, отмечено по сравнению с интактными цыплятами увеличение активности АЛТ, АСТ, КК, уменьшение активности ЛДГ и концентрации общего белка. Одновременное увеличение АЛТ, АСТ, КК и коэффициента Де Ритиса указывает на усиление аэробных процессов окисления. Одновременное увеличение АЛТ и снижение ЛДГ указывает на повышение рН и смещение равновесия в реакции, катализируемой КК, в сторону расщепления креатинфосфата с образованием АТФ.

Таким образом, при сравнении зараженных, предварительно иммунизированных штаммом *E. coli* Б-5, и зараженных, но не иммунизированных цыплят, обращает на себя внимание, что у первых значительно выше значения биохимических показателей крови, свидетельствующих об активизации защитных сил организма. Известно, что инфекционный агент может приспособиваться к выживанию в макроорганизме, сдвигая его метаболизм в сторону гликолиза и вызывая лактатный ацидоз. Иммунизация штаммом *E. coli* Б-5 позволяет сместить акцент в сторону аэробного окисления глюкозы и тем самым дает возможность предотвратить развитие колибактериоза.

Кроме того, рассмотрение колиинфекции со стороны изучения механизма соот-

ношения аэробной и анаэробной фаз энергетического метаболизма является принципиально новым направлением в профилактике данной патологии.

У цыплят, предварительно иммунизированных и затем зараженных смесью вирулентных штаммов *E. coli*, наблюдались положительные привесы и снижался падеж.

Таким образом, разработанную нами живую вакцину мы можем рекомендовать в качестве высокоиммуногенного препарата для профилактики колибактериоза на сельскохозяйственных предприятиях с интенсивной технологией ведения животноводства, специализирующихся в области разведения крупного рогатого скота и свиней. В настоящее время ведутся исследования по внедрению в хозяйства, специализирующиеся на выращивании птицы.

#### Библиографический список

1. Малахов, Ю.А. Специфическая профилактика эшерихиоза животных / Ю.А. Малахов, О.А. Тугаринов, М.К. Пирожков, Т.И. Исхакова // Ветеринария. – 1993. - №8. - С.5.
2. Субботин, В.В. Влияние бифидобактерина на кишечную микрофлору поросят / В.В. Субботин, К.М. Степанов // Ветеринария. – 1998. - №5. – С. 24-26.
3. Чулков, Н.В. Совершенствование специфической профилактики колибактериоза телят с использованием бивалентных вакцин и гипериммунной сыворотки, изготовленных на основе аттенуированных адгезивных штаммов *E. coli*: Автореферат дисс. на соискание уч. степ. канд. вет. наук. – Новосибирск: ГНУ ИЭВСиДВ СО РАНХН, 2004. – С.3.
4. Русалеев, В.С. Бактериальные вакцины в свиноводстве / В.С. Русалеев, В.М. Гневашев, О.В. Прунтова // Ветеринария. – 2001. - №6. – С.18-21.
5. Kado, C.I. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmid / C.I. Kado, S.T. Liu // Jo. Bacteriol. – 1981. – Vol. 145. - № 3. – P. 1365-1373.
6. Брода, П. Плазмиды / П. Брода. – М.: Мир, 1982. – 224 с.
7. Волкова, М.В. Энтеротоксигенные штаммы *E. coli* – основной фактор вирулентности в патогенезе колиинфекции новорожденных поросят / М.В. Волкова М.В., Д.С. Волков // Вестник СГАУ им. Н.И.Вавилова. Саратов, 2008, № 4. - С. 17-20.