

Капустин Андрей Владимирович

Этиологическая структура и специфическая профилактика
кlostридиозов крупного рогатого скота и овец

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

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» и Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)

Научный консультант:

доктор ветеринарных наук **Скляров Олег Дмитриевич**

Официальные оппоненты:

Девришов Давудай Абдулсемедович, доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА им. К.И. Скрябина», заведующий кафедрой

Спирidonov Геннадий Николаевич, доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», заведующий лабораторией

Матвеева Ирина Николаевна, доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности», заведующая отделом

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Сибирский федеральный научный центр агробиотехнологий РАН»

Защита диссертации состоится « ____ » _____ 2019 г. в ____ часов на заседании диссертационного совета Д 006.033.02, созданного на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» по адресу: 109428, г. Москва, Рязанский проспект 24 к.1., тел. 8 (495) 970-03-68.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН <http://viev.ru>

Автореферат разослан " ____ " _____ 2019 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор биологических наук

И.Ю. Ездакова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Инфекционные болезни продуктивных животных причиняют сельскому хозяйству значительный ущерб. Особенно стоит выделить болезни анаэробной этиологии в связи с их широким распространением, опасностью для животных и человека, высокой токсичностью возбудителей. Для нормальной жизнедеятельности, поддержания здоровья, репродукции и высокой продуктивности, животные должны быть обеспечены оптимальными условиями содержания, сбалансированным рационом, моционом, соответствующим микроклиматом. Интенсификация животноводства ведет к серьезным изменениям физиологических параметров организма животных. Нарушение условий содержания, несбалансированное и/или некачественное кормление высокопродуктивного скота способствует возникновению болезней, ранее не характерных для этого вида животных.

У крупного рогатого скота с продуктивностью от 7000 литров молока и выше, неполноценное и несбалансированное кормление вызывает патологии обмена веществ, болезни органов желудочно-кишечного тракта, опорно-двигательного аппарата и пр, которые зачастую осложняются различными инфекциями, особенно часто анаэробными микроорганизмами видов *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. oedematiens*, *C. sordellii*, *C. tetani* и др. (Глотова Т.И., 2017; Жуманалиев А.Т., 1984; Капустин А.В., 2013; Коваленко Я.Р., 1954; Терентьева Т.Е., 2016; Ургуев К.Р., 1965; Manteca G., 2001; Prescott J.F., 2007) в связи с их широким распространением.

Преимущественно от клостридиозов страдает новорожденный молодняк и отелившиеся коровы в хозяйствах, не отслеживающих их физиологическое состояние в период беременности. После отела организм животного не успевает перестроиться вслед за изменением физиологического состояния, вследствие чего молокоотдача при раздое обеспечивается не за счет питательных веществ, поступающих из корма, а в большей степени за счет внутренних резервов организма, что приводит к развитию кетоза, быстрому истощению организма животного, нарушениям физиологического гомеостаза. На фоне приведенных изменений в организме животного могут развиваться осложнения

бактериальными болезнями, в частности, анаэробной этиологии, вызывающие поражение кишечника (возбудителем чаще всего является *C. perfringens*) (Бурико Б.Ю., 2011, Ургуев К.Р., 1987; Ferrarezi M.C., 2008; Radostits O.M., 2000) и мышечной ткани, как правило тазовых конечностей (возбудителями являются *C. septicum*, *C. oedematiens*, *C. perfringens*, *C. sordellii*). Практически в 100% случаев болезнь заканчивается гибелью либо вынужденным убоем животного. Инфекции носят стационарный характер и характеризуются высокой летальностью, что приводит к значительному экономическому ущербу для хозяйств (Волкова А.А., 1953, Каган Ф.И., 1976; Капустин А.В., 2017; Нестеров И.А., 2006; Nagahama M., 1999; Robinson A., 1977).

Актуальность темы. В современных условиях ведения животноводства, когда интенсивные технологии вытесняют традиционные подходы выращивания и содержания скота, специфическая профилактика болезней животных приобретает все большее значение. Своевременная вакцинация является практически единственным надежным способом борьбы с такими клостридиозами как злокачественный отек, эмфизематозный карбункул, столбняк, анаэробная энтеротоксемия, некротический энтерит и др.

Разработка высокоэффективного иммунобиологического лекарственного средства против анаэробных болезней требует обоснование его состава, что невозможно без изучения этиологической структуры болезни. Между тем последние научные разработки в этой области относятся к восьмидесятым годам прошлого столетия. Причем практически все работы советских исследователей посвящены клостридиозам овец (Анисимов В.С. 1976, Волкова А.А. 1953, Каган Ф.И. 1964, Коваленко Я.Р. 1954, Ляушкин А.В. 1957, Польшковский М.Д. 1948, Ургуев К.Р. 1966).

На момент начала исследований в РФ не было препаратов для профилактики анаэробных инфекций крупного рогатого скота, позволяющих быстро и эффективно решать возникающие проблемы. О важности и необходимости разработки отечественной вакцины против клостридиозов КРС говорит и тот факт, что сейчас для удовлетворения спроса на эти препараты в РФ массово применяются вакцины зарубежного производства, что делает уязвимой страну с точки зрения

зависимости от импорта (Капустин А.В. 2016, Радионова К.П. 2010, Редкозубова Л.И. 2016).

Борьбу с клостридиозами также осложняет устаревшая документация, регламентирующая методы диагностики анаэробных инфекций, из-за чего бывает сложно поставить корректный диагноз. Не узаконены все современные методы диагностики и идентификации клостридий и их токсинов: иммуноферментный анализ (ИФА), полимеразная цепная реакция (ПЦР), диагностические тест-системы, *Maldi ToF* и др., которые давно разработаны и с успехом используются как для биохимической, так и для генетической идентификации бактерий (Бургасов П.Н. 1974, Егорова Г.К. 1978, Каплунова О.П. 1981, Капустин А.В. 2013, Козлова А.Д. 2017, Комкова О.А. 1958, Никитин В.М. 1986, Bruggemann H. 2003, Hickey M.J. 2008, Holdsworth R.J. 1994).

В связи с этим диссертационную работу, посвященную конструированию вакцины для специфической профилактики клостридиозов, а также совершенствованию их диагностики, следует считать выполненной на актуальную тему, имеющую научное и практическое значение.

Степень разработанности темы. Согласно работам советских ученых (Алешкевич В.Н. 1992, Горелов Ю.М. 1984, Землякова В.П. 1980, Каган Ф.И. 1964, Каган Ф.И. 1964, Каган Ф.И. 1966, Коваленко Я.Р. 1954, Польшковский М.Д. 1948, Соловьев Л.Б. 1970, Урбан В.П. 1981, Ургуев К.Р. 1965), для КРС наиболее эпизоотически и клинически значимыми являются следующие заболевания: эмфизематозный карбункул, злокачественный отек, анаэробная энтеротоксемия, некротический гепатит, некротический энтерит, геморрагический энтерит, столбняк, возбудителями которых являются такие виды клостридий как *S. perfringens*, *S. chauvoei*, *S. septicum*, *S. novyi*, *S. tetani*, выделяющиеся не только отдельно при моноинфекции, но и в ассоциации (Егорова Г.К. 1978, Коваленко Я.Р. 1954).

Разработанные в России до 2000-х г. иммунобиологические лекарственные средства против клостридиозов КРС были представлены тремя препаратами: вакцина против эмфизематозного карбункула инактивированная; вакцина против сибирской язвы и эмфизематозного карбункула ассоциированная живая и концентрированный столбнячный

анатоксин. Первая из них, разработанная Муромцевым С.Н. в 1931 г. и усовершенствованная Ф.И. Каган и Я.Р. Коваленко в 1965 г., представляет собой инактивированную концентрированную бактериальную массу вирулентной культуры *C. chauvoei*, адсорбированную на геле гидрата окиси алюминия. Второй препарат – ассоциированная живая вакцина, состоящая из аттенуированных штаммов *C. chauvoei* и *B. anthracis*. Столбнячный анатоксин представлял собой инактивированный формалином и теплом токсин *C. tetani*, осажденный и сорбированный на алюмокалиевых квасцах. При его производстве не предусматривалась дополнительная очистка от балластных веществ, а также проверка на активность.

Конечно, сибирская язва, столбняк и эмфизематозный карбункул являются чрезвычайно важными инфекциями, но жвачные животные также подвержены и другим инфекциям, профилактика которых была не возможна в связи с отсутствием в РФ средств специфической профилактики анаэробных болезней (Горелов Ю.М. 1980, Каган Ф.И. 1966, Капустин А.В. 2016, Маничев А.А. 1996, Спиридонов Г.Н., 2011, Первова Л.М. 1988, Плеских С.А. 1992). Именно поэтому разработка безопасной и высокоэффективной поливалентной вакцины против клинически значимых клостридиозов КРС имеет важное значение. Применение ассоциированных вакцин создает у животных иммунитет одновременно против нескольких болезней, что ведёт не только к существенному снижению материальных и трудовых затрат, но позволяет в короткие сроки обеспечить стойкое благополучие поголовья к основным клостридиозам (Ашенбреннер А.И. 2009, Горелов Ю.М. 1984, Землякова В.П. 1980, Каган Ф.И. 1964, Каган Ф.И. 1966, Капустин А.В. 2017, Кириллов Л.В. 1984, Курлович Д.В. 2001, Скляров О.Д. 2017, Thomson R.O. 1969, Titball R. 2003).

Таким образом, отсутствие на рынке поливалентных вакцин против клостридиозов КРС, устаревшая технология культивирования штаммов клостридий и способов обработки антигенов, а также отсутствие объективных методов контроля анаэробных препаратов, продемонстрировали актуальность исследований в этом направлении.

Цель работы:

Изучить этиологическую структуру и разработать поливалентную вакцину для профилактики клостридиозов крупного рогатого скота и овец на основе наиболее клинически значимых видов возбудителей анаэробных болезней.

Задачи исследования:

- изучить современную этиологическую структуру клостридиозов крупного рогатого скота в РФ;
- провести подбор штаммов клинически значимых возбудителей клостридиозов животных, изучить в сравнительном аспекте их антигенные и токсигенные свойства;
- разработать современную технологию изготовления препарата (питательные среды, режимы культивирования, инактивации, концентрирования антигенов);
- определить эффективную иммунизирующую дозу каждого монопрепарата и сконструировать экспериментальный образец вакцины;
- провести доклинические и клинические исследования свойств вакцины (стерильность, безопасность, иммуногенная активность, интерференция компонентов);
- разработать методы контроля активности каждого компонента вакцины против клостридиозов.

Научная новизна

- впервые в России разработана, испытана с положительным эффектом и внедрена в практику поливалентная вакцина против клостридиозов овец и КРС, позволяющая профилактировать восемь наиболее клинически значимых анаэробных инфекций, возбудителями которых являются *C. chauvoei*, *C. perfringens* тип А, *C. perfringens* тип С, *C. perfringens* тип D, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. tetani*;
- определен видовой спектр возбудителей клостридиозов КРС, наиболее этиологически значимых в настоящее время;
- научно обоснована и внедрена в практику технология изготовления вакцины против клостридиозов животных, основанная на современных методах культивирования, инактивации, концентрирования анатоксинов клостридий мембранными методами;

- определены основные параметры поливалентной вакцины: оптимальное соотношение компонентов, отсутствие интерференции компонентов, сроки наступления и продолжительность иммунитета, безопасность для различных видов животных, иммуногенная и антигенная активность, специфическая эффективность вакцинации;
- разработан количественный способ контроля препарата, позволяющий оценить напряженность иммунитета к клостридиозам;
- разработаны методические рекомендации по диагностике клостридиозов животных.

Теоретическая и практическая значимость работы

- разработана, зарегистрирована и внедрена в производство инактивированная поливалентная вакцина против клостридиозов овец и КРС «Клостбовак-8». Серийный выпуск препарата производит ООО «Ветбиохим», выпущено и реализовано более 1 млн. доз;
- разработана и внедрена в практику современная технология изготовления токсоидов клостридий методом мембранной фильтрации;
- разработан количественный способ контроля препарата, позволяющий оценить напряженность иммунитета у вакцинированных животных, заложенный в СТО организации;
- на основе материалов диссертации разработаны методические указания «Лабораторная диагностика клостридиозов животных», утвержденные РАН РФ 21.05.2017 г.

Основные положения, выносимые на защиту

- этиологическая структура клостридиозов КРС и овец;
- особенности эпизоотологии и клинического проявления клостридиозов КРС в Российской Федерации;
- теоретическое обоснование разработки ассоциированных поливалентных вакцин против клостридиозов;
- промышленная технология изготовления ассоциированной поливалентной вакцины против клостридиозов;
- практическая эффективность вакцинации КРС против клостридиозов;
- практическая эффективность вакцинации овец против клостридиозов;
- способ контроля антигенной активности вакцины против клостридиозов;
- схема применения поливалентной вакцины против клостридиозов в неблагополучных хозяйствах.

Методология и методы исследований

Для достижения поставленной цели и обоснования применения полученных результатов использованы адекватные методологические приемы и доступные методы исследования.

Исследования проводились с использованием эпизоотологических, клинических, патоморфологических, бактериологических, биотехнологических, иммунологических и математических методов.

В проведении экспериментальных работ использовали белых мышей, морских свинок, кроликов, овец и КРС различных возрастных групп.

Степень достоверности и апробация результатов работы

Достоверность результатов исследований подтверждена соответствием теоретических данных с результатами проведенных экспериментальных исследований. При анализе и статистической обработке результатов и построении технологических и аппаратных схем, использовали программу «Microsoft Office, 2010». Для выявления статистически значимых различий использовали критерии Стьюдента-Фишера (Ашмарин И.П. 1962, Иванов Ю.И. 1990).

Материалы диссертации доложены на заседаниях Ученого совета ФГБУ «ВГНКИ» в 2010-2014 г.; научной конференции «Совершенствование методов государственного контроля ветеринарных препаратов» (ФГБУ «ВГНКИ», 2011 г.); международной научно-практической конференции «Anthropogenic evolution of modern soils and food production under changing of soil and climatic conditions», ФГБОУ ВО Орел ГАУ, Орел, 2016; международной научной конференции «Наука без границ и языковых барьеров», ФГБОУ ВО Орел ГАУ, Орел, 2016; VII Международном ветеринарном конгрессе, Уфа, 2017; Международной научно-практической конференции «Актуальные вопросы ветеринарной иммунологии», ФГБНУ ФНЦ РАН, 2017 г.

Публикации

По материалам диссертации опубликованы 32 научные работы, из них 25 в журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ, в том числе 1 патент РФ на изобретение.

Личный вклад автора в проведенные исследования

Личный вклад соискателя. Основной объем исследований проведен автором самостоятельно. Личный вклад автора в исследования, вошедшие в диссертацию, был определяющим. Соискатель самостоятельно осуществлял планирование всех экспериментов по теме работы и принимал непосредственное участие в их проведении, участие соавторов отражено в ссылках по тексту работы и совместно изданных научных публикациях.

Объем и структура диссертации

Диссертация изложена на 288 страницах компьютерного текста, состоит из следующих разделов: введения, обзора литературы, материалов и методов исследований, результатов исследований, обсуждения, выводов, практических предложений, списка использованной литературы и приложений. Диссертация содержит 35 таблиц, 23 рисунка, 20 приложений. Список литературы включает 279 литературных источников, из них 136 зарубежных.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследования выполнены в 2007–2018 гг. в лаборатории качества и стандартизации бактериальных лекарственных средств ФГБУ «ВГНКИ» и лаборатории микробиологии с музеем типовых культур ФГБНУ «ФНЦ ВИЭВ РАН».

Материалы и методы

Штаммы микроорганизмов. Производственные и контрольные штаммы: *C. chauvoei* R₁₅, *C. tetani* Kolle №8, *C. perfringens* mun A №28, *C. perfringens* тип В №1, *C. perfringens* тип С №ВТ, *C. perfringens* тип D №91, *C. septicum* №59, *C. septicum* №1098, *C. novyi* №34, *C. sordellii* №3, *C. sordellii* №44; изоляты *C. perfringens* mun A - 17 шт, *C. perfringens* mun C - 5 шт, *C. perfringens* m. D - 8 шт, *C. Septicum* - 15 шт, *C. sordellii* - 7 шт.

Токсины клостридий: лиофилизированные токсины *C. perfringens*: α (альфа) с активностью - 60 Dlm/мл, ε (эпсилон)- 250 Dlm/мл, β (бета) - 600 Dlm/мл, *C. novyi* - 200 Dlm/мл, *C. tetani* - 1000 Dlm/мл, *C. sordellii* - 200 Dlm/мл.

Стандартные антитоксические сыворотки: к α, β и ε токсинам *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. septicum*, *C. tetani*, производства NCBI (Великобритания) и ФГБУ НЦЭСМП (Россия).

Животные: КРС различных возрастных групп - 1052 голов, МРС - 928 голов, 451 кролик, 660 морских свинок, 10195 белых мышей.

Бактериологические исследования проводили в соответствии с ГОСТ 26503-85 «Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики клостридиозов».

Мониторинг: Этиологическую структуру клостридиозов изучали путем анализа отчетов ФГБУ «Центр ветеринарии» и результатов исследований проб патологического материала от павших или вынужденно убитых животных. Эпизоотологические исследования по заболеваемости КРС клостридиозами и их клиническому проявлению проведены в 32 хозяйствах 16 областей Центральной России.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Этиологическая структура клостридиозов в РФ

В соответствии с данными ФГБУ «Центр ветеринарии», клостридиозы животных в РФ регистрируются ежегодно, при этом носят спорадический характер. У КРС преобладают злокачественный отек и анаэробная энтеротоксемия, реже встречается эмфизематозный карбункул. В неблагополучных по злокачественному отеку пунктах выявлено в среднем по 1,78 голов больных животных; эмфизематозному карбункулу - 3,6, и 7,99 по анаэробной энтеротоксемии. Случаев столбняка КРС за последние десять лет официально зафиксировано не было.

Таблица 1 - Количество неблагополучных пунктов и животных, заболевших различными анаэробными инфекциями (КРС)

Болезнь	Кол-во случаев	Период наблюдения, годы										
		2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Эмкар	Пунктов	42	45	34	37	22	18	26	12	17	7	2
	Жив-ных	108	187	119	101	55	62	183	25	73	42	5
Столбняк	Пунктов	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Жив-ных	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Энтеротоксемия	Пунктов	137	126	73	107	116	64	75	53	1	16	3
	Жив-ных	860	657	673	948	782	561	1079	237	2	352	10
Злок. отёк	Пунктов	62	90	101	102	92	81	81	51	27	37	19
	Жив-ных	202	202	213	173	153	209	119	88	59	64	33

Количество вновь регистрируемых случаев неуклонно снижается, так количество неблагополучных пунктов по анаэробной энтеротоксемией уменьшилось за 10 лет на 88,3% по сравнению с 2007 г., эмфизематозного карбункула на 95,2%, злокачественного отёка почти на 70%.

Схожая ситуация по распространению анаэробных инфекций складывается и с клостридиозами овец.

Таблица 2 - Количество неблагополучных пунктов и животных, заболевших различными анаэробными инфекциями (МРС)

Болезнь	Кол-во случаев	Период наблюдения										
		2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Эмкар	Пунктов	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Жив-ных	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Столбняк	Пунктов	0	0	2	1	0	0	2	0	0	0	0
	Жив-ных	0	0	31	4	0	0	3	0	0	0	0
Энтеротоксемия	Пунктов	66	90	131	121	103	61	56	61	7	4	3
	Жив-ных	824	860	737	713	485	263	874	235	117	85	117
Дизентерия	Пунктов	0	3	0	5	9	2	1	1	0	0	0
	Жив-ных	69	86	66	131	40	4	4	26	20	47	0
Брадзот	Пунктов	0	0	34	26	11	23	35	17	1	2	1
	Жив-ных	533	325	256	123	36	209	288	55	53	129	67
Злок. отёк	Пунктов	1	0	3	5	5	2	1	4	0	0	0
	Живных	8	4	8	6	9	2	2	4	5	2	1

С 2007 г. по 2017 г. количество неблагополучных пунктов по анаэробной энтеротоксемии овец сократилось более чем в 20 раз, по злокачественному отёку в 8 раз. Эмкар, столбняк, анаэробная дизентерия за десять лет не фиксировались, либо зарегистрированы в единичных случаях.

Официальные данные не отражают реальную ситуацию с заболеваемостью животных анаэробными инфекциями, которые часто замалчиваются, поскольку при подтверждении диагноза на хозяйство накладывают ограничения, ведущие к экономическим потерям.

Эпизоотологическое обследование хозяйств неблагополучных по клостридиозам

Проведено обследование 32 хозяйств 16 регионов РФ, исследовано 2913 проб материала от 983 коров и 119 телят различного возраста.

Клостридиозы у коров наблюдали в основном перед отелом или в течение месяца после него, реже после травм. Клинически болезнь начиналась с быстро нарастающего угнетения, вызванного интоксикацией, отеками, омертвлением пораженных тканей. Обычно поражаются мышцы тазовых конечностей, органы репродуктивной системы, вымя. Клостридиозы у КРС всегда протекали остро, вызывая видимые поражения тканей уже через несколько часов после выявления у животного признаков болезни, и заканчивались летальным исходом практически в 100% случаев.

Структура клинически значимых видов клостридий выделенных от животных (%)

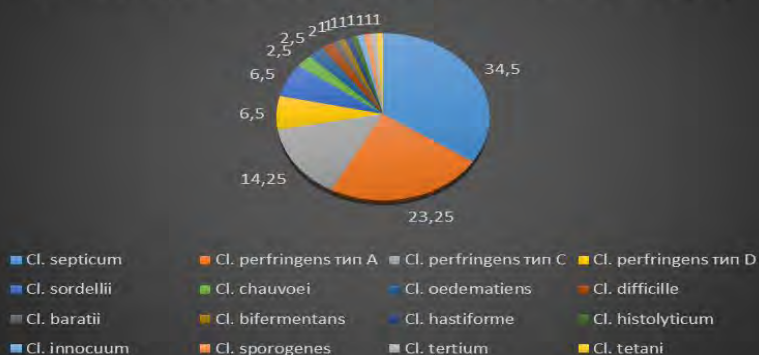


Рис. 1 - Структура клостридиозов КРС, вызванных наиболее клинически значимыми видами клостридий.

Как видно из рис. 1, наиболее клинически значимыми видами являются *C. septicum* – обнаруживается в 34,5% случаев, *C. perfringens mun A* - 23,25%, *C. perfringens mun C* – 14,25%, *C. perfringens mun D* – 6,5%, *C. novyi* – 2,5%, *C. sordellii* – 6,5%. Остальные виды (*C. sporogenes*, *C. tetani*, *C. baratii*, *C. bifermentans*, *C. difficile*, *C. hastiforme*, *C. histolyticum*, *C. innocuum*, *C. sporogenes*, *C. tertium*) встречаются в пределах 1-2%.

Следует отметить, что эта структура свойственна клостридиозам взрослого крупного рогатого скота. У телят первых дней жизни преобладает анаэробная энтеротоксемия, при этом выявляются *C. perfringens* тип A – 50% случаев, тип C – 39,5%, тип D – 10,5%, при этом тип D преобладает у телят в возрасте от 14 до 60 дней. Однако проверка вирулентности и токсичности показала, что изоляты *C. perfringens* тип A часто нетоксигенны, поэтому играют незначительную роль в патогенезе заболевания.

Бактериологические исследования

Всего было исследовано 2913 образцов материала, выделено 714 изолятов клостридий. Для исследования отобрано 128 изолятов, полученных из разных хозяйств и имеющих различные свойства, из которых идентифицировано до вида 117, еще 11 изолятов не идентифицированы, так как не входили в имеющуюся базу видов. Из 128 изолятов было отобрано 25 культур, обладающих вирулентностью и

высокой токсигенностью, среди которых *C. perfringens* *munov* A, C и D, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. tetani*, *C. sordellii*, *C. chauvoei*.

Совершенствование технологии изготовления вакцины

В основе патогенеза клостридиозов лежит токсический фактор, а надежную защиту обеспечивает антитоксический иммунитет. Для получения высокоиммуногенного поливалентного препарата против клостридиозов было необходимо изготовить *MSB* производственных штаммов; заменить питательные среды на новые, доказавшие положительное влияние на токсинообразование; изменить параметры культивирования; отработать методики детоксикации культуральной жидкости и концентрирования анатоксинов ультрафильтрацией.

Подбор штаммов клостридий

Для изготовления *MSB* проведена селекция штаммов, схема которой представлена на примере культуры *C. perfringens* тип А №28, которая при культивировании в течении 4-6 ч должен образовывать не менее 100 Dlm/мл α -токсина, но достичь такого токсинообразования не удавалось.

При селекции штамма №28 выросшие колонии отсевали для накопления в МППБ, каждую колонию отдельно. Через 6-7 ч роста культуры центрифугировали, надсадок стерилизовали фильтрацией, разводили физиологическим раствором 1:10 и 1-100 и вводили внутривенно мышам. Из 44 отсеянных клонов было отобрано 2, образовавших за идентичный интервал наибольшее количество токсина: первый из них образовывал за 6 ч. культивирования 80 Dlm/см³, а второй 104 Dlm/см³ токсина.

Эта схема использовалась и при работе с остальными штаммами.

Таблица 3 - Токсичность производственных штаммов клостридий до и после селекционирования, n = 760

№№	Наименование штамма	Время культивирования, ч.	Уровень токсина, Dlm/мл	
			До селекционирования	После отбора колоний
1	<i>C. perfringens mun A</i>	6-7	5±1,24	80±6,7
2	<i>C. perfringens mun C</i>	16-18	98±12,60	1600±956
3	<i>C. perfringens mun D</i>	16-18*	250±35,60	1500±178
4	<i>C. novyi mun B</i>	32-36	20±3,45	110±8,5
5	<i>C. septicum</i>	45-48	2±0,45	10±2,56
6	<i>C. tetani</i>	6 суток	2000±398	18320±2564

*-проведена дополнительно активация трипсином.

Селекция позволила восстановить токсигенные свойства штаммов. Полученные раскладки лиофилизированы и аттестованы в качестве *MSB*.

Подбор питательной среды, обеспечивающей высокое стабильное накопление токсинов, и культивирование штаммов клостридий

Количество продуцируемых токсинов в значительной мере зависит от качества и химического состава питательных сред. Переход от нестандартных питательных сред к средам на основе гидролизатов казеина позволяет в несколько раз увеличить выпуск анатоксинов.

На основе имеющихся данных нами была разработана питательная среда со следующими показателями: общий азот - 450 ± 470 мг%; аминный азот - 190 ± 225 мг%; пептон - $3,0 \pm 0,5$ мг%. Перед засевом в среду добавляли 0,5% глюкозы, дрожжевой экстракт, витамины группы В. Проведенные опыты по сравнению влияния сред на токсинообразование у клостридий различных видов представлены в таблице №4.

Таблица 4 - Титр токсинов при культивировании на различных питательных средах

№	Наименование штамма	Время культивирования, ч.	Титр токсина, Длм/мл					
			МППБ на основе БХ	Среда Китта-Тароши	Улучшенная среда для клостридий	Мясо-казеиновая среда ферментная	Мясо-казеиновая среда кислотная	Казеиновая
1.	<i>C. perfringens mun A</i>	6-7	50±9	0	0	52±13	80±11	116±18
2.	<i>C. perfringens mun C</i>	16-18	1600±135	520±38	1622±214	1600±118	2400±114	3580±299
3.	<i>C. perfringens mun D</i>	16-18*	1500±25	468±25	244±48	2500±389	2500±254	3000±388
4.	<i>C. novyi mun B</i>	32-36	110±8,5	50±3	0	300±37	450±48	1500±132
5.	<i>C. septicum</i>	45-48	14±2,5	0	0	10±2,2	11±1,3	20±2,5
6.	<i>C. tetani</i>	6 сут	17650±38	12870±1790	1550±348	18560±2890	30660±2586	55880±3290

Представленные данные показывают, что замена питательной среды при идентичных условиях культивирования позволяет получить накопление токсинов в 2-4 раза больше в сравнении с контрольной средой, в данном случае МППБ.

Для изготовления экспериментальных и опытно-промышленных образцов препарата использовались обладающие высокой токсигенностью и иммуногенностью штаммы клостридий: *C. perfringens* т. А - № 28; *C. perfringens* т. В - № 1; *C. perfringens* т. С – ВТ; *C. perfringens* т. D - № 91; *C. septicum* - № 1098; *C. novyi* т. В - № 34; *C. chauvoei* R₁₅; *C. tetani* - № 8.

Каждую серия препарата изготавливали, используя новую ампулу производственного штамма. Первую генерацию получали в пробирках с МППБ, пересев проводили через 18-24 ч. в зависимости от выраженности роста культур. 2-я генерация осуществлялась во флаконах, 3-я в бутылках по 16,0-20,0 дм³ с казеиновой средой. Ферментеры засеивали из бутылей, внося 8-10% расплодки к объему среды. В процессе роста в ферментерах контролировали температуру, уровень водородных ионов, обороты мешалки, наличие контаминации, токсичность.

C. perfringens выращивали в казеиново-панкреотической среде с содержанием аминного азота 140 – 150 мг% и рН 7,8-8,0. В питательную среду перед посевом вносили 0,5% глюкозы и витаминно-ростовые добавки, культивировали при 37 °С: тип А - 4 - 6 ч; тип С – 8-12 ч, тип D – в течение 16-18 часов. При этом токсичность культур *C. perfringens* тип А №28 составляла ~120 Dlm/см³, *C. perfringens* тип С «ВТ» ~6500 Dlm/см³, *C. perfringens* типа D ~ 3500 Dlm/см³ (после активирования трипсином).

C. novyi №34 выращивали в казеиновой среде на основе кислотного гидролизата при 37 °С в течение 18 – 30 ч. В процессе роста поддерживали рН - 7,2, перемешивание осуществляли пропусканием через питательную среду бескислородной газовой смеси. Токсичность культуральной жидкости до инактивации составляла не менее 6500 Dlm/см³.

C. tetani выращивали в среде на основе кислотного гидролизата казеина в течение 8 сут при температуре 34 °С. Титр токсина составлял не менее 80 тыс Dlm/мл.

Инактивация культур и токсинов клостридий

Существующая технология инактивации предусматривает однократное внесение высоких доз формалина от 0,7 до 1,0% от объема среды для обезвреживания спор клостридий, что ведет к потере антигенной активности анатоксинов.

С целью максимального сохранения антигенности анатоксинов, мы отработали технологию инактивации с уменьшением формалина, который вносится в количестве 0,2-0,3% к объему. Частичное обезвреживание проводили в течение 48 ч., затем культуру сепарировали, бактериальную массу утилизировали, а надосадочную жидкость фильтровали через стерилизующие пластины. Частичная детоксикация

позволяет предотвратить потери антигенности, благодаря плавности инактивации и отсутствию контакта нативного токсина с кислородом.

В супернатант дополнительно вносили формалин до конечной концентрации 0,3%. Инактивацию всех анатоксинов проводили 4-5 сут, кроме *C. tetani*, который инактивировали 30 сут.

Очистка супернатанта осуществлялась фильтрацией. Культуральную жидкость перекачивали из одного ферментера в другой через стерилизующие пластины с размером пор 0,45 и 0,22 мкм под давлением (0,05±0,01) Мпа. Концентрирование анатоксинов осуществляли ультрафильтрацией при давлении 0,05+0,01 МПа.

Определение эффективной дозы компонентов вакцины

Активность анатоксинов проверяли путем иммунизации кроликов различными дозами антигенов, после чего сыворотки вакцинированных животных использовали для постановки РН на белых мышах. Для определения эффективной иммунизирующей дозы *C. chauvoei* использовали морских свинок, *C. septicum* - белых мышей.

Таблица 5 - Определение оптимальной иммунизирующей дозы анатоксинов в РН

№№	Наименование монопрепарата	Объем монопрепарата, вводимый подопытным кроликам, мл							
		0,0125	0,025	0,05	0,1	0,15	0,20	0,25	0,30
1.	<i>C. perf.</i> тип А	0/4	0/4	0/4	1/4	2/4	4/4	4/4	4/4
2.	<i>C. perf.</i> тип В	0/4	2/4	3/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
3.	<i>C. perf.</i> тип С	0/4	1/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
4.	<i>C. perf.</i> тип D	1/4	2/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
5.	<i>C. novyi</i> тип В	0/4	0/4	2/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
6.	<i>C. tetani</i>	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4

В числителе количество выживших, в знаменателе количество использованных в РН мышей.

Как видно из табл. 5, минимальным эффективным количеством анатоксинов является для *C. perfringens* тип А – 0,2 мл, *C. perfringens* тип D – 0,05 мл, *C. perfringens* тип С – 0,25 мл, *C. novyi* – 0,1 мл, *C. tetani* – 0,0125 мл.

Таблица 6 - Определение оптимальной иммунизирующей дозы анакультур

№№	Наименование монопрепарата	Объем монопрепарата, вводимый подопытным животным, мл							
		0,0125	0,025	0,05	0,1	0,15	0,20	0,25	0,30
1.	<i>C. chauvoei</i>	1/4	2/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
2.	<i>C. septicum</i> (бактерин/ токсиод)	0/10	0/10	2/10	8/10	9/10	10/10	10/10	9/10

3.	<i>C. septicum</i> (бактерин)	0/10	1/10	3/10	5/10	6/10	6/10	8/10	9/10
4.	<i>C. septicum</i> /токсоид	0/10	0/10	0/10	0/10	3/10	4/10	6/10	7/10

В числителе количество выживших, в знаменателе использованных в опыте животных.

Активность бактериона *C. chauvoei* при двукратном введении в дозе 0,025 мл обеспечивала выживаемость 50%, а 0,05 мл (2,5 млрд.м.к) 100% подопытных морских свинок при гибели всех контрольных животных.

Компонент *C. septicum* был изготовлен в нескольких вариантах: в виде бактериона, токсоида и в виде бактерин/токсоида, где сочетались анатоксин с клетками *C. septicum* в концентрации 4 млрд./мл. Наиболее перспективен вариант бактерин/токсоид, обеспечивающий 80-100% защиту белых мышей, вакцинированных в объеме 0,1 мл и выше.

Таким образом установлено, что эффективным количеством антигенов является 0,1 мл для *C. septicum*, 0,05 мл для *C. chauvoei*.

Составление серии вакцины и характеристика препарата

Для составления экспериментальной серии антигены *C. perfringens* всех типов, *C. tetani*, *C. novyi*, *C. septicum* и *C. chauvoei* объединяли в эффективном количестве. При этом в реактор вносили требуемый объем фосфатно-буферного раствора, а затем отмеренные количества полуфабрикатов и адьювант – гель гидроокиси алюминия. Смесь перемешивали, устанавливали рН - 7,0-7,7 и консервировали 10% раствором мертиолята.

Полученный препарат по внешнему виду представляет собой суспензию желто-серого цвета, при хранении которой образуется рыхлый осадок, легко разбивающийся при взбалтывании в гомогенную взвесь.

В результате лабораторных и производственных испытаний было установлено, что оптимальной дозой препарата является 3,0 см³. Установленная доза вакцины обеспечивает защиту иммунизированных животных и индуцирует иммунитет высокой степени напряженности, при этом достаточно легко вводится при массовой обработке поголовья.

Определение безвредности препарата

Для оценки безвредности препарат вводили лабораторным животным: белым мышам в объеме 0,5 см³; морским свинкам в объеме 1,5 и 2 см³; кроликам в дозе 2 и 4 см³. Наблюдение за животными проводили в течение 45 дней: 28 дней между инъекциями и 14 дней после введения.

Установлено, что после однократного и двукратного введения вакцины у животных не наблюдалось каких-либо серьезных местных или системных реакций, подопытные животные оставались живы и клинически здоровы.

Наиболее удобной лабораторной моделью оценки безвредности препарата являются морские свинки, у которых за весь период наблюдения не отмечалось каких-либо системных реакций, аллергии, токсического проявления. На месте введения у отдельных животных образовывались асептические уплотнения размером 2-3 см, которые исчезали за 10-14 дней.

Изучение безвредности вакцины для крупного рогатого скота

Безопасность вакцины для восприимчивых животных изучали согласно требованиям ФЗ-61 для всех видов и возрастных групп животных, подлежащих вакцинации, то есть телят и ягнят 40 – 45 дневного и 5-6 мес. возраста, стельных коров и нетелей, суягных овцематок. Также оценивали наличие у препарата тератогенного действия.

Таблица 7 - Безвредность вакцины «Клостбовак-8» для КРС

Предприятие (вид восприимчивых объектов)	Телята 40-45 дневного возраста (голов)	Молодняк 5 мес. возраста (голов)	Стельные коровы (голов)	Доза первого введения см ³	Доза второго введения см ³	Серьёзные последствия применения
	Безвредность при однократном введении вакцины в рекомендованной дозе					
ООО «Васильевское»	100	48	10	3	-	Отсутствуют
	Безвредность при двукратном введении вакцины в рекомендованной дозе					
	100	48	10	3	3	Отсутствуют
	Безвредность при однократном введении двукратной дозы					
	10	10	10	6	-	Отсутствуют

Установлено, что однократное и двукратное введение вакцины в дозе 3 см³, и дозе 6 см³ (двукратно превышающей рекомендованную), не вызывает у животных нежелательных местных и системных реакций: анафилаксии, угнетения, снижения аппетита, адинамии.

Температура тела оставалась в пределах физиологической нормы, отмечено повышение данного показателя на 0,6±0,12 °С у телят и 0,5±0,22 °С у молодняка старшего возраста через 6 ч. после вакцинации, которое нивелировалось в течении суток. Пальпацией выявлено образование незначительной отёчности в области инъекции с повышением местной

температуры и незначительной болезненностью, которые проходили 24 - 72 ч. Отёк полностью рассасывался в течение 5-7 суток. После повторной вакцинации проявления были аналогичными. Случаев образования абсцессов не выявлено.

Также установлено, что введение препарата в рекомендованной дозе двукратно не вызывало у животных опытной группы каких-либо осложнений течения стельности. От вакцинированных коров получено 20 жизнеспособных телят, врожденных аномалий не зафиксировано.

Изучение безвредности вакцины для МРС

Безвредность экспериментальных образцов вакцины для овец проводили для всех возрастных групп животных, подлежащих вакцинации. Результаты представлены в табл. 8.

Таблица 8 - Безвредность вакцины «Клостбовак-8» для овец

Предприятие (вид восприимчивых объектов)	Ягнята 40-45 дневного возраста (голов)	Молодняк 4-5 мес. возраста (голов)	Сукотные овцематки (голов)	Доза первого введения см ³	Доза второго введения см ³	Серьёзные последствия применения
	Безвредность при однократном введении вакцины в рекомендованной дозе					
ЗАО «Глазырское»	15	15	10	3	-	Отсутствуют
ОАО «Племзавод им. Чапаева»	10	10	5	3	-	Отсутствуют
Безвредность при двукратном введении вакцины в рекомендованной дозе						
ЗАО «Глазырское»	10	10	10	3	3	Отсутствуют
ОАО «Племзавод им. Чапаева»	10	10	5	3	3	Отсутствуют
Безвредность при однократном введении двукратной дозы						
ЗАО «Глазырское»	4	4	4	6	-	Отсутствуют
ОАО «Племзавод им. Чапаева»	10	10	5	6	-	Отсутствуют

Установлено, что однократное и двукратное введение вакцины в дозе 3 см³, а также в дозе, двукратно превышающей рекомендованную, не вызывает у подопытных животных нежелательных местных и системных реакций: угнетения, снижения аппетита, адинамии.

Температура тела оставалась в пределах физиологической нормы, отмечено повышение данного показателя на 0,8±0,18 °С у ягнят и 0,6±0,28 °С у молодняка старшего возраста через 6 ч. после вакцинации, которое нивелировалось в течении суток. Пальпацией выявлено образование небольшой отёчности в области инъекции с повышением местной температуры и незначительной болезненностью, которые проходили 24 -

72 ч. Отёк полностью рассасывался в течение 5-7 суток. После повторной вакцинации проявления были аналогичными.

Проведенные опыты показали, что вакцина «Клостбовак-8» безвредна для ягнят и телят 40-45 дневного и 5-6 мес возраста, суягных и стельных животных как в рекомендованной, так и в удвоенной дозах.

Разработка методов контроля иммуногенной и антигенной активности поливалентной вакцины.

Для всесторонней оценки качества препарата предстояло разработать современный и приемлемый способ контроля качества иммуногенности.

Антигенную активность анатоксинов *C. perfringens*, *C. tetani* и *C. novyi*, изучали на кроликах массой 2,5 – 3,0 кг, которых иммунизировали двукратно подкожно с интервалом 28 дней в объеме 1,5 см³ (половина дозы для восприимчивых животных).

Для РН использовали стандартизированные токсины *C. perfringens* типов А, В, С, D, *C. novyi* с активностью 10, 15, 20, 25, 30 Dlm/мл и токсин *C. tetani* - 50, 100 и 200 Dlm/мл. Общую пробу сыворотки кроликов в 6 пробирок по 1,5 см³, затем вносили равный объем рабочих растворов токсинов: в первую - *C. perfringens* тип А, во вторую - *C. perfringens* тип В, в третью - *C. perfringens* тип С, в четвертую - *C. perfringens* тип D, в пятую - *C. novyi*, в шестую - *C. tetani*. Смеси перемешивали, выдерживали 45 мин при температуре 37 °С, а затем каждую пробу вводили 5 белым мышам внутривенно по 0,5 см³.

После введения смесей за животными устанавливали наблюдение в течение 72 ч. Реакцию нейтрализации считали положительной, если после введения различных разведений смеси, выживаемость мышей была не менее 80% при гибели не менее 4 контрольных белых мышей.

Таблица 9 - Определение дозы токсинов клостридий, нейтразуемых анитоксическими сыворотками

Контролируемый компонент	Дозы токсинов, Dlm/мл							
	10	15	20	25	30	50	100	200
<i>C. perf. mun A</i>	5/5	5/5	4/5	2/5	0/5	-	-	-
<i>C. perf. mun B</i>	5/5	5/5	5/5	4/5	2/5	-	-	-
<i>C. perf. mun C</i>	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	-	-	-
<i>C. perf. mun D</i>	5/5	5/5	5/5	4/5	1/5	-	-	-
<i>C. novyi</i>	5/5	5/5	5/5	4/5	1/5	-	-	-
<i>C. tetani</i>	-	-	-	-	-	5/5	5/5	5/5

В результате установлено, что белые мыши, которым вводили смеси с активностью токсинов *C. perfringens mun B* и *C*, а также *C. novyi* 10, 15 и 20 Dlm/мл, оставались живы в 100% случаев, и в 80-100% случаев по компонентам *C. perfringens* тип А и D. Также вакцина обеспечивала

накопление антител у кроликов, позволяющих нейтрализовать токсин *C. tetani* с активностью 100 и 200 Dlm/мл.

Иммуногенная активность вакцины

Иммуногенную и антигенную активность экспериментальных серий вакцины определяли согласно отработанного метода контроля в РН токсинов сывороткой крови вакцинированных кроликов, бактерины *C. chauvoei* и *C. septicum* - заражением двукратно вакцинированных морских свинок и белых мышей. Результаты контроля активности трех экспериментальных серий вакцины представлены в табл. 10.

Таблица 10 - Активность компонентов вакцины «Клостбовак-8» в опытах на лабораторных животных

Компонент	Метод исследования	Вид животных	Группа животных	Выживаемость животных после заражения
<i>C. perfringens</i> тип А	РН	Белые мыши	Опытные	4/5*
			Контрольные	0/5
<i>C. perfringens</i> тип В	РН	Белые мыши	Опытные	5/5
			Контрольные	0/5
<i>C. perfringens</i> тип С	РН	Белые мыши	Опытные	4/5
			Контрольные	0/5
<i>C. perfringens</i> тип D	РН	Белые мыши	Опытные	4/5
			Контрольные	0/5
<i>C. tetani</i>	РН	Белые мыши	Опытные	5/5
			Контрольные	0/5
<i>C. novyi</i> тип В	РН	Белые мыши	Опытные	4/5
			Контрольные	0/5
<i>C. chauvoei</i>	заражение	Морские свинки	Опытные	9/10**
			Контрольные	0/10
<i>C. septicum</i>	заражение	Белые мыши	Опытные	9/10
			Контрольные	0/10

Примечания: * - после заражения выжило 4 белых мыши из 5 зараженных и т.д.;

** - после заражения выжило 9 морских свинок из 10 зараженных и т.д.

Проведенные опыты показали, что вакцина «Клостбовак-8» обладают высокой иммуногенной активностью по компонентам *C. perfringens* *mun* А, В, С, D, *C.tetani*, *C. novyi (oedematiens) m. B.*, *C. chauvoei*, *C. septicum*, обеспечивая выживаемость не менее 80% лабораторных животных.

Также определены показатели гуморального иммунитета, который оценивали по накоплению токсиннейтрализующих антител. Для этого у 10 телят на второй день жизни после выпойки молозива, перед первой вакцинацией, а затем через 14 дней после двукратной вакцинации брали кровь для оценки титра антитоксических антител.

Таблица 11 - Титр антитоксических антител в крови вакцинированных телят при двукратной иммунизации.

№№ животного	Титр антитоксических антител, МЕ/мл				
	<i>C. perfringens</i> тип А	<i>C. perfringens</i> тип С	<i>C. perfringens</i> тип D	<i>C. oedematis</i> тип В	<i>C. tetani</i>
Смешанная проба (2-ой день жизни)	2,10	7,80	3,20	3,10	1,50
Смешанная проба до вакцинации (45 день жизни)	0	0,50	0,50	0	0
Смешанная проба (через 14 дней после 2-ой вакцинации)	3,50	11,50	10,00	3,50	4,50
Сыворотка от контрольных животных	0	0	0	0	0

Иммунизация стельных коров способствовала образованию у новорожденных телят высокого уровня колострального иммунитета. Титр антител в крови молодняка неонатального периода составлял к α -токсину *C. perfringens* 2.10 МЕ/мл, в-токсину *C. perfringens* - 7.80 МЕ/мл, ϵ -токсину *C. perfringens* 3,20 МЕ/мл, к *C. novyi* тип В -3.1 МЕ/мл, к токсину *C. tetani* - 1.50 МЕ/мл. Однако к 45 дня жизни (возрасту, рекомендованному для проведения первичной вакцинации) титры антител практически полностью исчезали, лишь у отдельных животных обнаруживались в виде следов. На этом фоне четко видно, что двукратная иммунизация способствовала значительному нарастанию титра антитоксических антител: к α -токсину *C. perfringens* 3,50 МЕ/мл, β -токсину *C. perfringens* – 11,50 МЕ/мл, ϵ -токсину *C. perfringens* - 10,00 МЕ/мл, к *C. novyi* тип В - 3,5 МЕ/мл, к токсину *C. tetani* – 4,50 МЕ/мл, что является показателем высокой иммуногенности.

Изучение интерференции компонентов в вакцине

Интерференцию компонентов изучали путем сравнения результатов иммуногенной активности моновакцин из каждого вида клостридий и экспериментальной серии препарата, куда компоненты были включены в эффективном количестве.

Для постановки РН использовали токсины *C. perfringens* типов А, С, D и *C. novyi* с активностью 20 Dlm/cm³ и токсин *C. tetani* с активностью 100 Dlm /cm³. Смеси токсин/сыворотка перемешивали, прогревали 45 мин при 37 °С, и вводили 5 мышам внутривенно по 0,5 см³. Для контроля использовали рабочие разведения токсинов с активностью 2 Dlm для белых мышей. Критерий оценки - выживаемость подопытных животных в течение 72 ч. Вакцину считали активной, если после введения смеси

токсина с сывороткой живыми остаются не менее 4 из 5 использованных животных при гибели не менее 4 контрольных белых мышей.

Результаты исследования представлены в табл. 12.

Таблица 12 - Иммуногенная активность компонентов *C. perfringens* типов А, С, D, *C. novyi* тип В, *C. tetani*

№	Наименование препарата	Доза	Количество зараженных	Количество выживших	Процент выживших
1.	Моновакцина <i>C. perfringens</i> mun А	0,5	5	5	100
		0,5			
	Клостбовак-8	1,0	5	5	100
		1,0			
Контрольные	-	5	0	0	
2.	Моновакцина <i>C. perfringens</i> mun С	0,5	5	5	100
		0,5			
	Клостбовак-8	1,0	5	5	100
		1,0			
Контрольные	-	5	0	0	
3.	Моновакцина <i>C. perfringens</i> mun Д	0,5	5	5	100
		0,5			
	Клостбовак-8	1,0	5	5	100
		1,0			
Контрольные	-	5	0	0	
4.	Моновакцина <i>C. tetani</i>	0,5	5	5	100
	Клостбовак-8	0,2	5	5	100
	Контроль	-	5	0	0
5.	Моновакцина <i>C. Novyi</i> тип В	0,5	5	5	100
	Клостбовак-8	0,2	5	4	80
	Контроль	-	5	0	0

Для проверки активности компонента *C. chauvoei* экспериментальную вакцину вводили 10 морским свинкам двукратно подкожно с интервалом 28 дней в дозе 1,0 см³, моновакцину в дозе 0,4 см³. Через 14 дней после второй вакцинации 10 иммунизированных и 10 контрольных морских свинок заражали лиофилизированной споровой культурой вирулентного штамма *C. chauvoei* в смертельной дозе. Результаты исследования представлены в табл. 13.

Таблица 13 – Иммуногенная активность компонента *C. chauvoei*

№№	Группа животных	Доза	Количество зараженных	Количество выживших	Процент выживших
1.	Вакцинированы моновакциной	0,4	5	5	100
		0,4			
2.	Вакцинированы Клостбовак-8	1,0	5	5	100
		1,0			
3.	Контрольные	-	5	0	0

Иммуногенность вакцины по компоненту *C. septicum* оценивали путем заражения вакцинированных белых мышей контрольным штаммом *C. septicum* № 1098. Моновакцину вводили 10 белым мышам массой 16–20 г двукратно подкожно с интервалом 25 дней в области холки в дозе по 0,2 см³, комплексный препарат в дозе 0,5 см³. Через 14 дней после второй вакцинации заражали 10 иммунизированных и 10 контрольных белых мышей споровой культурой штамма №1098 в дозе 3 LD₅₀. Заражающую культуру вводили внутривентрально по 0,5 см³. Результаты исследования представлены в табл 14.

Таблица 14 - Иммуногенная активность компонента *C. septicum*

№	Наименование препарата	Доза	Количество зараженных	Количество выживших	Процент выживших
1	Моновакцина <i>C. septicum</i>	0,2	10	10	100
		0,2			
2	Клостбовак-8	0,5	10	9	90
		0,5			
3	Контрольные	-	10	0	0

Вакцина обеспечивала 90% сохранность при заражении *C. septicum* и 100% при заражении *C. chauvoei*, 90-100% выживаемость мышей в РН токсинов *C. perfringens*, *C. novyi* и *C. tetani*. Компоновка вакцины однородными компонентами позволила избежать отрицательного влияния их друг на друга при индуцировании иммунитета против широкого спектра болезней, вызываемых клинически значимыми видами клостридий.

Стабильность препарата в процессе хранения

Для оценки стабильности свойств образцы препарата хранили в течение 24 мес при 2 – 8 °С и влажности 50%.

Через равные промежутки времени, 6, 12, 18 и 24 мес, образцы оценивали по внешнему виду, стерильности, изменению уровня водородных ионов и безвредности для лабораторных и восприимчивых животных, и иммуногенности. На протяжении всего срока наблюдения образцы вакцины оставались стабильными, стерильными и безопасными. Отмечалось незначительное снижение уровня рН, не выходящего за установленные параметры.

Изучение иммуногенности анатоксинов *C. tetani*, *C. novyi* и *C. perfringens* проводили по ранее описанной схеме, путем постановки РН

токсинами антителами сыворотки крови кроликов, вакцинированных препаратом, хранившимся 6, 12, 18 и 24 мес.

Таблица 15 - Стабильность антигенной активности анатоксинов в процессе хранения

Компонент	Группа животных	Выжило мышей после заражения в группе				
		Срок хранения вакцины, мес.				
		0	6	12	18	24
<i>C. perfringens</i> тип А	Оп.	4/5*	4/5	4/5	5/5	5/5
	Кон.	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
<i>C. perfringens</i> тип В	Оп.	5/5	4/5	5/5	4/5	4/5
	Кон.	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
<i>C. perfringens</i> тип С	Оп.	4/5	5/5	5/5	4/5	4/5
	Кон.	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
<i>C. perfringens</i> тип D	Оп.	4/5	5/5	4/5	5/5	5/5
	Кон.	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
	Кон.	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
<i>C. tetani</i>	Оп.	5/5	5/5	5/5	4/5	4/5
	Кон.	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5
<i>C. novyi</i> тип В	Оп.	4/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	Кон.	0/5	1/5	1/5	0/5	0/5

Примечания: * - после заражения выжило 4 белых мыши из 5 зараженных и т.д.

Стабильность иммуногенной активности *C. chauvoei* и *C. septicum* оценивали в опытах на морских свинках и белых мышах. Опытных и контрольных морских свинок через 14-16 дней после повторного введения препарата, заражали контрольным штаммом *C. chauvoei* R₁₅ в дозе 20 Ld₅₀, срок наблюдения за животными – 5 суток.

Вакцинированных и контрольных белых мышей заражали *C. septicum* №1098 в дозе 3 Ld₅₀, срок наблюдения – 3 суток.

Таблица 16 - Стабильность иммуногенной активности компонентов *C. chauvoei* и *C. septicum* в процессе хранения

Компонент	Группа животных	Выжило животных после заражения				
		Срок хранения вакцины, мес.				
		0	6	12	18	24
<i>C. chauvoei</i>	Оп.	9/10*	10/10	9/10	10/10	8/10
	Кон.	0/10	1/10	1/10	0/10	0/10
<i>C. septicum</i>	Оп.	9/10**	8/10	10/10	9/10	9/10
	Кон.	0/10	0/10	1/10	1/10	1/10

Примечание: * - после заражения выжило 9 морских свинок из 10 зараженных и т.д.;

** - после заражения выжило 9 белых мышей из 10 зараженных и т.д.

Из представленных в табл. 15 и 16 данных видно, что при температуре 2-8 °С и влажности около 50% иммуногенные свойства всех компонентов вакцины остаются стабильными на протяжении как минимум 18 мес наблюдения, что является обоснованным сроком хранения.

Длительность иммунитета у лабораторных животных

Изучение длительности иммунитета, индуцируемого экспериментальной вакциной против эмфизематозного карбункула, проводили на морских свинках, для чего были сформированы 3 группы по 75 голов в каждой. Первую группу свинок вакцинировали экспериментальной вакциной двукратно с интервалом 28 дней; вторую группу «Вакциной против эмфизематозного карбункула КРС и овец инактивированной», животных контрольной группы не вакцинировали. Животных содержали в течение 13 мес. С интервалом 30 дней от каждой группы отбирали 5 морских свинок и заражали споровой культурой *S. chauvoei* в дозе 20 Ld₅₀.

Таблица 17 - Продолжительность иммунитета по *S. chauvoei*

№ №	Группа животных	Выживаемость иммунизированных и контрольных морских свинок при заражении <i>S. chauvoei</i>												
		Срок, мес.												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1.	Моновакцина	5/5	5/5	4/5	5/5	5/5	4/5	4/5	2/5	1/5	-	-	-	-
2.	Клостовак-8	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	4/5	4/5	1/5
3.	Контрольная	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5

Экспериментальная вакцина вызывает у морских свинок напряжённый иммунитет, обеспечивающий 100% выживаемость иммунизированных животных первые 9 мес наблюдения и не менее 80% далее до 12 мес, что соответствует требованиям ГОСТ №32731-2014.

Полученные результаты позволяют считать обоснованным заложенную в препарат дозу компонента *S. chauvoei* 2,5 млрд. мкр.к./мл при двукратном введении, а также установить продолжительность иммунитета против эмфизематозного карбункула, вызываемого экспериментальной вакциной при двукратном введении – 12 мес.

Продолжительность иммунитета к токсоидам, оценивали по титру антител, выраженных в МЕ. Десять кроликов опытной группы вакцинировали экспериментальной вакциной двукратно с интервалом 25 дней в объеме 1,5 мл; пять контрольных животных не вакцинировали. Через 14 дней, а затем через 3, 6, 9 и 12 мес, у кроликов брали кровь, получали сыворотки и исследовали их в РН. Результаты РН учитывали по выживаемости мышей через 24 ч после введения смеси.

Таблица 18 - Продолжительность иммунитета по анатоксинам

Наименование компонента	Титры антитоксических антител в сыворотке крови кроликов после вакцинации, МЕ/см ³ , n=15					
	До вакцинации	14 дней	3 мес	6 мес	9 мес	12 мес
<i>C. perfringens m. A</i>	0	3,5	3,5	2,0	1,5	0,5
<i>C. perfringens m. C</i>	0	14,0	14,5	11,0	8,0	5,0
<i>C. perfringens m. D</i>	0	10,5	12,5	7,0	6,5	5,0
<i>C. novyi mun B</i>	0	3,5	2,0	3,0	4,5	3,0
<i>C. tetani</i>	0	2,5	2,0	2,0	1,5	1,0

До иммунизации в крови подопытных животных не было фоновых антител к исследуемым токсинам. Через 14 дней после повторной вакцинации у кроликов титр антитоксических антител составил к *C. perfringens* т. А - 3,5 МЕ/см³, *C. perfringens* т. С - 14,0 МЕ/см³, *C. perfringens* т. D - 10,5 МЕ/см³, *C. novyi* тип В - 2,5 МЕ/см³, *C. tetani* - 2,5 МЕ/см³. В течение первых трех мес после иммунизации титр антител в крови сохранялся практически на неизменном уровне, далее происходили постепенное снижение. Через шесть месяцев титр антител составлял примерно половину от начального уровня, к 12 мес снизился в 3-4 раза.

Через 12 мес все подопытные кролики были заражены вирулентными культурами клостридий по схеме контроля иммуногенности вакцины против браздота овец. Опыт показал, что несмотря на снижение титра антител, у животных сохраняется невосприимчивость к заражению, обеспечивающая 80-100% выживаемость животных при гибели всех контрольных. Полученные результаты позволяют считать длительность специфического иммунитета 12 мес, после чего необходима ревакцинация.

Продолжительность иммунитета у восприимчивых животных

Длительность иммунитета определяли путем заражения иммунизированных овец через 14 дней после иммунизации, а затем через 6, 12 и 18 месяцев. Исследование проведено в отношении компонентов *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. tetani* и *C. novyi mun B*.

Для овец заражающую дозу каждого штамма устанавливали согласно литературным данным и дополнительно проверяли на ограниченном количестве восприимчивых животных. Установлено, что величина Ld₅₀ составляет для культуры *C. chauvoei* R₁₅ 750±8,0 млн. живых спор возбудителя, *C. septicum* 2,5±0,3 млрд спор, *C. novyi* 15±1,6 млрд спор. Доза столбнячного токсина, используемого для заражения овец,

составляла 1000 Dlm для белых мышей. Все заражающие культуры и токсин вводили внутримышечно в объеме 2 мл, *C. chauvoei* дополнительно смешивали с равным объемом хлористого кальция. В опыте с каждым антигеном было задействовано по три иммунизированных и два интактных животных.

Таблица 19 - Продолжительность иммунитета у вакцинированных овец

№№	Заражающая культура	Отношение количества выживших животных к количеству использованных в опыте, при заражении контрольными штаммами клостридий				
		Группа животных	Срок, мес.			
			1	6	12	18
1.	<i>C. chauvoei</i>	Опытная	3/3	3/3	3/3	1/3
		Контрольная	0/2	0/2	0/2	0/2
2.	<i>C. septicum</i>	Опытная	3/3	3/3	3/3	1/3
		Контрольная	0/2	1/2	0/2	0/2
3.	<i>C. novyi</i>	Опытная	3/3	3/3	3/3	2/3
		Контрольная	0/2	0/2	0/2	0/2
4.	<i>C. tetani</i> (токсин)	Опытная	3/3	3/3	3/3	3/3
		Контрольная	0/2	0/2	0/2	0/2

При заражении овец, проведенном через один, 6 и 12 мес после иммунизации, отмечается 100% выживаемость подопытных животных, при гибели овец в контрольных группах. При этом при заражении через один и 6 мес у вакцинированных овец не отмечено существенных проявлений инфекционного процесса на месте инъекции культур, кроме повышения температуры. При заражении через 12 и 18 мес у иммунизированных овец наблюдалось беспокойство, проявляющееся подергиванием конечностью, в которую инъецирована культура, животные как бы берегли её, старались держать на весу, оглядывались на неё. Наблюдалось повышение температуры и образование отеков, однако все признаки исчезали самостоятельно через 24-48 ч без дополнительного лечения.

Таким образом установлено, что вакцина обеспечивает образование иммунитета на срок не менее 12 мес, что подтверждается заражением как лабораторных, так и восприимчивых животных.

Специфическая эффективность вакцины

Специфическую эффективность опытно-промышленных серий вакцины «Клосовак-8» проводили в неблагополучных по клостридиозам хозяйствах Московской обл., Республики Мордовия, Ставропольского и Краснодарского краев. В опытах использовано 874 голов КРС различного возраста. Животных иммунизировали подкожно в области средней трети

шеи двукратно с интервалом 21-28 дней в объеме 3 см³. Для создания колострального иммунитета у телят проводили двукратную иммунизацию стельных коров с таким расчетом, чтобы вторая вакцинация была за 25-30 дней до отела.

Специфическая профилактика анаэробной энтеротоксемии

Для оценки эффективности вакцины против анаэробной энтеротоксемии было привито 140 стельных коров. Критерий оценки - получение здорового молодняка от подопытных животных, и его сохранность в течение первых 2 месяцев жизни.

Всего от 140 вакцинированных коров получено 137 жизнеспособных телят, из которых до 30 дневного возраста заболело 18, два пали через 30 и 44 часа после начала болезни. У заболевших телят отмечались диспепсия, легкое угнетение, снижение аппетита. Лечение антимикробными препаратами приводило к быстрому выздоровлению животных в течение 2-4 сут. Проведенное бакисследование материала от больных телят не выявило возбудителей анаэробной энтеротоксемии. Во всех случаях причиной заболевания и гибели были токсигенные эшерихии. Иммунизация позволила обеспечить сохранность 98% телят в опытной группе, тогда как до вакцинации заболеваемость телят анаэробной энтеротоксемией составляла 32%, смертность 76%.

Во втором хозяйстве, расположенном в Мордовии, где также бактериологически была подтверждена анаэробная энтеротоксемия, вызванная *C. perfringens* типов С и D, заболеваемость телят составила 78,3%, смертность до 48,2%. С целью профилактики заболевания была сформирована группа стельных коров и нетелей в количестве 27 голов, которых иммунизировали экспериментальной серией вакцины «Клостбовак-8». В качестве контрольной группы оставлено 16 коров, которым одновременно с иммунизацией вводили физиологический раствор.

После отела у всех животных опытной группы отмечено отсутствие новых случаев заболевания и гибели молодняка с признаками анаэробной энтеротоксемии, сохранность телят составила 100%. Стоит отметить, что у части подопытных телят также наблюдались признаки различных желудочно-кишечных расстройств, но они протекали доброкачественно и не приводили к гибели. Среди телят, полученных от 16 контрольных коров, заболело анаэробной энтеротоксемией 9, из которых пало 7 голов. Сохранность молодняка в опытной группе составила 100%, тогда как в контрольной группе лишь 66%.

Специфическая профилактика злокачественного отека у коров

Определение эффективности вакцины в отношении возбудителей злокачественного отека проведено в СПА «Колхоз имени Ворошилова» Ставропольского края.

Вакцинация проведена в связи с выявлением на МТФ нескольких случаев гангренозных маститов. Из отелившихся 56 коров заболело 4, все они погибли. При проведении комплексного бактериологического исследования патологического материала, выделены культуры *S. septimus* и *S. novyi*.

Для профилактики заболевания 58 стельных коров и нетелей вакцинировали препаратом «Клостбовак-8» в дозе 3 см³ с интервалом 28 дней. С целью объективной оценки эффективности препарата в качестве контрольной группы оставлено 60 невакцинированных животных.

За 6 мес наблюдения в подопытной группе не было выявлено животных, у которых возникающие маститы осложнялись бы анаэробной микрофлорой, что приводило к развитию гангренозного мастита. При этом в контрольной группе в течение полугода вновь было зафиксировано два случая гибели коров с гангренозными поражениями вымени и мышц тазовых конечностей. Сохранность вакцинированного поголовья составила 100%, что свидетельствует о высокой специфической эффективности вакцины «Клостбовак-8» для профилактики клостридиозов КРС.

Аналогичная ситуация с заболеваемостью злокачественным отеком наблюдалась в ЗАО «Путиловец» Краснодарского края. Через несколько дней после отела у животных с хорошей упитанностью пропадал аппетит, наблюдалось угнетение, быстро прогрессировало исхудание. В последующем в области крупа либо бедренной группы мышц, реже другой лаколizations, образовывались отеки, постепенно опускающиеся по подкожной клетчатке вниз. При надавливании в области поражений отчетливо слышались крепитирующие звуки.

Из отелившихся 156 гол заболело 92. Несмотря на предпринятое лечение, восемьдесят коров погибли, либо были вынужденно убиты по причине не совместимых с жизнью поражений опорно-двигательного аппарата. При проведении комплексного бакисследования

патологического материала от 5 животных, выделены культуры *C. perfringens* тип А, *C. septicum*, *C. oedematiens* и *C. sordellii*, в отдельных случаях вместе.

Для профилактики заболевания вакцинировано «Клостбовак-8» 135 гол. За период наблюдения не было случаев выбраковки животных с поражением мышц и развитием злокачественных отеков. Всего из группы заболело и выбыло 2 коровы, у одной из которых отмечалось травмирование копытца, у второй - плеввропневмония. Сохранность поголовья после вакцинации составила 98,6%, тогда как до вакцинации - 52%, что свидетельствует о высокой эффективности вакцины для профилактики клостридиозов, вызванных *C. perfringens* тип А, *C. septicum*, *C. novyi*.

Еще одно исследование проведено в ОАО «Кубань» Краснодарского края. Основанием для вакцинации послужило увеличение случаев заболевания и падежа коров. За 6 мес, предшествующих проведению опыта, зафиксирован 51 случай заболевания коров после отела (общее количество отелов за этот период составило 387). Несмотря на предпринятое лечение из них 37 коров было вынужденно убито. При проведении лабораторных исследований установлено, что возбудителями заболевания являются *C. perfringens* тип А и *C. septicum*. Для профилактики заболевания вакцинировано 68 стельных коров. После отела среди животных опытной группы не выявлено случаев гибели, сопровождающихся злокачественным поражением различных органов. Сохранность вакцинированных животных составила 100%, полученного от них молодняка – 98,1%.

Профилактика столбняка сельскохозяйственных животных

Для определения эффективности вакцины против столбняка иммунизировано «Клостбовак-8» 214 коров и 350 телят.

Вакцинация проведена в связи с выявлением нескольких случаев заболевания телят 7 - 30 сут возраста столбняком, при этом в трех случаях у новорожденных с омфалитами и у одного теленка при загрязнении раны после обезроживания. Все случаи закончились гибелью животных.

За период наблюдения среди вакцинированных коров и полученного молодняка, а также среди вакцинированных телят не было выявлено новых случаев заболевания, сохранность животных составила 100%. Также среди подвергнутого вакцинации молодняка при выпасе в летне-осенний период не наблюдалось случаев заболевания и гибели животных от различных анаэробных инфекций, спорадические случаи которых отмечались в хозяйстве ежегодно.

Эффективность специфической профилактики у КРС подтверждена при таких болезнях как анаэробная энтеротоксемия, злокачественный отек, вызванный ассоциацией различных видов клостридий, столбняк. Сохранность поголовья животных после вакцинации составила 98-100%. При этом положительное воздействие использования препарата проявлялось не только в уменьшении случаев заболевания и гибели животных от болезней анаэробной этиологии, но также отмечены и косвенные признаки оздоровления стада, например уменьшилось количество случаев заболевания конечностей, увеличивалась молочная продуктивность.

Эффективность применения вакцины в неблагополучных по клостридиозам овцеводческих хозяйствах

Эффективность препарата оценивали на маточном поголовье овец и полученных от них ягнятах. Вакциной «Клостбовак-8» иммунизировали овцематок двукратно за 55-60 и 30-35 дней до окота, полученных от них ягнят прививали в возрасте 45 дней двукратно с последующей ревакцинацией в 6 мес. Опытную и контрольную группы животных содержали в естественных условиях на выпасе с дополнительной подкормкой концентрированными кормами один раз в день.

Оценка эффективности использования вакцины проводили по следующим критериям: отсутствие гангренозных поражений органов у маток в период окотов, сохранность молодняка в неонатальный период, отсутствие случаев заболеваний анаэробной этиологии за период откорма.

Всего было вакцинировано 800 овцематок, еще 140 голов оставлены в качестве контроля. От вакцинированных маток получено 1746 ягненка, при этом не было случаев выбытия от гангренозных поражений органов

репродуктивной системы после окотов. Также до достижения ягнятами 40-45 дневного возраста не отмечалось случаев массовой гибели ягнят от инфекционных болезней анаэробной этиологии. Падеж молодняка (12 голов) происходил в виде единичных случаев, связанных с безоарной болезнью, колибактериозом и травмами.

В контрольной группе от 140 овец получено 228 ягнят, при этом в группе зафиксировано 3 случая гибели овец после окота с интоксикацией и поражением репродуктивных органов, и два случая гангренозного мастита. Проведенное вскрытие и бактериологическое исследование подтвердило диагноз – злокачественный отек - выделены культуры *S. perfringens* и *S. novyi*. У молодняка контрольной группы в первые дни жизни наблюдались интоксикация, диспепсические явления, диарея, дегидротация. В первые 5 –7 дней жизни погибло 38 ягнят, при бактериологическом исследовании выделена культура *S. perfringens* тип С. Сохранность молодняка животных до 45 дневного возраста составила в опытной группе составила почти 100%, в контрольной группе 82%.

Также были случаи гангренозного поражения тканей в контрольной группе у ягнят после кастрации. У больных (13 голов) в области живота и мошонки обнаружены значительные отеки, распространяющиеся на задние конечности. При пальпации отеки крепитируют, из ран выделяется темная, смешанная с кровью жидкость специфического запаха. Из числа больных два ягненка были убиты с диагностической целью, остальные отделены от стада и подвергнуты лечению антибиотиками широкого спектра действия и введением сыворотки крови от вакцинированных овец. При проведенном бактериологическом исследовании из материала выделены культуры *S. novyi* и *S. perfringens* тип А.

Во втором хозяйстве, также расположенном в Краснодарском крае, исследования проводились на поголовье МРС различных возрастных групп. Вспышки браздота наблюдались ежегодно осенью при выпасе животных.

При последней зафиксированной вспышке заболевания, возникшей в отаре откормочного поголовья валухов, общей численностью 178 голов,

заболело и погибло 44 животных, еще 19 были вынужденно убиты. Заболеваемость составила 35,4% при 100% смертности.

Для профилактики браздота проведена вакцинация всего поголовья - 719 голов МРС. Каких-либо изменений в режим содержания и кормления не вносили, овцы содержали в естественных условиях на выпасе. Наблюдение за животными вели в течение 12 мес до следующей вакцинации.

В группе вакцинированных животных не зафиксировано случаев выбытия от болезней анаэробной этиологии: браздота, эмкара, злокачественного отека, гангренозных поражений органов репродуктивной системы и маститов. За весь период вскармливания (до достижения ягнятами 40-45 дневного возраста) не отмечалось случаев массовой гибели ягнят от анаэробной дизентерии и энтеротоксемии.

Проведенные опыты подтверждают образование у вакцинированных животных напряженного иммунитета, что ведет к стойкому благополучию стада по инфекционным болезням анаэробной этиологии, несмотря на содержание овец в неблагополучной местности.

Проведенные исследования наглядно подтверждают безопасность и эффективность вакцины «Клостбовак-8» для профилактики клостридиозов в неблагополучных овцеводческих хозяйствах, что позволяет рекомендовать её для профилактики инфекционных болезней анаэробной этиологии у суягных овцематок и молодняка.

Заключение

Клостридиозы являются наиболее актуальными проблемами современного молочного и мясного животноводства. В связи с быстротечностью инфекционного процесса, высокой токсичностью возбудителей и обширностью поражения тканей, лечение часто оказывается бесперспективным и приводит к выбытию высокопродуктивных животных.

Специфическая профилактика является единственным надежным способом предотвращения анаэробных инфекций, для чего в мире разработано и применяется значительное количество иммунобиологических препаратов с широким антигенным составом. В нашей стране длительное время не придавали должного значения этой

проблеме, поэтому вакцин для профилактики злокачественного отека, некротического гепатита, анаэробной энтеротоксемии и некоторых других болезней анаэробной этиологии у КРС, разработано не было. Единственным препаратом для профилактики анаэробных инфекций в РФ у КРС являлась вакцина против эмфизематозного карбункула.

Интенсивное развитие скотоводства в последние годы привело к необходимости создания новых средств специфической профилактики инфекционных болезней, в первую очередь клостридиозов. Для решения этой проблемы было проведено широкомасштабное исследование, включающее изучение эпизоотологической ситуации по распространенности клостридиозов, изучению этиологической значимости определенных видов клостридий. Было исследовано 2913 проб материала, полученного из 16 регионов РФ, в результате чего установлено широкое распространение клостридиозов, наиболее клинически значимыми возбудителями которых являются *C. septicum*, *C. perfringens* *munov* A, C, D, *C. novyi*, *C. sordellii*, *C. tetani*. Несколько реже выявлялись виды *C. chauvoei*, *C. hystolyticus*, *C. innocuum*, *C. sporogenes*, *C. bifermentans*.

На основании полученных данных, нами был научно обоснован антигенный состав нового препарата для иммунизации животных, который включал *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. perfringens* *munov* A, C, D, *C. novyi*, *C. tetani*. Поскольку ранее было доказано, что при анаэробных инфекциях приоритетное значение имеет антитоксический иммунитет, проведено сравнительное изучение вирулентности и токсигенных свойств имеющихся и вновь выделенных штаммов клостридий. Селекционированные культуры возбудителей клостридиозов лиофилизированы, проверены на выраженность и стабильность свойств, аттестованы как MSB. Использование расплектов позволяет уйти от пересевов культур и обеспечить выпуск препарата стабильно высокого качества.

Поскольку для получения качественных препаратов против клостридиозов требуется стабильное накопление высокоактивных специфических токсинов, нами была усовершенствована технология их получения. Проведена замена мясо-печеночных питательных сред,

традиционно используемых ветеринарными биофабриками при культивировании анаэробов, на среды на основе перевара казеина, хорошо зарекомендовавших себя в медицинской биологической промышленности. Также отработан метод щадящей детоксикации антигенов, проходящий в несколько этапов. При этом в полученную в реакторе бактериальную культуру вносится небольшое количество формалина, что ведет к частичному обезвреживанию культуры и образовавшегося токсина. После этого проводят сепарацию бактериальной массы, которую уничтожают, а очищенную токсинсодержащую жидкость дополнительно инактивируют внесением небольших доз формалина. Это позволяет сохранить антигенность анатоксина, поскольку при инактивации путем однократного внесения формалина в количестве 0,8-1,0% к объему, как это предусматривалось технологией ранее, значительно снижается иммуногенность получаемых анатоксинов за счет грубой денатурации белков.

Наиболее важным изменением технологии изготовления моноантигенов клостридий является использование для концентрирования и очистки анатоксинов метода ультрафильтрации. Ранее все производимые в РФ для животных вакцины против клостридиозов изготавливались путем адсорбции бактериальных культур и содержащихся в среде анатоксинов добавлением адьювантов, как правило алюмокалиевых квасцов или гидроокиси алюминия. Использование тангенциальной фильтрации позволило во первых в большей степени концентрировать целевые продукты (до 10-15 раз); во вторых это позволило получать антигены с высокой степенью очистки от балластных веществ и метаболитов, образующихся при культивировании. Это способствовало получению безопасных препаратов, что особенно проявляется в уменьшении местного раздражающего действия, а также увеличению напряженности иммунитета и его продолжительности, поскольку в организм попадают только отвечающие за иммуногенность антигены; в третьих технология производства позволяет уменьшить дозу препарата до 3 мл, что удобно с технологической точки зрения.

Перед конструированием нового препарат предварительно проверена иммуногенность каждого компонента и установлена доза,

обеспечивающая индуцирование защитного уровня антител. Компоненты вносились в количестве, обеспечивающем 80-100% выживание после заражения иммунизированных животных, либо высокие титры антитоксических антител. Проведенное сравнение иммуногенности комплексного поливалентного препарата с иммуногенной активностью каждого компонента отдельно, позволило установить отсутствие интерференции антигенов в вакцине, а в некоторых случаях наличие синергидного эффекта, например между серотипами *C. perfringens* различных типов.

Разработанная вакцина содержит сбалансированные в антигенном и иммуногеном отношении бактериальные и антитоксические антигены, и создает напряженный иммунитет против наиболее клинически значимых возбудителей клостридиозов, обеспечивая невосприимчивость животных к заражению эмфизематозным карбункулом, злокачественным отеком, столбняком, анаэробной энтеротоксемией, анаэробной дизентерией, браздотом и браздотоподобными заболеваниями, некротическим гепатитом, некротическим энтеритом и другими болезнями, ассоциируемыми с анаэробами.

Вакцина обладает стабильностью, антигенной и иммуногенной активностью для создания напряженного и длительного, не менее 12 мес, иммунитета у вакцинированных животных, а также колострального иммунитета у молодняка, полученного от иммунизированных матерей.

Проведенные доклинические и клинические исследования позволили установить, что вакцина обладает безвредностью в установленной дозе, для овец и крупного рогатого скота всех возрастных групп. Специфическая эффективность подтверждена опытами, проведенными в 5 скотоводческих и 2 овцеводческих хозяйствах.

Таким образом, в результате проведенной работы была разработана и внедрена в практику первая отечественная вакцина против клостридиозов КРС и овец «Клостбовак-8», создающий при двукратном введении у животных напряженный иммунитет к болезням, вызванным *C. perfringens* типов *A*, *B*, *C*, *D*, *C. chauvoei*, *C. tetani*, *C. novyi*, *C. septicum*, продолжительностью не менее 12 мес. Препарат зарегистрирован

Россельхознадзором и применяется в ветеринарной практике. За период регистрации было реализовано более 1 млн. доз вакцины.

Выводы

1. Разработана, зарегистрирована Россельхознадзором РФ и внедрена в ветеринарную практику первая отечественная вакцина против клостридиозов овец и крупного рогатого скота «Клостбовак-8», индуцирующая у вакцинированных животных при двукратном введении напряженный иммунитет против злокачественного отека, эмфизематозного карбункула, столбняка, бродзота, анаэробной энтеротоксемии, анаэробной дизентерии, некротического гепатита и энтерита, продолжительностью не менее 12 месяцев.

2. Определен видовой спектр возбудителей клостридиозов крупного рогатого скота, из которых наиболее этиологически значимыми являются: *C. septicum* – 34,5% случаев, *C. perfringens mun A* - 23,25%, *C. perfringens mun C* - 14,25 %, *C. perfringens mun D* – 6,5%, *C. sordellii* – 6,5%, *C. novyi/oedematiens* – 2,5 %, *C. chauvoei* – 2,5%. Другие выявленные виды (*C. sporogenes*, *C. tetani*, *C. bifermentans*, *C. baratii*, *C. difficile*, *C. hastiforme*, *C. histolyticum*, *C. innocuum*, *C. sporogenes*, *C. tertium*) встречаются в пределах 1-2 %.

3. Усовершенствованная технология производства анатоксинов клостридий, с заменой мясо-печеночных питательных сред, традиционно используемых в ветеринарной биопромышленности для культивирования анаэробов, средами на основе кислотного гидролизата казеина; изменением режимов культивирования штаммов и инактивации токсинов; концентрированием и очисткой анатоксинов ультрафильтрацией; позволяет увеличить выход целевых продуктов в 3-10 раз.

4. Селекция производственных штаммов клостридий путем отбора отдельных колоний с последующей проверкой токсигенности клонов, позволила повысить образование токсинов *C. perfringens mun A* с $5 \pm 1,24$ до $80 \pm 6,7$ Dlm/cm³, *C. perfringens mun C* с $98 \pm 12,60$ до 1600 ± 956 Dlm/cm³, *C. perfringens mun D* с $250 \pm 35,6$ до 1500 ± 178 Dlm/cm³, *C. novyi mun B* с $110 \pm 8,5$ до 1500 ± 132 Dlm/cm³, *C. tetani* с 2000 ± 398 до 18320 ± 2564 Dlm/cm³.

5. Установлено, что выпуск препарата стабильно высокого качества достигается использованием *Master Seed Bacteria* производственных и контрольных штаммов *C. perfringens mun A* №28, *C. perfringens mun C* - ВТ, *C. perfringens mun D* №91, *C. novyi* №34, *C. septicum* №59 и 1098, *C. chauvoei R₁₅*, *C. tetani* №8, которые аттестованы и заложены на хранение.

6. Подтверждено отсутствие интерференции компонентов в вакцине «Клостбовак-8», при объединении антигенов *C. perfringens mun A*, *C. perfringens mun C*, *C. perfringens mun D*, *C. novyi mun B*, *C. septicum*, *C. chauvoei* и *C. tetani* в эффективном количестве, а также наличие синергидного эффекта между различными типами *C. perfringens* за счет вырожденного перекрестного иммунитета.

7. Использование мембранных методов очистки и концентрирования анатоксинов позволяет сконструировать восьмикомпонентную вакцину против клостридиозов животных, уменьшить дозу препарата до 3,0 см³ и одновременно увеличить длительность специфического иммунитета до 12 месяцев.

8. Вакцина «Клостбовак-8» безвредна для всех возрастных групп крупного и мелкого рогатого скота при введении в рекомендованной - 3 см³ и удвоенной - 6 см³ дозах; обладает высокой иммуногенной активностью, защищая от заражения от 80 до 100 % иммунизированных животных; стабильна на протяжении 18 месяцев хранения, что подтверждено результатами доклинических и клинических испытаний.

9. Установлено, что вакцина «Клостбовак-8» способствует образованию высокого титра колостральных антител: к α -токсину *C. perfringens* не менее 2,10 МЕ/мл, β -токсину *C. perfringens* – 7,80 МЕ/мл, ϵ -токсину *C. perfringens* - 3,20 МЕ/мл, к токсину *C. novyi mun B* – 3,1 МЕ/мл, к токсину *C. tetani* – 1,50 МЕ/мл, у молодняка неонатального возраста, при своевременной выпойке молозива от двукратно иммунизированных в период беременности коров и овцематок.

10. Установлено, что двукратная иммунизация животных вакциной «Клостбовак-8» вызывает образование титра антитоксических антител к α -токсину *C. perfringens* не менее 3,50 МЕ/мл, β -токсину *C. perfringens* – 11,50 МЕ/мл, ϵ -токсину *C. perfringens* - 10,00 МЕ/мл, токсину *C. novyi*

mun B-3,5 МЕ/мл, токсину *C. tetani* – 4,50 МЕ/мл, что является показателем высокой специфической активности препарата.

11. Разработанный и внедренный в практику способ количественной оценки антигенной активности вакцины «Клостбовак-8», позволяет объективно оценить напряженность специфического иммунитета по количеству нейтрализуемых летальных доз токсинов клостридий, обеспечивающего нейтрализацию не менее 20 DIm/cm³ α -, β -, ϵ -токсинов *C. perfringens* и токсина *C. novyi*, и 200 DIm/cm³ токсина *C. tetani*.

Практическое использование результатов исследований

Результаты, полученные при выполнении исследований, составляют основу разработанных методических указаний «Лабораторная диагностика клостридиозов животных», включающих современные методы диагностики клостридиозов, в том числе идентификации наиболее этиологически значимых видов возбудителей. МУК утверждены РАН 28.08.2017.

Разработана, зарегистрирована и внедрена в практику вакцина поливалентная против клостридиозов овец и крупного рогатого скота инактивированная «Клостбовак-8».

Разработана технология изготовления анатоксинов клостридий методом мембранной фильтрации.

Разработан способ контроля иммуногенной активности вакцины, позволяющий количественно оценить напряженность антитоксического иммунитета у вакцинированных животных. Способ включен в нормативно-технические документы (промышленный регламент, СТО организации) по изготовлению и контролю вакцины Клостбовак-8.

Разработана и утверждена нормативно-технические документы по изготовлению и контролю качества производственных штаммов клостридий: СТО на штаммы *C. perfringens* *munov A*, *C* и *D*, *C. septicum*, *C. novyi* *mun B*, *C. tetani*, *C. chauvoei*.

Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы.

Ветеринарным специалистам, курирующим животноводческие предприятия и индивидуальные КФХ, для специфической профилактики анаэробных инфекций КРС и МРС в неблагополучных и угрожаемых по клостридиозам зонах, рекомендуется использовать лекарственный

иммунобиологический препаратт «Вакцина поливалентная против клостридиозов овец и крупного рогатого скота инактивированную».

Вести мониторинг распространенности клостридиозов, для чего направлять на бактериологические исследования материал от животных, заболевших и/или павших с признаками клостридиозов. Это позволит выявлять наиболее клинически значимые виды возбудителей и проводить своевременную корректировку антигенного состава средств специфической профилактики анаэробных инфекций.

Проводить депонирование в признанных коллекциях микроорганизмов штаммы возбудителей анаэробных инфекций животных, обладающие полезными с технологической точки зрения свойствами: высокой токсигенностью, стабильностью накопления токсинов, устойчивостью к диссоциации, с целью возможного использования в производстве иммунобиологических средств для животных.

При бактериологическом исследовании материала от больных и павших с признаками клостридиозов животных, использовать разработанные методические указания «Лабораторная диагностика клостридиозов животных», утвержденные РАН 28.08.2017 г.

Селекционированные и аттестованные как MSB и WSB производственные и контрольные штаммы *C. chauvoei* R₁₅, *C. tetani* Kolle №8, *C. perfringens* mun A №28, *C. perfringens* тип С ВТ, *C. perfringens* тип D №91, *C. septicum* №59, *C. septicum* №1098, *C. novyi* №34, *C. sordellii* №3, использовать при изготовлении новых серий вакцины против клостридиозов КРС и овец, что позволит обеспечить высокое качество и стабильность свойств выпускаемой продукции.

Список работ, опубликованных по теме диссертации, в рецензируемых научных изданиях перечня ВАК

1. Капустин, А.В. Результаты клинических исследований безопасности, антигенной активности и эффективности применения инактивированной вакцины против эшерихиоза и клостридиозов свиней. // Капустин А.В., Лаишевцев А.И., Алипер Т.И., Верховский О.А., Кунаков К.Ю., Котельников А.П., Мишин А.М., Шемельков Е.В. // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences.-6(66)- June 2017 - С. 352-248.

2. Складаров, О.Д. Изучение безопасности применения ассоциированной вакцины против клостридиозов КРС для животных

различных возрастных и физиологических групп. / Скляр, О.Д. Капустин А.В., Лаишевцев А.И. // Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2017- №65-С. 124-130.

3. Лаишевцев, А.И. Видовая идентификация бактерий рода *Pasteurella* на основе биохимических свойств в соответствии с современной классификацией. / Лаишевцев А.И., **Капустин А.В.** // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences.- 2017 -Т. 61- № 1 - С. 320-328.

4. Капустин, А.В. Способы контроля иммуногенной активности ассоциированной вакцины против инфекционных болезней крупного рогатого скота, вызванные различными видами бактерий рода *Clostridium spp.*/ Капустин, А.В. // Ветеринария и кормление. 2017. - №3.- С. 47-49.

5. Лаишевцев, А.И. Обзор современных средств специфической профилактики пастереллёза и мангеймиоза сельскохозяйственных животных. / Лаишевцев А.И., **Капустин А.В.**, Пименов Н.В. // Ветеринария и кормление. - 2017. - № 3. - С. 64-66.

6. Лаишевцев, А.И. Экссудативный эпидермит у свиней: особенности этиологии и проявления / Лаишевцев, А.И., **Капустин А.В.**, Пименов Н.В., Пименова В.В., Плыгун С.А., Якимова Е.А. // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. - 2017. - № 5. - С.296-305.

7. Лаишевцев, А.И. Антибиотикорезистентность эпизоотических изолятов *Mannheimia haemolytica*, выделенных на территории Российской Федерации. / Лаишевцев А.И., **Капустин А.В.**, Якимова Э.А., Лучко М.А., Пименов Н.В. // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences - 2017 - Т. 70 - № 10 - С. 327-330.

8. **Капустин, А.В.** Гистофилёз крупного рогатого скота. / Капустин А.В., Моисеева Н.В., Лаишевцев А.И., Лучко М.А., Яцентюк С.П., Горбачёва Н.С. // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2017.- Т. 70. - № 10. - С. 319-326.

9. Лаишевцев, А.И. Технологическая селекция иммуногенных изолятов *Staphylococcus hyicus*, перспективных для конструирования вакцинных препаратов. / Лаишевцев А.И., **Капустин А.В.**, Верховский О.А. // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2017 - № 5 - С. 120-126.

10. **Капустин, А.В.** Разработка метода контроля иммуногенной активности ассоциированной вакцины против клостридиозов крупного рогатого скота. // Капустин А.В., Лаишевцев А.И., Скляр О.Д., Абросимова Н.С., Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences,- № 63, - January 2017.- С. 170-175.

11. Козлова, А.Д. Использование молекулярно-генетических методов для типирования *Clostridium perfringens*. / Козлова А.Д., Горбачева Н.С., Клименкова О.В., **Капустин А.В.**, Лаишевцев А.И., Яцентюк С.Н. // Russian Journal Agricultural and Socio-Economic Sciences-3-2017-С.188-194.

12. Скляр, О.Д. Интерференция компонентов в поливалентной вакцине против клостридиозов крупного рогатого скота / Скляр О.Д., Капустин, А.В. // Российский ветеринарный журнал. 2017.- № 1.- С. 20-23.
13. **Капустин, А.В.** Изучение эффективности применения поливалентной вакцины «Клостбовак-8» на неблагополучном по злокачественному отёку, браздоту и анаэробной энтеротоксемии поголовье мелкого рогатого скота / Капустин А.В. // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2016.- №11. - С. 33-40.
14. **Капустин, А.В.** Эффективность применения вакцины «клостбовак-8» против клостридиозов крупного рогатого скота, вызванных различными видами *Clostridium* spp. // Капустин А.В., Скляр О.Д., Лаишевцев А.И. - Ветеринария, зоотехния и биотехнология 2016. №9. С. 6-11.
15. Лаишевцев А.И., Антибиотикорезистентность музейных штаммов бактерий рода *Klebsiella* spp. // Лаишевцев А.И., Ленёв С.В., **Капустин А.В.**, Пименов Н.В., Якимова Э.А. / Ветеринария, зоотехния и биотехнология. - 2016. - № 5. - С. 38-45.
16. Лаишевцев, А.И. Структурный состав бактериальной и грибной микрофлоры глаза крупного рогатого скота при инфекционных кератоконъюнктивитах. / Лаишевцев А.И., **Капустин А.В.**, Верховский О.А. // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences - 2016 - Т. 57 - № 9 - С. 97-104.
17. Лаишевцев, А.И. Сравнительный анализ антибиотикочувствительности коллекционных штаммов *Pasteurella multocida*, выделенных в период до 1990 г., с полевыми изолятами, выделенными в 2014-2016 гг. от крупного и мелкого рогатого скота на территории Российской Федерации // Лаишевцев А.И., **Капустин А.В.**, Гулюкин А.М. // Труды Кубанского государственного аграрного университета - 2016 - № 63 - С. 132-138.
18. **Капустин, А.В.** Пастереллез крупного рогатого скота, вызванный *Mannheimia haemolytica* / Капустин А.В., Лаишевцев А.И., // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences - 2016-Т. 52-4 - С. 3-12.
19. **Капустин, А.В.** Изучение иммуногенной активности столбнячного компонента в составе ассоциированной вакцины против клостридиозов крс //Капустин А.В., Лаишевцев А.И., Гулюкин А.И., Шемельков Е.В., Скляр О.Д. /Ветеринария Кубани - №4 -2016. - С 15-17.
20. **Капустин, А.В.** Разработка вакцины против эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота. / Капустин А.В. // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences - 5(53) - 2016 - С. 97-102.

21. Колесникова, Ю.Н. Этиология анаэробных инфекций у крупного рогатого скота и сравнительная характеристика выделенных штаммов клостридий. / Колесникова Ю.Н., Пименов Н.В., **Капустин А.В.** // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences- 8(56) – 2016- С. 39-48.
22. **Капустин, А.В.** Изучение иммуногенной активности экспериментальной вакцины против анаэробной инфекции, вызванной у крупного рогатого скота *Clostridium sordellii*. / Капустин А.В. // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences-12. - 2016. - С. 241-248.
23. **Капустин, А.В.** Видовой состав клостридий крупного рогатого скота / Капустин А.В., Моторыгин А.В., Букова Н.К. // Вестник ветеринарии, №1(64) - 2013 - С. 71-73.
24. **Капустин, А.В.** Столбняк сельскохозяйственных животных / Капустин А.В. // Ветеринария и кормление. №6. – 2009. - С. 55-56.

**Список работ, опубликованных по теме диссертации,
в других изданиях**

25. **Капустин, А.В.** Питательная среда, обеспечивающая стабильное накопление токсинов при культивировании некоторых штаммов клостридий. / Капустин А.В., Пивоварова О.С.// Лекарственные препараты для животных (разработка, производство, эффективность и качество): Тезисы докладов международной научной конференции, посвященной 80-летию организации ВГНКИ. - 2011.- С. 54-56.
26. **Капустин, А.В.** Этиологическое значение клостридий при инфекционных заболеваниях крупного рогатого скота. / Капустин А.В., Бурико Б.Ю. // Лекарственные препараты для животных (разработка, производство, эффективность и качество): Тезисы международной научной конференции, посвященной 80-летию организации ВГНКИ. - 2011.- С. 53-54.
27. **Капустин, А.В.** Проблема клостридиозов в молочном животноводстве. / Мардер В., Капустин А.В., Щербаков П., Шилова Е. // ж. БИО, №5 (188). – 2016. - С. 34-38.
28. **Капустин, А.В.** Лабораторная диагностика клостридиозов животных / Капустин А.В., Лаишевцев А.И., Гулюкин М.И., А.В. Горбатов, Н.А. Соколова // Методические указания, Москва. – 2017. - С.30.
29. **Капустин, А.В.** Определение концентрации и кратности введения компонента *Cl.chauvoei* при разработке ассоциированных вакцин.// Капустин А.В., Глушенкова Ю.А. / Материалы конференции, посвященной 95-летию Армавирской биофабрики - 2016. - С.229-234.
30. Сусский Е.В., Разработка модифицированной питательной среды для глубинного культивирования анаэробных микроорганизмов.// Сусский Е.В., Ярцев С.Н., Михеев В.Е., **Капустин А.В.**, Михайлов М.В., Есикова Е.И., Глушенкова Ю.А., Петрутик О.И. / Научные основы

производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК, материалы международной научно-практической конференции, посвященной 95-летию Армавирской биофабрики. -2016. - С.348-355.

31. **Капустин, А.В.** Эпизоотология и профилактика клостридиозов крупного рогатого скота / А.В. Капустин, Т.И. Алипер // Единый мир – единое здоровье. Материалы конгресса. - 2017. - С. 106-108.

Патенты

32. Патент на изобретение RUS 2611351, - 27.01.2016. // Способ лечения болезней бактериальной этиологии у сельскохозяйственных животных и птиц. / Енгашев С.В., Филимонов Д.Н., Самуйленко А.Я., Василевич Ф.И., Гулюкин М.И., **Капустин А.В.** [и др.].

Благодарность. Автор выражает искреннюю благодарность председателю диссертационного совета Академику РАН, д.в.н., профессору Гулюкина М.И. и ученому секретарю д.б.н. Ездаковой И.Ю. за возможность проведения защиты в данном диссертационном совете; научному консультанту, д.в.н. Склярову О.Д.; сотрудникам ФГБУ «ВГНКИ» Академику РАН, д.в.н., профессору Панину А.Н., д.б.н. Смоленскому В.И., д.б.н. Буковой Н.К., к.в.н. Моторыгину А.В., к.в.н. Толпыгину М.А., к.в.н. Пивоваровой О.С., сотрудникам ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН к.б.н. Лаишевцеву А.И., к.в.н. Горбатову А.В., к.б.н. Соколовой Н.А., сотрудникам ООО «Ветбиохим» д.б.н. Алиперу Т.И., д.б.н. Соболевой Г.Л., к.в.н. Шемелькову Е.В., к.б.н. Иванову Е.В. за поддержку и помощь на всех этапах выполнения работы.