

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР – ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ
ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА и Я.Р. КОВАЛЕНКО РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»
(ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН)

На правах рукописи

КАПУСТИН АНДРЕЙ ВЛАДИМИРОВИЧ

**Этиологическая структура и специфическая профилактика
клостридиозов крупного рогатого скота и овец**

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени доктора биологических наук

Научный консультант:

доктор ветеринарных наук Скляров О.Д.

Москва - 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

1.	ВВЕДЕНИЕ	5
2.	ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
2.1.	Распространенность клостридиозов	14
2.2.	Характеристика возбудителей клостридиозов и вызываемых ими болезней	15
2.3.	Диагностика клостридиозов	41
2.4.	Специфическая профилактика клостридиозов	54
2.5.	Технология культивирования клостридий	67
2.6.	Методы контроля иммунобиологических препаратов в РФ	74
2.6.1.	Контроль иммуногенной активности вакцин против клостридиозов животных	80
2.7.	ОБСУЖДЕНИЕ ОБЗОРА ЛИТЕРАТУРЫ	87
3.	СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	94
3.1.	Материалы и методы	94
3.1.1.	Материалы	94
3.1.2.	Методы исследования	95
4.	РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	103
4.1.	Этиологическая структура клостридиозов в РФ	104
4.2.	Эпизоотологическое обследование хозяйств неблагополучных по клостридиозам	108
4.3.	Бактериологические исследования	114
4.4.	Совершенствование технологии изготовления вакцины	120
4.4.1.	Подбор штаммов клостридий	122
4.4.2.	Характеристика <i>MSB</i> производственных штаммов клостридий	128
4.4.3.	Подбор питательной среды, обеспечивающей высокое стабильное накопление токсинов	135
4.4.4.	Совершенствование технологии культивирования клостридий	140
4.4.5.	Технология культивирования штаммов	143
4.4.6.	Инаktivация культур и токсинов клостридий	149
4.4.7.	Определение эффективной дозы каждого компонента	152
4.4.8.	Составление серии вакцины	158
4.4.9.	Характеристика вакцины	161
4.4.10.	Определение безвредности препарата	165
4.4.11.	Безопасность применения вакцины «Клостбовак-8» в неблагополучных по клостридиозам овцеводческих хозяйствах	170
4.5.	Разработка методов контроля иммуногенной и антигенной активности вакцины.	172
4.6.	Изучение интерференции компонентов в вакцине «Клостбовак-8»	187
4.7.	Изучение стабильности препарата в процессе хранения и обособность срока годности	191
4.8.	Определение длительности иммунитета на лабораторных и восприимчивых животных	194

4.9.	Иммуногенность вакцины на восприимчивых животных	198
4.10	Специфическая эффективность вакцины на восприимчивых животных	202
4.11	Эффективность применения вакцины «Клостбовак-8» в неблагополучных по клостридиозам овцеводческих хозяйствах	211
5.	ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ.	216
6	ЗАКЛЮЧЕНИЕ.	224
7	ВЫВОДЫ	227
8	ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ	229
9	РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ	230
10	СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.	231
11	ПРИЛОЖЕНИЯ	251

Список сокращений

КРС – крупный рогатый скот;
МРС – мелкий рогатый скот;
гол. – голов;
др. – другие;
ЗАО – закрытое акционерное общество;
ООО – общество с ограниченной ответственностью;
мес. – месяцев;
мин. – минут;
ч - часов
Г – год;
мкр. кл. – микробных клеток;
млн. мкр. кл. – миллионов микробных клеток;
млрд. мкр. кл. – миллиардов микробных клеток;
МПА – мясо-пептонный агар;
МПБ – мясо-пептонный бульон;
МППБ – мясо-пептонный печеночный бульон;
нм – нанометр;
об /мин. – оборотов в минуту;
л. - литров
обл. - область
ГОА – гидроокись алюминия;
КОЕ – колоний образующие единицы;
РА – реакция агглютинации;
РН – реакция нейтрализации токсинов;
рН – уровень водородных ионов;
см. – смотри;
соавт. – соавторы.
ИФА – иммуноферментный анализ;
D_{lm} – минимальная летальная доза.

1. ВВЕДЕНИЕ

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. [16, 28, 56, 62, 127, 131, 214, 232] 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*) [12, 132, 174, 234] 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 [12, 14, 40, 45, 87, 218, 237].

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 [3, 14, 36, 53, 62, 76, 102, 133].

На момент начала исследований в РФ не было препаратов для профилактики анаэробных инфекций крупного рогатого скота, позволяющие 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 [50, 105, 108].

Борьбу с клостридиозами также осложняет устаревшая документация, регламентирующая методы диагностики анаэробных инфекций, из-за чего бывает сложно поставить корректный диагноз. Также 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 [11, 20, 22, 43, 44, 56, 64, 67, 88, 153, 197, 198].

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 [1, 18, 30, 33, 35, 39, 62, 84, 102, 120, 130, 131], 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 *C. perfringens*, *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. oedematiens*, *C. tetani*, выделяющиеся не только отдельно при моноинфекции, но и в ассоциации [22, 62].

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 [24]. Первая из них, разработанная Муромцевым С.Н. в 1931 г. и усовершенствованная Ф.И. Каган и Я.Р. Коваленко в 1965 г. [33, 61, 62, 69], 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 [18, 38, 55, 78, 93, 96, 101]. 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 [5, 18, 30, 33, 37, 47, 61, 70, 93, 119, 259, 262].

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 моно-препарата 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 кло-стридиозов овец и КРС, позволяющая профилактировать восемь наиболее клинически значимых анаэробных инфекций, возбудителями которых являются *C. chauvoei*, *C. perfringens* тип *A*, *C. perfringens* тип *C*, *C. perfringens* тип *D*, *C. septicum*, *C. oedematiens*, *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 метод 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 крупного рогатого скота «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 [6, 31].

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 ВИЭВ им. Я.Р. Коваленко, 2017.

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

Личный вклад автора в проведенные исследования. 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, 22 рисунка, 20 приложений. Список литературы включает 279 литературных источников, из них 136 зарубежных.

2. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Род клостридий многочислен и разнообразен. В настоящее время насчитывается около 220 видов клостридий [136, 278], большинство из которых является сапрофитами. Условно род можно подразделить на две группы: активаторов процессов брожения и гниения и возбудителей болезней животных и человека. Количество патогенных видов клостридий относительно не велико, причем некоторые из них не могут самостоятельно вызывать заболевания, но находясь в ассоциации с другими анаэробными и факультативно анаэробными бактериями сильно осложняют инфекционный процесс и затрудняют диагностику [11, 20, 22, 28, 43, 84, 116, 136, 145, 170, 199].

Термин клостридиозы, получивший наименование от рода микроорганизмов - *Clostridium*, объединяет все болезни теплокровных животных, вызываемых различными видами анаэробных спорообразующих бактерий. Помимо спорообразования и чувствительности к кислороду, эти виды бактерий объединяет способность образовывать специфические высокоактивные токсины, оказывающие летальное действие на макроорганизм, из-за чего их часто в литературе именуют токсико-инфекциями [62, 79, 173, 239].

Клостридии относятся к роду *Clostridium*, семейству *Clostridiaceae*, порядку *Clostridiales*, классу *Clostridia*, отделу *Fermicutes*. Согласно классификации Берджи, род разделен на пять групп, сформированных по способности видов ферментировать желатин и расположению спор в клетке (центрально, терминально или субтерминально) [136, 278].

В первую группу входят не разжижающие желатин клостридии, споры которых расположены субтерминально. Типичные представители этой группы - *C. butyricum*, *C. pasteurianum*, *C. fallax* [278].

Во вторую группу входят виды *Clostridium* также с субтерминальным расположением спор, но разжижающие желатин. В этой группе находятся большинство патогенных видов: *C. botulinum*, *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. novyi* (*C. oedematiens*). Эти бактерии образуют специфические для каждого вида экзотоксины

высокой активности, к которым чувствительны многие виды животных. Так же в группе насчитывается значительное количество непатогенных видов.

В третью и четвертую группы входят клостридии, у которых споры расположены терминально, но представители третьей группы не разжижают желатин, а четвертой разжижают. Единственным патогенным видом в этих группах является возбудитель столбняка *C. tetani*.

К пятой группе относятся пять видов клостридий (*C. acidurici*, *C. kluyveri*, *C. malacosomae*, *C. brevifaciens*, *C. thermocellum*), которые растут на питательных средах только с дополнительными ростовыми добавками, например, мочевой кислотой, дрожжевым экстрактом, этанолом, при повышенной щелочности среды (pH 8,5-10,2) и др. Все они сапрофиты. [136, 278].

2.1. Распространенность клостридиозов

К наиболее клинически значимым для жвачных видам клостридий, относятся *C. perfringens*, *C. chauvoei*, *C. tetani*, *C. oedematiens*, *C. septicum*, *C. sordellii*, *C. botulinum*. Основной биологической особенностью патогенных клостридий является способность продуцировать высокоактивные токсины, которые при воздействии на определенные ткани и органы макроорганизма нарушают их нормальное функционирование, обуславливая развитие специфических, опасных для жизни патологических состояний [1, 11, 16, 30, 65, 102, 108, 134, 154, 162, 184, 213].

Все перечисленные виды клостридий широко распространены в природе, особенно в почве богатой гумусом. Наиболее часто из них встречается *C. perfringens*, представленный несколькими типами в зависимости от продуцируемых токсинов [62, 133, 141].

Нередко злокачественные отеки возникают при травмах с открытыми раневыми поверхностями, поедании животными грубого, загрязненного землей корма, особенно в летне-осенний период, кормлении холодными или замерзшими кормами [14, 62, 84, 102, 130, 133]. В свежих открытых ранах клостридии обнаруживаются в 40-100 % случаев [22, 43, 69, 88, 125, 175].

Также велико значение стационарно неблагополучных очагов, которыми становятся помещения или участки почвы, контаминированные спорами возбудителя [62, 133, 141], при этом анаэробные инфекции нередко протекают как после родовые и послеоперационные осложнения [62, 75, 221, 232]. Зарегистрированы случаи клостридиальной инфекции при оперативном вмешательстве на желудочно-кишечном тракте, при взятии крови и инъекции лекарственных препаратов.

2.2. Характеристика возбудителей клостридиозов и вызываемых ими болезней

2.2.1 *Clostridium perfringens*. Бактерии данного вида представляют собой крупные толстые палочки размером 1,0-1,5х4,0-8,0 мкм, расположенные изолированно или парами, реже короткими цепочками, неподвижные. Молодые культуры окрашиваются по Граму положительно, старые отрицательно, образуют овальные или сферические споры, облигатные анаэробы, каталазоотрицательные. Являются возбудителями инфекционной анаэробной энтеротоксемии и анаэробной дизентерии, а также достаточно часто выделяются в ассоциации с другой микрофлорой при злокачественных отеках у животных различных видов и газовой гангрене у человека.

Культуры хорошо растут на питательных средах при наличии невысокого уровня анаэробии (40 мм.рт. ст), при этом на поверхности агара образуют несколько вариантов колоний, как правило, гладкие, шероховатые или слизистые [2, 20, 43, 60, 67, 102, 136, 199, 201, 229].

При росте на жидких питательных средах (МППБ, Китта-Тароцци и др.) вызывают интенсивное помутнение среды с обильным газообразованием. После окончания роста происходит выпадение культуры в осадок с полным просветлением среды. Обладая высокой ферментативной активностью, образуют кислоту и газ из глюкозы, фруктозы, галактозы, мальтозы, лактозы, крахмала, гликогена и инозита. Встречаются штаммы, ферментирующие салицин. Лакмусовое молоко, при посеве достаточно большой дозы возбудителя, свертывается быстро с образованием кислоты, сгусток не переваривается. Индол не образуют, свернутую сыво-

ротку крови и альбумин не разжижают, в мозговой среде не вызывают почернения, в бульоне с кусочком мяса происходит окраска мяса в красный цвет. Желатин в процессе роста разжижают и вызывают его потемнение.

Культуры хорошо растут при температуре 35 - 37 °С, но могут расти и при 42 °С, что является дифференцирующим экспресс-тестом. При посеве на МППБ или лакмусовое молоко при 42 °С, рост и газообразование наблюдаются уже через 3 ч, так как другие клостридии вырастают только через 8-16 часов и более [110, 116, 132, 196].

По спектру продуцируемых токсинов вид *C. perfringens* разделен на пять типов – А, В, С, D, Е, F, патогенные свойства которых различны. Так *C. perfringens* тип А вызывает пищевые отравления у человека и животных, газовую гангрену, в том числе некротизирующие энтериты и маститы у КРС, энтериты у собак, некротизирующий энтерит кур. *C. perfringens* тип В является возбудителем дизентерии ягнят и жеребят [102, 238], энтеротоксемии молодняка различных видов животных. *C. perfringens* тип С вызывает геморрагическую энтеротоксемию у овец и поросят, телят, жеребят; некротический энтерит цыплят; *C. perfringens* тип D - энтеротоксемию овец («мягкая почка»), коз, телят; *C. perfringens* тип Е - энтеротоксемию овец и телят. Существовавший ранее тип F, после внедрения в практику генетических исследований, был реклассифицирован и отнесен к типу С.

Высокая ферментативная активность, быстрый рост и интенсивное газообразование при росте на плотных питательных средах вызывают разрывы агара. Таков же патогенез инфекции и в тканях организма-хозяина: интенсивное газообразование создает очаг повышенного давления, сдавливаются кровеносные сосуды, без поступления крови происходит омертвление тканей и быстрый рост культуры клостридий. Образующиеся токсины впитываются из очага некроза и разносятся по организму, вызывая нарастание общего токсикоза и коматозное состояние. Токсины, продуцируемые клостридиями, имеют в основном белковую структуру, и изучению их антигенной структуры посвящено большое количество работ [1, 11, 26, 34, 69, 81, 134, 213, 219, 230, 239].

Следует учитывать, что под общим термином «токсин *C. perfringens*» подразумевается наличие не менее 12 токсинов и агрессивных, наиболее значимыми из которых являются альфа (α), бета (β), эпсилон (ϵ) и йота (i) токсины (таблица 1). Все они обладают выраженной токсичностью, гемолитической активностью, дерматонекротизирующим и лецитиназным действием, что при комплексном воздействии приводит к быстрому летальному эффекту [20, 32, 62, 94, 103, 144, 150, 151, 230].

Таблица 1 - Токсины и ферменты основных типов *C. perfringens*.

Наименование возбудителя	Наименование токсинов											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	α	β	γ	δ	ϵ	η	θ	ζ	κ	λ	μ	ν
	альфа	бета	гамма	дельта	эпсилон	эта	тета	йота	каппа	лямбда	мю	ню
<i>C. perfringens</i> т. А	+++	-	-	-	-	±	±	-	++	-	+	+
<i>C. perfringens</i> т. В	±	+++	±	±	++	-	±	-	±	±	+	+
<i>C. perfringens</i> т. С	±	+++	±	±	-	-	±	-	++	-	-	+
<i>C. perfringens</i> т. D	±	-	-	-	+++	-	±	-	±	±	±	+
<i>C. perfringens</i> т. E	±	-	-	-	-	-	±	+++	+	±	-	+
<i>C. perfringens</i> т. F	±	+++	±	-	-	-	-	-	-	-	-	+

+++ основной летальный и некротический токсин, образуемый всеми штаммами указанного типа;

++ токсин, образуемый многими штаммами;

+ токсин или фермент, образуемый всеми штаммами вида в небольшом количестве;

± токсин или фермент, образуемый некоторым количеством штаммов.

2.2.1.1 *C. perfringens* тип А в связи с широким распространением относится к категории убиквитарных микроорганизмов [62, 132, 133, 175]. Штаммы продуцируют лишь один из четырех значимых токсинов – альфа, который обладает способностью к расщеплению фосфолипидов клеточных мембран, вызывая тем самым лизис клеток. Токсин представляет собой белок, который образуется в кишечнике, питательной среде или другом субстрате при спорулировании клеток. Он усиливает выделение энтероцитами воды и растворенных в ней ионов натрия и хлора, а накапливаясь в больших количествах разрушает их стенки. Остальные

продуцируемые этим типом клостридии токсины: θ (тета - гемолизин), κ (каппа - коллагеназа), μ (мю-гиалуронидаза), η (ню-ДНК-за) лишены самостоятельного значения, но в комплексе усиливают действие основного альфа токсина.

C. perfringens тип А является возбудителем некротического энтерита КРС, гангренозных маститов коров, энтеротоксемии (желтой болезни ягнят), геморрагического гастроэнтерита собак, некротизирующих энтеритов жеребят, некротизирующего энтерита кур, нередко вызывает кормовые отравления. У КРС наиболее часто этим процессам подвержена молочная железа и репродуктивные органы [127, 130, 131, 154, 164, 215]. При гангренозном процессе, осложнённом *C. perfringens* этого типа, клинические признаки проявляются достаточно быстро, образуется отек пораженного органа, подкожная эмфизема, кожные покровы становятся горячими. При поражении вымени - отеки, застой и обесцвечивание молока, наличие газа в подкожной клетчатке и молочных ходах. Иногда молоко коричневатого цвета. Все это проходит на фоне резко развивающегося угнетения, анемии, желтушности и гемоглобинурии [172].

C. perfringens тип А практически всегда выделяют при некротических энтеритах у взрослых коров и абомазитах у телят [65, 154, 189, 190]. Острый клостридиальный абомазит встречается спорадически у телят в возрасте от 2 дней до 3 недель, реже у откормочных 3-4-месячных телят, при смене рациона, когда возрастает потребление грубых кормов и уменьшается доля молока. Заражение может происходить как при сосании вымени, так и при попадании с другими кормами. Предрасполагающими факторами являются смена рациона, особенно введение грубых кормов; экологический или физический стресс; недостаток витамина Е; лактоацидоз; низкий иммунный статус, часто связанный с дефицитом меди. Летальность достигает 100%. Клинически болезнь протекает остро и/или молниеносно. Заболевшие телята могут быть найдены мертвыми или в состоянии агонии. При менее остром процессе у животных обнаруживают тимпонию, диарею, болезненность области живота, быстро нарастающее угнетение [2, 65, 121, 160, 189].

При патологоанатомическом исследовании обнаруживают расширение сычуга, кровоизлияния, отек, обширные некрозы слизистой оболочки с изъязвлени-

ями. Поражения могут быть диффузными или очаговыми. Содержимое сычуга красно-коричневого цвета густой консистенции с пузырьками газа. Слизистая тонкого кишечника сегментарно или диффузно гиперемирована, в просвете содержится красноватая жидкость и значительное количество газов [102, 171]

Остальные типы *C. perfringens* – В, С, D, Е и F, встречаются значительно реже, не более чем в 3-5 % исследуемых образцов патологического материала и почвы. Их наличие в пробах достаточно достоверно можно связать с эпизоотологическими данными и неблагополучием определенных территорий по какому-либо инфекционному заболеванию анаэробной этиологии, например, энтеротоксемии или дизентерии [62, 102, 149, 156, 261].

2.2.1.2. *C. perfringens* тип В морфологически и культурально схожи с типом А. Образуют очень сильный β -токсин, а также еще целый комплекс токсинов: γ , δ , ϵ , α , λ , μ и η , действие которых очень разнообразно, но в комплексе пагубно для организма животного.

β -токсин *C. perfringens* представляет собой полипептид массой около 35 кДа, который обладает способностью связываться с кишечными эндотелиальными клетками, что приводит к тромбозу сосудов, клеточному отеку и лизису, а затем некрозу кишечника. Образующие его штаммы являются возбудителями анаэробной дизентерии у телят [62, 102, 133, 252, 264].

Наиболее характерными признаками заболевания являются: геморрагическое воспаление кишечника, часто с изъязвлениями и прободением его стенок и вздутием живота. В более старшем возрасте может развиваться хроническая форма болезни, характеризующаяся потерей кондиции, угнетением, отсутствием сосательного рефлекса. Присутствуют неврологические признаки, включая опистотонус, слепоту, и иногда наблюдается потеря координации. У телят заболевание, вызванное *C. perfringens* *тип В*, клинически схоже с таковой у телят, причем в основном болеют животные в возрасте до 10 дней [2, 62, 171, 221, 234].

2.2.1.3 *C. perfringens* *тип С*, являющийся возбудителем анаэробной энтеротоксемии, также не отличим от других типов по морфологическим и культураль-

ным свойствам. Тип С наиболее часто выделяется от новорожденных поросят, но может быть причиной болезни молодняка других видов животных [35, 62, 181].

Болезнь встречается в основном у новорожденных особей разных видов в виде геморрагического энтерита, у невакцинированных животных заболеваемость может составлять до 100%, а смертность варьировать от 50 до 100%. У взрослых животных энтеротоксемия часто проявляется внезапной гибелью, часто во время движения и пастбы, и может охватывать от 5 до 15% поголовья [62, 131, 234, 244, 251].

Возникновению болезни способствуют резкие изменения рациона кормления, являющиеся практически основным предрасполагающим факторам. Смена рациона вызывает дисбаланс нормальной кишечной флоры, что способствует чрезмерному росту возбудителя [62, 161, 265].

Клинические признаки анаэробной энтеротоксемии сходны у молодняка разных видов животных. Болезнь протекает молниеносно или остро, реже подостро или хронически. При молниеносных и острых формах животных находят мертвыми, либо клинические признаки (колики, интоксикация, кома, кровавая диарея) быстро прогрессирующие. Острая и хроническая формы характеризуются постоянной диареей, потерей веса, прогрессирующей слабостью и обезвоживанием. Даже при острых и хронических случаях большинство животных погибают. Взрослых овец находят лежащими в вынужденных позах, с запрокинутой головой и другими неврологическими признаками. Клинические проявления болезни у взрослых коз и крупного рогатого скота схожи с таковыми у овец [234, 266].

Пораженные участки кишечника могут быть темно-красными, как следствие кровоизлияний в слизистом и подслизистом слоях, часто раздуты из-за большого количества газов. Содержимое кишечника, как правило, жидкое, коричневого или красного цвета, может содержать сгустки фибрина и некротизированные кусочки слизистой оболочки. Стенка кишечника заметно утолщена, отек студенистый, с кровоизлияниями [65, 131, 174].

2.2.1.4 *C. perfringens* *mun* D - возбудитель энтеротоксемии взрослых овец. Основным отличительным признаком болезни является поражение почек, так

называемый синдром «мягкая почка». Помимо овец может быть причиной энтеротоксемии у телят, жеребят и других видов животных. Образует комплекс токсинов, основным из которых является эpsilon-токсин. Основной особенностью этого вещества является то, что образуется он в форме про-токсина с невысокой активностью (в пределах 5-10 Dlm/мл жидкости), однако под действием пищеварительных ферментов (трипсина или панкреатина) активность его возрастает и может достигать нескольких тысяч летальных единиц в одном см³ питательной среды или кишечного содержимого [61, 69, 163, 202, 267].

Инфекционная анаэробная энтеротоксемия является остро протекающим заболеванием, характеризующимся общей токсемией и бактериемией. Болезнь развивается в результате бурного размножения в кишечнике бактерий, продуцирующих специфические токсины. Болезнь поражает ягнят в возрасте двух недель, также достаточно часто взрослых овец. Наиболее распространенным предрасполагающим фактором для энтеротоксемии типа D является белковый перекорм зерном или другими видами концентратов.

Впервые заболевание описано в 1910 г. Gilruth в Тасмании у овец, а затем зарегистрировано в Новой Зеландии и Австралии. Ученые, занятые установлением причин гибели животных, обнаружили в кишечнике павших овец высокоактивный специфический токсин, а затем и выделили возбудитель - *C. perfringens* тип D [20, 35, 69, 102, 168, 176, 279].

Энтеротоксемия типа D у молодняка, как правило, острая, животные погибают после короткого периода преимущественно неврологических и респираторных симптомов, включая тахипноэ, судороги, опистотонус и кому [65, 132, 133, 191, 269, 270, 271].

Подострые или хронические случаи чаще встречаются у старых овец или молодых, но вакцинированных животных. Эти формы энтеротоксемии типа D характеризуются неврологическими признаками, включая слепоту, атаксию и парезы. Иногда может наблюдаться диарея, но это не является общепринятым клиническим признаком энтеротоксемии овечьего типа.

При вскрытии трупов павших животных обнаруживают изменения в тонком, реже толстом кишечнике: слизистые гиперемированы, истончены, содержат немного жидкости, как правило, сильно раздуты газами. Наблюдается отек легких, большое количество пены в трахее и нижних дыхательных путях, в сердечной сумке, грудной и брюшной полостях жидкость с нитями фибрина. Другие изменения включают субэндокардиальные и подэпикардиальные кровоизлияния, которые особенно выражены в левом желудочке, серозные кровоизлияния в печени и селезенке. Характерное размягчение почечной паренхимы является ускоренным автолитическим процессом и наблюдается только через несколько часов после гибели животного. При хронической энтеротоксемии у старых овец могут наблюдаться тяжелые поражения мозга [102, 163, 176, 268].

2.2.2 *Clostridium chauvoei* – возбудитель эмфизематозного карбункула. Является строгим анаэробом, представляет собой полиморфные споросодержащие палочки с закругленными концами размером 0,5-0,7 x 1,6-10 мкм. В молодых, активно растущих культурах, а также в патологическом материале, клетки микроорганизма окрашиваются грамположительно, при дальнейшем культивировании становятся грамотрицательными, а за счет образующихся спор приобретают веретено- или лимонообразные формы. Споры длительно сохраняются в почве, представляя опасность для заражения восприимчивых животных [20, 38, 51, 53, 72, 96, 120, 122, 136, 209, 278].

На кровяном агаре культуры образуют колонии в форме виноградного листа или перламутровой пуговицы, окруженные тонкой зоной гемолиза. На жидких средах растут интенсивно со слабым газообразованием, желатин разжижают, в мозговой среде не дают почернения. Молоко свертывают медленно. Ферментируют с образованием кислоты и газа глюкозу, фруктозу, галактозу, мальтозу, сахарозу, лактозу. Образуют незначительное количество индола [120, 122, 278].

Несмотря на отсутствие выраженной токсигенности, *C. chauvoei* обладает значительным количеством факторов вирулентности, таких как холестерол-зависимые цитолизины, участвующие в патогенезе гангренозных поражений, гиалуронидаза, ДНК-аза, нейраминидаза, а также гемолитической и цитотоксической

активностью [35, 120, 183]. Кроме того, считается, что в значительной степени инфекционному процессу способствуют жгутики *C. chauvoei*, обеспечивающие распространение возбудителя по организму.

Впервые возбудитель был выделен в 1876 г. Боллингером и Фезером, а затем изучен и описан Орлуэном в 1881 г, давшем ему название *C. chauvoei* в честь французского ученого J. Chauveau [62, 120].

Эмфизематозной карбункул энзоотически возникает в неблагополучных областях, обычно во время пастбищного периода, хотя отмечают случаи возникновения заболевания у животных в стойловый период. Случаи эмкара описаны и у овец, но в отличие от крупного рогатого скота инфекция часто связана с попаданием возбудителя через раны. Из-за этого эмкар у овец стоит рассматривать как заболевание, ассоциированное с злокачественным отеком.

Болезнь проявляется тяжелым очаговым поражением мускулатуры в виде крепитирующих некрозов и серозно-геморрагической инфильтрацией смежной с ними подкожной клетчатки. Болеет крупный и мелкий рогатый скот, как правило, до достижения трёхлетнего возраста [62, 69, 122, 210].

Заражение животных чаще происходит через поврежденные оболочки пищеварительного тракта, куда бактерии попадают с кормом, загрязненным почвой, реже воротами инфекции становятся открытые раневые поверхности. Доказанным считается также перенос возбудителя слепнями [62, 140]. Преодолев барьер слизистых, *C. chauvoei* разносится кровью по органам и тканям. Локализуется в мышечной ткани, где начинает размножаться, выделяя газ, токсины и агрессивные вещества. Под их воздействием происходят дистония кровеносных сосудов, мукоидное набухание миоцитов, увеличение проницаемости стенок капилляров и развитие отека в межмышечной ткани. Экзотоксины и споры распространяются с отечной жидкостью и экссудатом в другие органы и ткани. Усиление интоксикации организма приводит к возникновению дистрофических процессов в миокарде, легких, печени, почках и других органах. Причиной смерти животных становится паралич миокарда [62, 120, 122].

Инкубационный период при эмкаре длится от 2 до 5 дней, болезнь протекает остро с повышением температуры до 41 °С и выше. Иногда болезнь протекает подостро и хронически. В наиболее острых случаях животных находят мертвыми, каких-либо клинических признаков перед гибелью не наблюдают. В течение полутора-двух суток в различных участках тела (чаще в мышцах ягодичной и бедренной групп, мышцах шеи и подчелюстного пространства) образуются болезненные, плотные, горячие припухлости, при надавливании на которые слышны звуки крепитации. По мере развития патологического процесса отеки становятся холодными и безболезненными. Болезнь сопровождается хромотой, угнетением, гипотонией преджелудков, отмечают также гипертермию, отказ от корма, прекращение жвачки, одышку, тахикардию [62, 120, 122]. При поражении языка, из-за увеличения размера органа, происходит его выпадение за пределы рта.

Характерными патологоанатомическими признаками при данном заболевании являются: сильное вздутие трупа с интенсивным газообразованием в пораженных мышцах; выделение пенистой кровянистой жидкости из естественных отверстий. Специфические поражения обнаруживаются в наиболее мощных и часто травмируемых мышцах: в области бедер, крупа, поясницы и плеча. Мышечная ткань и межмышечные прослойки, смежные с некротическими очагами, инфильтрированы серозным экссудатом с пузырьками газов, при разрезе на месте поражения выделяется кровянистая пенистая жидкость, от которой исходит запах прогорклого масла. Кожа пораженного участка напряжена, истончена, серо-синеватого цвета, иногда некротизирована. Шерсть легко снимается. Регионарные лимфатические узлы в состоянии серозно-геморрагического лимфаденита [20].

Одним из наиболее патогномичных признаков при эмфизематозном карбункуле является переполненный желчный пузырь, увеличенный в 5-10 раз по сравнению с нормой [35, 53, 210].

Помимо скелетных мышц, значительные поражения обнаруживают в миокарде, при этом перикард диффузно геморрагичен, может быть покрыт тонким слоем фибрина и содержать значительное количество жидкости. Может наблюдаться фибринозный плеврит, в областях прилегающих к сердцу, легкие всегда

отечны. Следует учесть, что при подозрении на эмфизематозный карбункул вскрытие не проводят, а труп уничтожают путем сжигания.

2.2.3 *Clostridium tetani* - возбудитель столбняка. Является строгим анаэробом, представляющим собой тонкие грамположительные споросодержащие подвижные палочки размером 0,4-1,7 x 2-18 мкм [24, 59, 79, 136, 232, 278]. Споры образуются на концах, от чего клетки приобретают вид барабанных палочек. Благодаря спорам возбудитель длительно сохраняется в почве, представляя опасность для заражения человека и восприимчивых животных [24,28, 59, 159, 248, 277].

Микроб является постоянным обитателем кишечника травоядных животных, откуда попадает в почву, являющуюся основным источником заражения. Особенно много спор находят в земле огородов и садов, удобренной навозом. Инфицирование в основном происходит при случайных ранениях, переломах, укусах, тяжелых родах, а также хирургических операциях (кастрация, обезроживание, декапитация и т.д). Пуповина является основным источником столбняка у новорожденных, особенно у ягнят.

Споры *C. tetani* прорастают при низком окислительно-восстановительном потенциале и при нейтральном pH. При размножении палочка выделяет два экзотоксина: тетаноспазмин, действующий на нервные клетки и вызывающий характерный для столбняка клинический синдром, и тетанолизин, вызывающий гемолиз эритроцитов. Каких-либо специфических местных изменений в ране при этом не возникает, но по мере нарастания токсикоза начинают проявляться нервные явления в виде судорог и параличей.

Столбняк является важной проблемой как гуманной, так и ветеринарной медицины, о чем свидетельствуют материалы ВОЗ и сообщения различных исследователей. Болезнь встречается во всех странах мира, но чаще в странах с теплым климатом, особенно в тропическом поясе, протекает с явлениями тяжелой интоксикации и почти всегда заканчивается летально [24, 62, 106, 248].

Клиника болезни обусловлена действием тетаноспазмина, который через кровь попадает в двигательные нервы, а затем в спинной и продолговатый мозг. Токсин снимает тормозящее влияние с вставочных нейронов, вследствие чего

мышцы постоянно получают импульсы возбуждения, что проявляется периодическими клоническими судорогами. Развивающаяся интоксикация ведет к поражению центров продолговатого мозга, что проявляется угнетением дыхания, гипотензией, нарушением работы сердца. На этом фоне происходит нарушение метаболизма, связанные в первую очередь с глубокой гипоксией, биохимическим сдвигам в организме и ацидозом.

Столбняк может проявляться в форме местного и общего поражения, патогенез которых одинаков. Местный столбняк встречается редко и проявляется приступами тонических и клонических судорог только пораженной части тела. Прогноз при этом благоприятный.

Генерализованный столбняк встречается чаще. Инкубационный период длится от 2 до 60 дней, но обычно 7–10 дней. При остром течении температура тела повышается до 41 °С. Первым признаком при этом является сокращение жевательных мышц, сопровождающееся невозможностью открывать рот, жевать, глотать, произносить звуки. Почти одновременно с тризмом возникают мышечная ригидность шеи, спины, поясничной области.

По мере развития болезни возникает опистотонус, а затем тонические сокращения всех мышечных групп: грудной клетки, живота, конечностей. Судороги мышц конечностей бывают настолько сильными и длительными, что могут приводить к разрывам мышц, переломам костей и вывихам в суставах. Спазм дыхательной мускулатуры и диафрагмы может вызвать остановку дыхания [24, 79, 155, 274, 277].

В случаях с благоприятным исходом через 2-3 недели начинается выздоровление. Сила судорог снижается, они становятся реже, нормализуется температура, уменьшается тризм, улучшается глотание. Исчезновение тонического напряжения мышц, как и появление, происходит сверху вниз. Первыми исчезают клонические судороги, затем гипертонус поперечнополосатых мышц. Достаточно долго сохраняется скованность движений.

Характерных патологоанатомических изменений при столбняке нет, при подозрении в первую очередь обращают внимание на наличие ран, куда мог попасть возбудитель.

2.2.4 *Clostridium septicum* - возбудитель злокачественного отека животных различных видов, а также браздота овец. Микроорганизм патогенен и для человека, являясь одним из самых распространенных возбудителей газовой гангрены.

C. septicum впервые был выделен Л. Пастером в 1874 г. из трупа животного, павшего с признаками, характерными для сибирской язвы. В последующих работах Р. Кохом было подтверждено это открытие, а Орлуэном в 1892 г. выделена чистая культура микроорганизма [11, 21, 41, 62, 77, 132, 147, 165].

Бактерии представляют собой подвижные длинные палочки с закругленными концами размером 0,6-2,0 x 2-35 мкм, окрашивающиеся грамположительно в молодых и грамтрицательно в старых культурах. Образуют споры овальной формы, расположенные субтерминально или центрально.

Микроб хорошо растет на питательных средах. На кровяном агаре образует нежные вуалеобразные колонии с выростами, окруженные гемолизом. На жидких питательных средах растет с интенсивным помутнением и газообразованием. Сбраживает с образованием кислоты и газа глюкозу, лактозу, салицин, мальтозу. Галактозу и сахарозу не ферментирует. Желатин разжижает медленно. Кусочки мяса в МПБ краснеют. Мозговой бульон не чернеет [21,152,278].

C. septicum вырабатывает высокоактивные токсины, основным из которых является α -токсин, обладающий летальными и некротическими свойствами, β -токсин (ДНК-за) и μ -токсин (гиалуронидаза). Гиалуронидаза вырабатывается у *C. septicum* в больших количествах, при этом чем токсичнее штамм, тем в больших количествах он продуцирует гиалуронидазу [26, 41, 146, 157, 188, 208].

Злокачественные отеки, вызванные *C. septicum* возникают спорадически и связаны с поеданием загрязненных кормов и плохим санитарным состоянием мест содержания животных. Болезнь почти всегда протекает остро, хотя возможны и хронические случаи. При попадании в рану через несколько часов в этой области образуется отек и эритема с резко выраженной болезненностью. При про-

грессировании болезни отек быстро увеличивается, распространяясь на подкожную клетчатку, помимо отека при пальпации четко ощущается крепитация тканей. Кожа тугая и диффузно красная или почти черная. Почти всегда присутствуют угнетение, тахикардия, повышение температуры и судороги. На более поздних стадиях заболевания пораженный участок становится холодным, боль исчезает из-за некроза локальных нервных окончаний и субнормальной температуры. В большинстве случаев смерть происходит от токсемии и системного шока в течение 2-4 дней после появления клинических признаков.

У коров злокачественный отек часто связан с тяжелыми отелами и проявляется в форме некротизирующего вульво-вагинита, метрита, мастита. Болезнь развивается обычно через 1 - 3 дня после отела, проявляется отеком вульвы, промежности, и сопровождается гипертермией и угнетением. Начавшийся процесс практически в 100 % случаев заканчивается гибелью животного [39, 56, 127, 236].

Патологические изменения характеризуются серьезными системными изменениями и быстрым распространением инфекции по организму. Наблюдают диффузный геморрагический студенистый подкожный отек и эмфизему. Если затронуты мышцы, то отмечают четко выраженное изменение окраски тканей, отдельные области при этом могут быть темно-красными, а рядом расположенные – серого или синеватого цвета, иметь вид вареного мяса. Также присутствуют серозные и субэндокардиальные кровоизлияния, увеличение селезенки, печени, отеки легких, как следствие тяжелой интоксикации [14, 36, 166].

При хронических формах инфекции, вызванной *C. septicum*, у крупного рогатого скота развивается так называемый целлюлит, когда происходит локальное повреждение крупных скелетных мышц, которые потом инкапсулируются. Такие изменения происходят при заражении животных нетоксичными штаммами возбудителя или при развитии инфекции у вакцинированного поголовья. При хроническом течении болезни продолжительность процесса может составлять до 30 дней, но также заканчивается летальным исходом [14, 207].

C. septicum является основным возбудителем браздота - острого быстропротекающего инфекционного заболевания жвачных животных, в основном овец.

Проявляется браздот геморрагическим воспалением слизистой оболочки сычуга и двенадцатиперстной кишки. Болезнь зарегистрирована во всех странах мира с развитым овцеводством независимо от географической зоны и климатических условий [62, 147, 165, 167], регистрируется спорадически в виде небольших вспышек. В основном болеют хорошо упитанные малоподвижные животные. Инфицирование происходит оральным путем через поврежденные оболочки пищеварительного тракта, с поеданием загрязненной травы, других грубых кормов, воды. Способствует возникновению болезни поедание холодного корма. После проникновения через слизистые, возбудитель переносится кровью и локализуется в мышечной ткани, где начинает размножаться с образованием токсинов и газа.

Общая интоксикация организма наступает очень быстро и заканчивается летальным исходом. Экзотоксины и споры распространяются с отечной жидкостью и экссудатом в другие органы и ткани. Усиление интоксикации организма животных обуславливает возникновение дистрофических процессов в миокарде, легких, печени, почках и других органах. Причина смерти животных становится паралич миокарда [152, 167, 206].

Инкубационный период при браздоте короткий, болезнь протекает остро с повышением температуры до 41 °С и выше. Как правило, болезнь длится 1-3 часа, реже затягивается до 8 и более часов. Болезнь характеризуется нервным возбуждением, в процессе которого больные животные скрежещут зубами, захватывают траву вместе с землей, хотя и не глотают её, совершают скачкообразные движения. По мере развития болезни животные падают, развиваются тонические судороги. Дыхание поверхностное, учащенное, пульс до 120 ударов в минуту, слабый, почти нитевидный. Из носа, в следствии отека легких, выделяется пенистая, серозная, иногда с примесью крови, жидкость. Реже бывает понос, далее развивается тимпания рубца. Гибель наступает через 3-4 часа от начала появления первых признаков болезни. При патологоанатомическом исследовании стенка сычуга заметно отечна, слизистая может быть очагово или диффузно поражена, содержит пузырьки газа. Образующиеся некрозы слизистой оболочки незначительные, по-

скольку из-за быстрого прогрессирования болезни поражения не успевают развиваться [14, 62].

Описана отдельная форма болезни у взрослых баранов, травмирующих кожу головы при столкновениях с соперниками. *C. septicum* попадает в раны при ударах рогами, при этом развивается газовая гангрена органов головы и шеи с обширным геморрагическим отеком и скоплением газа в подкожной клетчатке. Такую форму болезни принято называть «большая голова» [14, 62, 147].

2.2.5 *Clostridium oedematiens* (novyi) - широко распространена в природе и по частоте выделения уступает лишь *C. perfringens* тип А [62, 130]. Бактерии этого вида патогенны для человека, всех млекопитающих и птиц. Учитывая высокую токсичность *C. oedematiens*, летальность при заболевании газовой гангреной, осложненной этим видом, составляет не менее 50 % [22, 75].

C. oedematiens представляет собой полиморфную палочку с закругленными концами, длиной 1,6-17 мкм, шириной 0,6-1,4 мкм. Располагается одиночно, парами и/или цепочками. Подвижная, имеет до 20 расположенных перитрихально жгутиков. Образует крупные, овальные споры, расположенные центрально или субтерминально, которые появляются через 24-48 часов роста, реже через 2-8 суток [69, 136, 278].

Возбудитель впервые был выделен Нови в 1894 г. из трупов морских свинок, павших с признаками злокачественного отека. В 1915 г. М. Вайнберг и Р. Сеген выделили этот микроб при газовой гангрене у человека, сопровождающейся сильной интоксикацией. Ими было присвоено микроорганизму название *Bacillus oedematiens*. В 1934 г. исследователями Скоттом, Турнером и Вовтером было предложено разделить вид на четыре типа в зависимости от источника происхождения, патогенности и ферментации глицерина [62, 69].

При росте в жидких питательных средах *C. oedematiens* образует диффузное помутнение с последующим просветлением среды и выпадением осадка. На агаре образует колонии различной формы, от двояковыпуклых с перистыми краями, до колоний в виде сплетения тонких нитевидных отростков. Культуры гемолитичны, ферментируют с образованием кислоты и газа, глюкозу и фруктозу, не постоянно

глицерин, мальтозу; не ферментируют лактозу, сахарозу, маннит, салицин; редуцируют нитраты в нитриты [116, 136, 278].

C. oedematiens является токсигенным, при этом образующийся в процессе роста и размножения токсин значительно превосходит по силе токсина других видов анаэробов и сопоставим с токсином *C. tetani*.

Все типы *C. oedematiens* способны продуцировать растворимые токсины и ферменты. Первые два типа, часто участвующие в развитии злокачественного отека, образуют летальный и некротический α -токсин, который является сильнодействующим ядом, нарушающим проницаемость стенок сосудов, что ведет к экссудации жидкости и белка в ткани. Некоторые штаммы типа В образуют до 100 тыс. Dlm/мл токсина. Токсины γ , δ , ϵ в значительной мере усиливают действие основного токсина, ϵ -токсин (липаза) - летальный и гемолитический; γ - токсин (лецитиназа) - некротический и гемолитический; ζ -токсин (кислородолабильный гемолизин) имеет гемолитическое действие [20, 125, 193]. Виды продуцируемых токсинов представлены в таблице 2.

Таблица 2 - токсины и ферменты основных типов вида *C. oedematiens*

Наименование возбудителя	Токсины							
	1	2	3	4	5	6	7	8
	α	β	γ	δ	ϵ	η	θ	ζ
	альфа	бета	гамма	дельта	эпсилон	эта	тета	зета
<i>C. oedematiens</i> (novyi) тип А	+	-	+	+	+	-	-	-
<i>C. oedematiens</i> (gigas) тип В	+	+	-	-	-	+	-	+
<i>C. oedematiens</i> тип С (bubalorum)	-	-	+	-	-	-	-	-
<i>C. oedematiens</i> т. D (haemolyticum)	-	+	-	-	-	+	+	-

+ токсин или фермент, образуемый штаммами вида;

В зависимости от вида образуемого токсина было выделено четыре типа *C. oedematiens*, первый из которых *C. oedematiens* (novyi) тип А является наиболее часто встречающимся возбудителем газовой гангрены у человека и злокачественных отёков у различных видов животных [42, 62, 69, 193].

C. novyi тип А – является основным возбудителем гангренозного поражения тканей у человека и животных, *C. novyi* тип В является возбудителем некротического гепатита овец, реже крупного рогатого скота. Также он имеет еще одно наименование – *C. gigas*. *C. novyi* тип С считается непатогенным видом клостридий, хотя впервые был выделен при хроническом остеомиелите буйволов, четвертый тип *C. novyi* - тип D - возбудитель бациллярной гемоглобинурии КРС.

Некротический гепатит, острая неконтагиозная токсикоинфекция жвачных животных, чаще овец, но также встречается и у других животных. Возбудитель *C. novyi* тип В (*C. gigas*) образует высокоактивные токсины, действие которых вызывает некротическое поражение паренхимы печени. Болезнь впервые зарегистрирована в 1911 г. Gilruth [62] на острове Тасмания, он же выделил и подробно описал возбудителя инфекции.

Практически одновременно Albiston [62] доказал, что «черная болезнь» и «немецкий браздот» в Германии и Австралии представляют собой одно и то же заболевание и вызываются *C. oedematiens* (*C. novyi*).

В нашей стране вспышки некротического гепатита были описаны М.Д. Польшковским с соавторами [102], после чего при диагностике болезнь стали дифференцировать от браздота. Заболевание у овец встречается часто в центральных районах России, Дагестане, Прикаспийской низменности [35, 62, 132, 133].

Заражаются в основном взрослые животные, обычно в хорошем упитанном состоянии, молодняк поражается редко. Риск развития заболевания присутствует всегда, но одним из обязательных условий возникновения болезни является наличие поражения печени, вызываемое гельминтами, обычно фасциолами, а причиной гибели животных является острая неспецифическая токсемия [12, 76, 133].

Болезнь проявляется остро, животные погибают в течение нескольких часов после начала заболевания, часто без клинических признаков, либо они неспецифичны: слабость, нежелание двигаться, сонливость, анорексия, гипертермия, тахипноэ, тахикардия. Возможны слабая желтушность и гемоглобинурия. У крупного рогатого скота признаки заболевания схожи с таковыми у овец, кроме этого

могут присутствовать геморрагическое воспаление кишечника, запоры, кровь в фекалиях.

Характерным признаком является наличие в печени ишемических инфарктов – более светлых участков по сравнению с окружающими тканями и с пятнами голубовато-красных тромбозов. Некрозы небольшие, но множественные. Туши животных быстро разлагаются, при этом выражены геморрагические отеки подкожной клетчатки и скопление большого количества газов в брюшной полости.

2.2.6 Бациллярная гемоглобинурия является острым, инфекционным, токсическим заболеванием, вызываемым *C. novyi* *тип D*. Она поражает прежде всего крупный рогатый скот, но может быть обнаружена у овец и, редко, собак. Болезнь эндемична и часто встречается в западной части США, странах Южной Америки, особенно в Венесуэле и Чили, а также в Великобритании, странах Ближнего Востока и других частях мира. В России нет сведений о выделении культур этого возбудителя, описано обнаружение культур в Армении и Молдавии [35, 62]. Однако следует учитывать, что за последние несколько лет в страну ввезено по данным Россельхознадзора около 1 млн. голов крупного рогатого скота, в том числе из США, Австралии, Чили, Германии, Голландии, так что обнаружение данного возбудителя является делом времени.

После попадания в организм, споры с током крови разносятся по различным органам и тканям, и размножаются в органах, особенно в печени. Инкубационный период установить сложно, он может быть очень длительным, инфекция проявится лишь при возникновении предрасполагающих факторов: травмы, гельминтозы, высокое содержанием нитратов в рационе, нарушение обмена веществ, влекущее снижение кислорода в тканях печени. При благоприятных условиях споры прорастают, размножаются, образуют β -токсин, что приводит к внутрисосудистому гемолизу, гемолитической анемии и гемоглобинурии.

Болезнь протекает остро, крупный рогатый скот может быть найден мертвым без предварительно указывающих на заболевание признаков. В менее острых случаях наступает быстро развивающаяся интоксикация, повышенная температура, боли в животе, одышка, дизентерия, и гемоглобинурия, отеки в области живо-

та и грудины. Анемия и желтуха выражены в различной степени. Продолжительность клинических признаков колеблется от 12 ч. у беременных коров до 3-4 дней у скота других категорий. Смертность у нелеченых животных составляет до 95 %. Отдельные животные могут выздоравливать, но при этом становятся практически пожизненными носителями инфекции.

При вскрытии обнаруживают обезвоживание, анемию, отеки подкожной клетчатки. Легкие обычно без повреждений, в бронхах и трахее содержится кровавая пена с кровоизлияниями в слизистой оболочке. В брюшной полости содержится кровянистая жидкость, тонкий кишечник, а иногда и толстый, геморрагически воспалены, содержимое кишечника содержит значительное количество свободной или свернувшейся крови. Почки темные, рыхлые, усеяны кровоизлияниями. Мочевой пузырь содержит пурпурно-красную мочу. Трупное окоченение наступает очень быстро.

Клиническая картина и патологоанатомические изменения обычно позволяют правильно поставить предварительный диагноз. Наиболее ярким признаком является кроваво-винный цвет мочи и инфаркты в печени. Диагноз может быть подтвержден путем выделения *C. haemolyticum* из печени, крови или мочи, но следует учитывать, что возбудитель очень чувствителен к кислороду и выделить его достаточно трудно [35, 62].

2.2.7 Злокачественный отек - острая раневая инфекция, характеризующаяся быстро наступающими отеками и омертвением пораженной ткани с образованием газов и интоксикацией организма. Нельзя выделить какой-либо отдельный вид возбудителя, являющийся основным этиологическим фактором заболевания, как правило, они находятся в ассоциации и представлены следующими видами: *C. perfringens*, *C. oedematiens*, *C. septicum*, *C. sordellii*, *C. histolyticum*. Также в ряде случаев выделяются не патогенные клостридии, образующие протеолитические ферменты и в значительной степени осложняющие течение болезни и вызывающие гнилостный распад тканей. По частоте встречаемости из пораженных тканей чаще выделяются *C. perfringens* - 60-80 %, *C. oedematiens* - 20-30 %, *C. septicum* - 10-20 %, *C. sordellii* - 10-20 %, *C. histolyticum* - 10-20 % [22, 62, 79, 110]. Заболева-

ния, обусловленные смешанной инфекцией, клинически протекают тяжелее, быстрее и, как правило, заканчиваются летально [204, 207, 253].

У животных злокачественный отек чаще всего встречается при массовых хирургических операциях (стрижка, обрезка хвостов, рогов, кастрация), а также тяжелых родах. В зависимости от этого находится и локализация инфекционного процесса: матка в послеродовой период, голова, мошонка, достаточно часто может возникнуть поражение сычуга и тонкого отдела кишечника. Поскольку большинство перечисленных видов уже описаны ранее, остановимся здесь на других видах, в частности *C. sordellii* [22, 110, 258, 278]. Также стоит упомянуть, что согласно современной классификации данный вид исключен из рода *Clostridium*, и носит название *Paeniclostridium sordellii*.

C. sordellii представляет собой грамположительные крупные спорообразующие палочки с закруглёнными концами 0,5-1,7 x 1,5-20 мкм, располагающиеся изолированно, парно или в виде цепочек. Микроорганизм подвижен благодаря многочисленным жгутикам. Вид не относится к строгим анаэробам. На поверхности питательных сред через 24-48 часов роста образуются серовато-белые шероховатые колонии с неровными зубчатыми краями. На кровяном агаре с лошадиной кровью формируются колонии в виде ромбов с узкой зоной, бета-гемолиза. При культивировании на жидких питательных средах происходит интенсивный рост *C.sordellii* в течении 24 часов, сопровождающийся равномерным помутнением среды с образованием вязкого, мукоидного осадка и характерного острого гнилостного запаха, в старых бульонных культурах наблюдается образование осадка в виде мелких скоплений белых кристаллов тирозина [22, 35, 54, 143, 184, 273].

Большинство штаммов *C. sordellii* ферментирует с образованием кислоты и газа глюкозу и фруктозу, не действуют на сахарозу, инулин, декстрин, гликоген, крахмал, дульцит, лактозу. Лакмусовое молоко под действием *C. sordellii* сбраживается со слабым газообразованием. Разжижают свёрнутый яичный белок, свёрнутую сыворотку крови лошади, желатин, переваривают кусочки мяса и казеина, вырабатывают сероводород и индол, не восстанавливают нитраты в нитриты.

C. sordellii нередко обнаруживают в ранах, чаще в ассоциации с другими

анаэробными и аэробными микроорганизмами. Вирулентность выделенных штаммов *C. sordellii* для лабораторных животных обусловлена β -токсином, обладающей высокой биологической активностью и специфичностью. Токсин *C. sordellii* впервые был получен Сорделли в 1922 году из культуральной жидкости штамма, выращенного на мясном бульоне с добавлением пептона при pH 8,0. При введении морским свинкам в дозе 0,01 мл растущей культуры, токсин вызывал гибель животных через сутки и не нейтрализовался сыворотками других возбудителей газовой гангрены (*C. perfringens*, *C. oedematiens*, *C. septicum*, *C. histolyticum*). В последующем многие ученые получали токсин активностью до 10 тыс. Dlm/мл, достаточные количества которого накапливались в культуральной жидкости в течении 24 часов на бульоне с кусочками варёного мяса. Оптимальной средой для накопления токсина является питательный бульон из кислотного гидролизата казеина, содержащий 140-160 мг % аминного азота с добавлением 0,5 % глюкозы [22, 35, 62, 193, 258, 273].

C. sordellii часто выделяют при болезнях, симптомы которых характерны для других клостридиозов. Например, при внезапной смерти у овец всех возрастов, остром абомазите у телят и ягнят, геморрагическом энтерите, гангренозном поражении органов репродуктивного тракта новотельных коров. Абомазиты у подсосных телят и ягнят, вызванные *C. sordellii*, часто приводят к внезапной смерти. Часто возникновение болезни связано с отъемом молодняка от матерей, переходом на грубые корма, выгоном на пастбище, кормлением животных силосом [35, 62].

Клинически болезнь проявляется остро, отмечают болезненность органов брюшной полости, тимпанию, выраженное угнетение с анорексией. Диарея обычно не отмечается. Заболевание обычно носит спорадический характер и проявляется внезапной гибелью отдельных животных.

При патологоанатомическом вскрытии отмечают расширение сычуга, гиперемию сосудов, отек подслизистой оболочки, кровоизлияния и обширные некрозы слизистой с изъязвлениями. У отдельных животных может наблюдаться прободные язвы стенки сычуга.

Характерным признаком присутствия возбудителя при злокачественном отеке является поражение мышечной ткани, подкожной клетчатки, подслизистого слоя, с сильно выраженным студенистым отеком, имеющим желто-коричневую окраску, а также острая токсикоинфекция [22, 35].

При экспериментальной инфекции *C. sordellii* у морских свинок образуется резко выраженный студенистый отёк и обширное кровоизлияние в мышечной ткани. Если зараженные морские свинки не погибают в течении 2-3 дней, то отёк принимает значительные размеры. При введении животным больших доз культур *C. sordellii* в тканях быстро образуется большое количество газа с резким запахом. Мышечная ткань становится тусклой и рыхлой с обширными кровоизлияниями. Во внутренних органах наблюдается интенсивная гиперемия и кровоизлияния в надпочечниках, почках, кишечнике [62].

Учитывая, что часто злокачественный отек вызван ассоциацией возбудителей, при бактериаологическом исследовании обращают внимание на различия в морфологических и ферментативных свойствах. Кратко свойства основных клинически значимых видов клостридий представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Культурально-морфологические свойства наиболее клинически значимых возбудителей клостридиозов

Наименование возбудителя	Морфология клеток	Форма спор и их расположение	Характеристика роста на среде Кит-Тароцци	Характеристика колоний при росте на глюкозо-кровяном агаре
1	2	3	4	5
<i>C. bifermentans</i>	Грамположительные прямые палочки, в мазках расположены одиночно, попарно или в виде коротких цепочек	Споры овальной формы, с центральным или субтерминальным расположением. Образование споры не вызывает утолщение клетки	Газ не образуется, через 24 ч культивирования появляется осадок. Рост сопровождается гнилостным запахом	Мелкие круглые колонии с ровными краями, плоские или слегка выпуклые, полупрозрачные или непрозрачные, серые, блестящие и гладкие; гемолиз отсутствует, иногда слабый

1	2	3	4	5
<i>C. chauvoei</i>	Неравномерно окрашенные изолированные палочки, иногда соединенные по три, четыре вместе	Споры от продолговатой до круглой формы, расположены центрально или субтерминально или лежат свободно	Равномерное слабое помутнение и газообразование, через 24 ч бульон просветляется	Круглые плоские приподнятые с ровными краями, в виде перламутровой пуговицы или виноградного листа, узкая зона β -гемолиза
<i>C. colinum</i>	В свежих культурах грамположительные прямые палочки, в старых культурах грамотрицательные. Расположение в мазках: отдельными клетками или парное	Споры овальной формы, с субтерминальным расположением	Рост через 12-16 ч после посева. В начале роста активное газообразование, затем рост замедляется, газообразование прекращается, образуется белый осадок, среда просветляется	Колонии до 0,5 мм, округлые или слегка неровные, выпуклые, прозрачные, серые, реже белые или бесцветные, блестящие, гладкие. Окружены зоной альфа-гемолиза.
<i>C. septicum</i>	Изолированные палочки с закругленными концами, в мазках-отпечатках с серозных оболочек имеют форму нитей	Споры овальной формы, расположены субтерминально или центрально.	Интенсивное помутнение, обильное газообразование	Нежный бесцветный, вуалеобразный налет с микроскопически изрезанными краями и часто с нежными отростками, окружены зоной гемолиза
<i>C. sporogenes</i>	Палочки с закругленными концами, расположены одиночно, иногда цепочками	Споры овальные, расположены субтерминально. Споры образуются очень быстро, в мазках из культур почти у всех палочек обнаруживают споры. Образование спор приводит к увеличению толщины клетки	Рост обильный, кусочки печени обволакивают слизистым осадком, верх среды прозрачный, газообразование слабое, неприятный гнилостный запах	Круглые или неровные с ризоидными краями и приподнятым центром в виде переплетенных нитей («голова медузы»). Полупрозрачные с матовой поверхностью и желтовато-серым оттенком. Гемолиз интенсивный.
<i>C. sordellii</i>	Крупные полиморфные палочки с закругленными концами, расположены чаще цепочками по 2-4 клетки	Споры овальной формы, расположены субтерминально или центрально	Помутнение более интенсивное внизу, умеренное газообразование; при старении культур - слизистый осадок	Неправильной формы, корневидные, складчатые, с сероватой шероховатой поверхностью и изрезанными краями, гемолиз сильный.

1	2	3	4	5
<i>C. botulinum</i>	Толстые палочки с закругленными концами, расположены попарно, иногда в виде цепочек	Споры овальные или круглые, расположены субтерминально, редко центрально	Рост медленный, до 48 ч, газообразование слабое. Появляется интенсивная муть, которая постепенно оседает на дно, после чего бульон просветляется	Круглые, шероховатые или корневидные, нежно-серые колонии, гемолиз прозрачный
<i>C. difficile</i>	Грамположительные прямые палочки	Споры овальной формы с терминальным и субтерминальным расположением, в результате которых происходит набухание клеток	Через 24-48 ч клостридия вызывает диффузное помутнение с образованием зернистого осадка. Сопровождается запахом «скотного двора» или лошадиного помета.	Круглые, иногда ризоидные, плоские или слабо выпуклые, непрозрачные, сероватые с матовой поверхностью. У большинства штаммов гемолиз отсутствует. После 24-48 ч роста на кровяном агаре заметна бледно-желто-зеленая флюоресценция в ультрафиолетовом свете
<i>C. fallax</i>	Грамположительные прямые или слегка изогнутые палочки. В мазках расположены одиночно или парно	Споры овальной формы с центральным или субтерминальным расположением. Образование спор приводит к увеличению толщины клетки	Интенсивное помутнение, обильное газообразование	Мелкие, слегка выпуклые, полупрозрачные, серые, блестящие и гладкие колонии, круглые или слегка неправильной формы, с размытыми краями, внутренняя структура зернистая. При старении становятся матовыми; на кровяном агаре гемолиз
<i>C. tetani</i>	Тонкая палочка со слегка закругленными концами	Споры круглой формы, расположены субтерминально, напоминают барабанные палочки	Равномерная муть, слабое газообразование, через 48-72 ч среда просветляется, имеет запах жженого рога	Нежные колонии, центр слегка приподнят, от краев отходят неправильные отростки, гемолиз прозрачный

1	2	3	4	5
<i>C. histolyticum</i>	Стройные тонкие палочки с закругленными концами, расположены одиночно, парно, редко цепочками	Споры овальные, расположены центрально и субтерминально, имеют форму игольного ушка, приводящие к увеличению толщины клетки	Интенсивное помутнение без газообразования	Мелкие колонии от округлых до колоний с неправильной формой, от плоских до слегка выпуклых, от полупрозрачных до мутных; серо-белые, блестящие, с мозаичной поверхностью, с ровными или волнистыми краями; гемолиз слабый или отсутствует.
<i>C. oedematiens</i>	Крупные полиморфные палочки с закругленными концами, расположены одиночно, редко парно или цепочками по 3-4 клетки	Споры овальные, расположены субтерминально или центрально	Рост более интенсивный ввиду, через 18-24 ч МППБ просветляется, выпадает хлопьевидный осадок, газообразование слабое	Шероховатые, корневидные, складчатые с изрезанными краями и выпуклым темным центром, гемолиз сильный, прозрачный, но может отсутствовать.
<i>C. perfringens</i>	Толстые палочки со слегка закругленными концами, расположены одиночно	Споры овальные, расположены субтерминально или центрально. В мазках из свежего трупa и молодых культур спор не обнаруживают	Раннее помутнение и бурное интенсивное газообразование	Округлые, гладкие, выпуклые серовато-зеленые колонии. Гемолиз сильный, грязно-коричневого цвета, имеет две зоны. Среда приобретает буроватый оттенок.
<i>C. haemolyticum</i>	В свежих культурах Gr+ прямые палочки, в старых культурах грамотрицательные. В мазках имеют одинарное или парное расположение.	Споры овальной формы с субтерминальным расположением. Образование спор приводит к увеличению толщины клетки	Раннее помутнение и бурное интенсивное газообразование	Округлые, гладкие, блестящие, выпуклые серовато-зеленые колонии с зернистой структурой, слегка разрушенный волнистый край. Гемолиз сильный, имеет две зоны. Среда становится буро-коричневого цвета

Все возбудители клостридиозов обладают общей для спорообразующих бактерий устойчивостью к воздействию факторов окружающей среды и могут годами сохраняться в почве, а при благоприятных температурных условиях и влажности даже размножаться в ней. Споры выдерживают кипячение в течение нескольких минут [14, 24, 28, 62, 80, 136, 278].

Выраженной бактерицидной активностью по отношению к вегетативным формам клостридий обладают хлорамин (0,5 %); перекись водорода (6 %), формалин (0,5 %), и другие средства, вызывающие гибель клеток в течение 30-60 мин. Для уничтожения споровых форм применяют те же химические средства с большей концентрацией и экспозицией.

Подводя итог представленным сведениям о возбудителях клостридиозов, следует отметить, что все они продуцируют разнообразные токсины и ферменты, действие которых вызывает дегенеративные изменения в тканях и внутренних органах, нарушение процессов метаболизма и тяжелый токсикоз, приводящий к смерти. При болезнях, вызванных ассоциациями культур анаэробов, патогенное действие каждого из них усиливает друг друга [80].

2.3. Диагностика клостридиозов

Диагностику клостридиозов проводят комплексно с учетом эпизоотических данных, неблагополучия местности, клинических признаков, характерных патологоанатомических изменений. Лабораторная диагностика складывается из бактериологического исследования биологического материала. Идентификация и дифференциация происходит путем изучения культуральных, морфологических и биохимических особенностей культур [20, 67, 72, 84, 162, 198]. В настоящее время идентификация в значительной мере облегчена использованием диагностических тест-систем и ПЦР-диагностики [64, 197].

Несмотря на то, что клинические и патологоанатомические признаки заболеваний, вызванных клостридиями, часто позволяют точно поставить диагноз, например при столбняке, проведение бактериологических и токсикологических исследований патологического материала является обязательным. Лабораторный

диагноз на клостридиозы ставится комплексно на основании ГОСТ 26503-85 «Методы лабораторной диагностики клостридиозов» [20].

Особое значение для подтверждения диагноза имеет постановка биопробы на лабораторных животных, обычно на морских свинках. При этом патологоанатомические изменения у морских свинок бывают столь характерны, что позволяют поставить предварительный диагноз.

Характерные патологоанатомические признаки представлены в таблице 4.

Таблица 4 - Патологоанатомические изменения у морских свинок при заражении различными видами клостридий

Наименование/тип возбудителя клостридиозов	Патологоанатомические изменения
1	2
<i>C. perfringens</i> тип А - возбудитель злокачественного отека, некротического энтерита, энтеротоксемии, тип Д - энтеротоксемии	Кожа на месте инъекции часто отслаивается от мускулатуры, образуя мешок. Мышцы имеют вид вареного мяса, серовато-грязного цвета (более выражено при заражении типом А). Кишечник вздут, сосуды инъецированы
<i>C. perfringens</i> тип В - возбудитель дизентерии ягнят тип С - возбудитель энтеротоксемии поросят	Кожа на месте инъекции легко отделяется, но не отслаивается. Мускулатура сухая, красного цвета различных оттенков. Кишечник вздут, геморрагически воспален, иногда образуются язвы (тип В)
<i>C. chauvoei</i> возбудитель эмфизематозного карбункула	На коже наблюдают серозно-геморрагический выпот. Кожа с трудом отделяется от измененных мышц. Мышцы груди и брюшного пресса влажные, темно-красного цвета. Кишечник остается неизменным.
<i>C. septicum</i> возбудитель бродзота, злокачественного отека	Кожа легко отделяется от мышц. Мышцы и подкожная клетчатка светло-красного цвета, в подкожной клетчатке большое количество пузырьков газа. Кишечник вздут, наполнен разжиженными массами с пузырьками газа, сосуды инъецированы. В грудной полости и сердечной сорочке обнаруживают значительное количество транссудата
<i>C. oedematiens</i> возбудитель некротического гепатита, злокачественного отека	На месте инъекции наблюдается желатинозный, студенистый отек от желтоватого до слабо-розового цвета. Мышцы бледные
<i>C. histolyticum</i> возбудитель злокачественного отека	При заражении в мышцу бедра кожа красно-фиолетовая, напряжена, иногда лопается. Мышцы теряют свою структуру, расплавляются и превращаются в кашицеобразную массу с примесью сгустков крови. Мягкие ткани отделяются от костей и сосудов. Газ не образуется, гнилостного распада нет
<i>C. sordellii</i> возбудитель злокачественного отека	Наблюдается желатинозный студенистый отек от желтого до слабо-розового цвета. Мышцы бледные
<i>C. sporogenes</i>	Патогенен в ассоциации с другой микрофлорой
<i>C. botulinum</i> возбудитель ботулизма	Патологоанатомические изменения не характерны
<i>C. tetani</i> возбудитель столбняка	Патологоанатомические изменения не характерны

Одним из основных условий своевременной и правильной диагностики анаэробных инфекций является четко выполненная процедура отбора и пересылки патологического материала, так как многие возбудители анаэробных болезней быстро гибнут при контакте с воздухом.

Для диагностических исследований при подозрении на клостридиозы в лабораторию направляют свежие трупы телят и ягнят. От крупных животных после вскрытия направляют: кусочки тканей и паренхиматозных органов (печень, почки, селезенка), сердце с перевязанными сосудами; мышцы, взятые на границе здоровой и пораженной ткани; целую трубчатую кость.

В случае проведения прижизненной диагностики для исследования отбирают кровь, мочу, мазки и пунктат из пораженных органов, тканей и лимфатических узлов; при поражении органов репродуктивной системы – содержимое матки или истечения из влагалища [62, 115, 116, 229].

Отбор проб патологического и/или клинического материала, его упаковка и транспортировка осуществляется ветеринарными врачами предприятия или органов государственного контроля. Каждую пробу материала отдельно помещают в стерильные одноразовые контейнеры или стеклянную посуду, не допуская загрязнения их наружной поверхности. Транспортировать пробы необходимо в переносках с отдельными гнездами и возможностью соблюдения температурного режима. Отбор проб материала необходимо проводить до применения антибактериальных препаратов, при отсутствии такой возможности - непосредственно перед повторным введением [62, 79, 116].

Учитывая высокую чувствительность большинства видов клостридий к кислороду, пробы материала отправляют в лабораторию немедленно после получения с целью сохранения жизнеспособности возбудителей и предотвращения избыточного роста сопутствующей микрофлоры.

Пробы транспортируют и хранят до начала исследования в холодильнике при температуре 2-8 °С. В случае использования для транспортирования в лабораторию проб материала в пробирках с транспортировочной средой, обеспечива-

ющей жизнеспособность бактерий в течение 72 ч, допускается их хранение на среде Эймса при температуре 18-20 °С.

В случае невозможности отправки материала в лабораторию сразу после взятия, допускается его однократное замораживание, транспортирование и хранение при температуре минус 18 °С и ниже.

Для пересылки жидкого материала (тканевой экссудат, содержимое очагов поражения, кровь, моча) можно использовать шприцы. После наполнения шприца из него удаляют остатки воздуха, закрыв иглу стерильным ватным тампоном. Иглу дезинфицируют 70 %-ым этиловым спиртом. Для герметизации конец иглы вкалывают в стерильную резиновую пробку и в таком виде шприц с материалом доставляют в лабораторию. При сборе большого объема материала (3 мл и более) анаэробные бактерии могут оставаться жизнеспособными в течение 24 ч при комнатной температуре (18-20 °С).

Содержимое желудка и кишечника направляют в лабораторию после консервирования хлороформом (одна капля на 10 см³ патологического материала), а также стерильным 30-40 % раствором глицерина в соотношении 1:1. В случае быстрой доставки в лабораторию, допускается пересылать не консервированный материал. Отобранные пробы должны быть доставлены в лабораторию не позднее 4 часов с момента гибели животного, а консервированные - в течение 2 суток.

При необходимости установления источника заражения возможно направление на исследование объектов окружающей среды (почва, трава, фураж, подстилка, вода, смывы и т.д.) [20, 62, 75, 87, 132, 133, 229].

Учет, хранение, передача, транспортирование и утилизация материала, предназначенного для исследования на *Clostridium spp.*, должны осуществляться в соответствии с действующими санитарными правилами и нормами.

Исследование материала включает выделение и идентификацию возбудителя или его токсина в исследуемом материале.

Одним из критериев предварительной диагностики клостридиозов животных является обнаружение возбудителя в мазках, приготовленных из проб патологического материала. Мазки из крови, мочи и экссудата делают путем нанесе-

ния капли материала на стекло с последующим равномерным распределением по его поверхности. Для микроскопии мазков из органов и тканей готовят мазки-отпечатки. Для этого кусочек образца ткани, взятый по возможности из глубины исследуемого материала, разрезают пополам и свежим срезом несколько раз прикладывают к поверхности предметного стекла. Целесообразно готовить мазки отпечатки используя вторую часть образца материала, оставшуюся при посеве отпечатками на агаризированные среды.

Мазки подсушивают, фиксируют в спиртовой смеси или над пламенем горелки и окрашивают по Граму. Присутствие грамположительных палочек и спор позволяет предположить наличие возбудителей клостридиозов.

Материал, переданный на исследование в пробирках с транспортировочными средами, для приготовления мазков не используют в связи с высоким риском контаминации посторонней микрофлорой, либо мазки готовят после посева материала на питательные среды [35, 62, 132, 133].

Посев материала на питательные среды. Для выделения из материала анаэробных спорообразующих микроорганизмов проводят посев образцов жидкого и плотного материала на питательные среды.

Все образцы жидкого патологического материала (кровь, моча, экссудат) высевают по 1 капле на чашки Петри с плотными питательными средами, после чего равномерно распределяют по поверхности, используя бактериологическую петлю или шпатель; одновременно по 5-10 капель вносят в пробирки с жидкими питательными средами (Китт-Тароцци, МППБ под вазелиновым маслом, лакмусовое молоко) [20, 43, 67, 116].

Для посева используют свежеприготовленные жидкие питательные среды, либо активируют их перед посевом путем прогревания пробирок и флаконов в кипящей водяной бане в течение 15-20 мин для удаления растворенного в среде кислорода, а затем быстро охлаждают, добавляя холодную воду в водяную баню.

При подозрении на столбняк и ботулизм посев материала проводят в два флакона, один из которых прогревают вместе с засеянным материалом при 80 °С в течение 20 минут или 1 часа и инкубируют в течение 5 сут [24, 84, 136].

Плотный материал (кусочки органов и тканей) высевают на среды методом мазков-отпечатков, либо предварительно готовят суспензии.

В случае исследования образцов, поступивших в пробирках с транспортировочными средами Эймса, материал тампоном наносят только на одну четверть чашки Петри, дальнейший посев оставшихся трёх четвертей чашки производится по методу Дригальского, либо используют несколько чашек со средой. В жидкую питательную среду его засевают путем погружения тампона с последующим культивированием для накопления, далее проводят пересев культуры на плотные питательные среды для изоляции бактерий.

Культивирование посевов проводят в анаэроостате с температурным режимом 37 °С в течение 24-48 часов. Для создания анаэробных условий используют специальные газогенераторные пакеты, либо откачивают воздух с помощью вакуумного насоса, учитывая, что для культивирования различных видов требуется определённый уровень разрежения. При культивировании чашек с посевами в анаэроостате с газогенераторными пакетами, их помещают в него крышками вниз, при культивировании в вакууме – крышками вверх [69, 120, 222].

Посевы выдерживают в термостате при температуре 37-38 °С в течение 24-48 ч, а при подозрении на столбняк и ботулизм в течение 5 сут [20].

Биологический метод выделения клостридий. Одновременно с посевом, часть приготовленной суспензии патологического материала используют для заражения восприимчивых животных, как правило, морских свинок. Заражение двух морских свинок производится подкожно в области брюшных мышц или внутримышечно в объёме 0,5-1,0 см³. Целесообразно одну морскую свинку заражать материалом с добавлением в суспензию равного объема 10 % раствора хлористого кальция, так как некоторые виды клостридий не могут вызвать заболевание и гибель животных без наличия очагов воспаления в организме [20, 44, 48].

Наблюдение за животными продолжается в течении 72-96 часов. Обращают внимание на общее состояние, угнетенность, повышение температуры, наличие воспаления на месте инъекции [20, 69, 84, 162].

В случаях гибели животных с вышеперечисленными признаками проводят посев из крови сердца, а также печени, на МППБ и кровяной агар методом посева-отпечатка с целью выделения чистой культуры возбудителя. Метод позволяет очистить патологический материал путем пассажа через морскую свинку от посторонней непатогенной микрофлоры.

Дополнительно готовят мазки-отпечатки с мест посева и диафрагмальной поверхности печени, что позволяет дифференцировать отдельные виды клостридий, например в мазках с диафрагмальной поверхности печени *C. chauvoei* находится в виде единичных или парных клеток, а *C. septicum* в виде цепочек и нитей.

Через 24-48 часов культивирования проводят пересев с жидких питательных сред на 3-5 чашки Петри с МППА, в которые добавляют 0,5 % глюкозы и 5-10 % стерильной дефибринированной крови барана. Посев культивируют в течение 24-48 часов при температуре 37 °С в анаэробе. При обнаружении колоний, характерных по форме, цвету, характеру поверхности для рода *Clostridium*, из них готовят мазки, которые окрашивают и микроскопируют общепринятыми методами.

При наличии в мазках характерных грамположительных клеток и спор, сходных по морфологии с *Clostridium spp.*, проводят отсев отдельных колоний на среду Китт-Тароцци, МППБ и кровяной агар и яично-желточный агар для получения чистой культуры и накопления. Параллельно культуры сеют в МПБ и на МПА для выявления аэробов и факультативных анаэробов. Для работы отбирают культуры, которые не дают роста в контрольных посевах.

В случаях образования при посеве единичных колоний возбудителя, не позволяющих произвести микроскопирование и предварительную проверку свойств изолята, проводят отсев колоний на кровяной агар и МППБ с последующим культивированием в течение 18-24 часов при температуре 37 °С для накопления и получения чистой суточной культуры. В таком случае его изучение с целью идентификации проводят на один день позже [20].

При наличии чистой культуры бактерий, что подтверждается обнаружением в мазках однородных клеток и типичными колониями на агаре, проводят изучение его биохимических свойств для идентификации вида и типа возбудителя.

Культуры клостридий 24-48 ч роста со среды Китта-Тароцци или суспензию клеток, смытых с агара, засевают в пробирки с желатином, мясо-пептонным бульоном, лакмусовым молоком, с набором полужидких питательных сред с добавлением углеводов или многоатомных спиртов и культивируют в анаэробном состоянии. Результаты исследования оценивают ежедневно в течение 10 сут.

Подготовка инокулирующих суспензий и методика использования коммерческих наборов производится в соответствии с действующей инструкцией.

Определение ферментативных свойств клостридий является надежным методом идентификации их до вида, что отражено в различных определителях, наиболее актуальными из которых является определитель Берджи [136, 278].

Современные диагностические наборы (МикраЛаТест, RapID Ana II и др.), позволяют не использовать классические среды Гисса. Они представляют собой микротитровальные пластиковые стрипы, содержащие определенное количество лунок с субстратами. В каждой лунке содержится отдельный высушенный субстрат, активация которого происходит после добавления суспензии исследуемого микроорганизма. Субстрат при этом растворяется и вступает в реакцию с образующимися микроорганизмом ферментами, что проявляется в виде окрашивания содержимого лунки. Биохимические реакции проявляются изменением цвета, что оценивается визуально. В отдельных случаях бывает необходимо добавление в часть лунок специальных реактивов, способствующих активации прохождения реакции и изменению окраски субстрата [56, 127, 187, 199, 228].

Биохимические свойства наиболее часто встречающихся и клинически значимых видов возбудителей анаэробных болезней представлены в таблице 5.

Таблица 5 - Свойства клинически значимых для животных видов клостридий

Наименование теста	<i>C. fallax</i>	<i>C. colinum</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>C. septicum</i>	<i>C. sordellii</i>	<i>C. haemolyticum</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>C. histolyticum</i>	<i>C. novyi mun A</i>	<i>C. novyi mun B</i>	<i>C. novyi mun C</i>	<i>C. botulinum</i>	<i>C. tetani</i>	<i>C. difficile</i>	<i>C. chauvoei</i>
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Грам +	+	+	+	v	+	v	+	+	+	+	+	+	v	+	+
Расположение спор	ЦС	С	ЦС	С	ЦС	С	С.	ЦС	ЦС	ЦС.	ЦС.	С.	ТС	ТС	ЦС
Образование спор	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Каталаза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Анаэроб	+	+	+	+	+	+	+	v	+	+	+	+	+	+	+
Форма спор	O.	O.	O.	O.	O.	O.	O.	O.	O.	O.	O.	O.	KO	O.	O.
Подвижность	v	+	-	v	+	+	v	v	v	v	v	v	v	v	v
Гидролиз Желатина	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	v	+	+	+	+
Лактоза	v	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Уреаза	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Бета гемолиз	+	-*	+	+	v	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Индол	-	-	-	-	+	+	-	-	-	v	+	v	v	-	-
Ферментация глюкозы	+	+	+	+	+	+	+	-	v	+	+	+	-	+	+
Лецитиназа	-	-	+	-	v	+	v	-	v	+	-	v	-	-	-
Сукроза	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-	-	+
Гидролиз эскулина	+	+	v	v	v	-	+	-	-	-	-	v	-	v	+
D-манноза	v	+	+	v	v	v	-	-	-	v	+	v	-	v	+
Мальтоза	+	+	+	+	v	-	v	-	v	v	-	v	-	-	+
Целлобиоза	v	-	v	v	-	v	-	-	-	-	-	-	-	v	-
Салицин	-	v	-	v	-	-	-	-	v	-	-	-	-	v	-
D-ксилоза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-
Трегалоза	-	+	v	v	-	v	-	-	-	-	-	v	-	v	-
Раффиноза	-	+	v	-	-	v	-	-	-	v	-	-	-	-	-
ONPG	n	n	+	+	v	n	-	v	n	n	n	-	-	-	n
D-маннитол	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v	v	-
Дезоксирибонуклеаза	+	n	+	v	-	-	v	-	-	-	-	v	v	-	+
Гидролиз казеина	-	-	v	v	v	-	+	v	v	v	v	v	v	-	-
Липаза	-	-	-	-	-	-	v	-	+	-	-	+	v	-	-
L-рамноза	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-арабиноза	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Мелибиоза	-	-	v	-	-	v	-	-	-	-	-	v	-	-	-
Гидролиз крахмала	-	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-
D-Сорбитол	-	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	v	-	v	-
Глицерол	-	n	-	-	-	v	-	-	v	-	-	-	-	-	-
Мио-инозитол	-	-	v	-	-	v	-	-	v	v	+	-	-	-	-
Дульцитол	-	n	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	v

* – альфа гемолиз, + – положительное значение теста, - – отрицательное значение теста, v – варибельный результат значения теста, n – не определялись, K. – круглая форма спор, O. – овальная форма спор, Ц. – центральное расположение спор, С. – субтерминальное расположение спор, Т. – терминальное расположение спор

Определение токсичности выделенных культур. Окончательную идентификацию возбудителей подтверждают путем определения продукции экзотоксинов и их инактивации специфическими сыворотками. Поскольку все патогенные клостридии образуют в процессе роста видоспецифические токсины, их

идентификация позволяет быстро и правильно поставить диагноз. Токсин в материале определяют по наличию летального эффекта после внутривенного введения белым мышам центрифугата или фильтрата суспензии патологического материала, а тип токсина - по нейтрализации летального эффекта в реакции со специфическими антитоксическими сыворотками на белых мышах [20, 83, 110].

Для идентификации токсина в реакции нейтрализации, исследуемый материал (надосадов или фильтрат культуральной жидкости) делят на две пробирки. В первую пробирку вносят равное количество антитоксической видоспецифической сыворотки с активностью 5-10 АЕ, во вторую пробирку к материалу вместо сыворотки добавляют стерильный физиологический раствор [83, 110, 243, 247].

Обнаружение токсинов *C. perfringens* различных типов.

Обнаружение токсинов *C. perfringens* является важным диагностическим тестом, позволяющим поставить предварительный диагноз без проведения бактериологических исследований, так как образуемые токсины видоспецифичны. Для обнаружения токсинов используют культуральную жидкость, где выращивались чистые культуры возбудителей, либо содержимое кишечника больных животных. При исследовании следует учитывать, что токсины в кишечнике разрушаются достаточно быстро, и их отсутствие не говорит об отсутствии инфекции [20, 32, 83, 84, 179].

В зависимости от консистенции материала содержимое кишечника разводят физиологическим раствором 1:1 или 1:2 и тщательно перемешивают. Смесь выдерживают при комнатной температуре в течение 1 ч для экстрагирования токсина, после чего фильтруют через ватно-марлевый фильтр и центрифугируют 20 мин при 3-5 тыс. об/мин. Полученную надосадовую жидкость проверяют на токсичность путем внутривенного или внутрибрюшинного введения двум белым мышам массой 16-18 г в дозе 0,5 см³ или внутривенного введения кролику массой 1,8-2,0 кг в дозе 1,5 см³. При наличии токсина в исследуемой пробе животные погибают в течение 12 ч. Для снижения риска гибели подопытных животных от неспецифических причин, целесообразно надосадовую жидкость профильтровать через стерилизующие фильтры с размером пор 0,2-0,22 мкм.

Обнаружение токсина *C. perfringens* в культуральной жидкости.

Для выявления токсинов в питательной среде, изоляты *C. perfringens* культивируют в МППБ с добавлением 0,5 % глюкозы в течение 8-16 ч, затем среду центрифугируют в течение 20 минут при 3 тыс/об в минуту, надсадок аккуратно отбирают и разливают на две пробирки в равном количестве. Культуральную токсинсодержащую жидкость из одной пробирки без каких-либо обработок вводят внутривенно двум белым мышам в объеме 0,5 см³, жидкость из другой пробирки предварительно подвергают активации добавлением 0,5 % панкреатина или 0,25 % трипсина при pH 8,0-8,2, который устанавливают путем подщелачивания 10 %-ным раствором NaOH. Смесь культуральной жидкости с ферментом выдерживают при температуре 37-38 °C в течение 1-2 ч. После воздействием ферментов токсичность культур типов D и E значительно увеличивается, а токсичность культур типа C резко снижается. Токсичность культур типа B может сохраниться на прежнем уровне за счет активации эпсилон-токсина [32, 37, 43, 102, 177, 189].

Определение типа летальных токсинов *C. perfringens*.

Постановка реакции нейтрализации с диагностическими антитоксическими сыворотками *C. perfringens* типов A, C, D, и E [20, 48, 92, 127, 134].

Для определения типа основных летальных токсинов *C. perfringens* в РН используют содержимое кишечника павших животных и/или фильтраты культур *C. perfringens*, и стандартные антитоксические сыворотки к альфа, бета, эпсилон и йота токсинам *C. perfringens* [32, 178, 241].

РН ставят на белых мышах, реже морских свинках или кроликах. При постановке реакции на мышах результаты оцениваются по гибели или выживанию животных, обработанных смесью сывороток и токсина. При использовании морских свинок (кроликов) определяют наличие или отсутствие дерманекротического действия смесей сывороток и токсина на месте их внутрикожного введения. Для этого у животных удаляют шерсть на боку (ближе к сагитальной линии) и на следующий день в это место вводят смеси сывороток и токсина.

Для определения типа основного токсина исследуемый материал разливают по 1,0 см³ в пять пробирок и добавляют по 1,0 см³ сыворотки каждого типа: в

первую пробирку сыворотку типа А, во вторую - типа С, в третью - типа D, в четвертую - типа Е (активность сывороток каждого типа предварительно устанавливают 10 АЕ), в пятую добавляют 1,0 см³ физиологического раствора (контроль). Смесь сывороток и исследуемого материала после выдерживания при 37-38 °С в течение 30 мин вводят по 0,5 см³ внутривенно или внутривентально двум белым мышам или внутрикожно по 0,2 см³ морской свинке или кролику. Одновременно в тех же дозах вводят материал из контрольной пробирки. Для каждой смеси используют отдельный шприц. Наблюдение за животными ведут в течение 48 ч. [20, 69, 72, 78, 81, 127, 134, 234, 243].

Результаты реакции нейтрализации учитывают при гибели контрольных белых мышей или образовании некроза в контроле у морской свинки (кролика). Оценку результатов проводят в соответствии с таблицей 6.

Таблица 6 - Определение типа токсина *C. perfringens* в реакции нейтрализации

Тип культур <i>C. perfringens</i>	Тип токсина	Антитоксические сыворотки				Контроль
		А	С	D	Е	
А	Альфа	-	н	н	н	+
С (В, F)	Бета	+	-	+	+	+
D	Эпсилон	+	+	-	+	+
Е	Йота	+	+	+	-	+

+ мыши пали, у морских свинок/кроликов некрозы на месте введения;
 - белые мыши живы, у морских свинок и кроликов некрозы отсутствуют;
 н - результаты не учитывают.

Животные, получившие смесь токсина с гомологичной сывороткой, остаются живыми, а у морских свинок и кроликов некроз не развивается [20, 69, 84].

Обнаружение токсина *C. tetani* в патологическом материале и определение его активности.

Суспензию материала (как правило, используют раневое содержимое), предварительно профильтрованную через ватно-марлевый фильтр или осажденную центрифугированием, вводят подкожно в лапку двум белым мышам или двум морским свинкам в дозе 0,5 и 1,0 см³ соответственно. При наличии токсина у животных в течение 5 сут развивается характерная клиника столбняка [24, 231, 239].

Отсутствие положительного результата обнаружения токсина в патологическом материале не дает право постановки отрицательного диагноза, так как трав-

мы, служащие воротами инфекции могут быть очень незначительны и незаметны, а количество токсина очень мало, что не позволяет выявить его лабораторным методом без дополнительного накопления [24, 41, 52, 115, 153, 161].

Токсичность штаммов *C. tetani* устанавливают на белых мышах массой 16-18 г каждая или на морских свинках. Фильтрат 6-12-суточной культуральной жидкости вводят в лапку внутримышечно двум белым мышам или двум морским свинкам в дозе 0,5-1,0 см³. При наличии токсина у животных в течение 3-5 сут. развивается характерная клиника столбняка: резкое напряжение хвоста с искривлением его в сторону инъекции, далее развивается спазм мышц ноги и искривление позвоночника. В случае большой дозы введенного токсина развивается судорожный паралич тела и гибель животного от остановки дыхания [24, 52, 248, 255].

Идентификация токсина *C. tetani* не требует постановки РН, так как при введении материала у подопытных животных образуются характерные, только столбняку свойственные клинические признаки заболевания.

Для постановки опыта используют стерильную культуральную жидкость, фильтрат или центрифугат, или фильтрат суспензии патологического материала. Фильтрат вводят подкожно около хвоста белым мышам в объеме 0,5-1,0 см³ или двум морским свинкам в объеме 3-5 см³.

При наличии в исследуемом материале столбнячного токсина у подопытных животных в течение 24-96 ч развиваются признаки заболевания, характеризующиеся тетаническим сокращением мышц, вначале отдельных групп, а затем и всей мускулатуры. Животные погибают в характерной позе с искривленным позвоночником, вытянутой лапкой, в которую вводили материал. В случае обнаружения столбнячного токсина в исследуемом материале дальнейшую работу по выделению культуры не проводят.

Результаты РН учитывают в течение 4 сут. Животные, которым исследуемый материал ввели в смеси с гомологичной сывороткой, остаются живыми, остальные погибают с клиническими признаками столбняка [24, 52, 83].

Обнаружение токсина *C. oedematiens* в патологическом материале при подозрении на некротический гепатит [20, 35, 37, 41].

Кусочки печени с некротическими очагами в количестве 25-30 г измельчают в ступке и заливают равным количеством физиологического раствора. Полученную взвесь выдерживают 2 ч при температуре 20-22 °С, после чего центрифугируют 20 мин. при 3000 об/мин. Надосадочную жидкость вводят внутрибрюшинно или подкожно двум белым мышам в дозе 0,5-1,0 см³. При наличии токсина животные погибают в течение 24-72 ч. Также определяют и токсичность чистых культур *C. oedematiens*, вводя внутривенно или внутрибрюшинно мышам фильтрат двухсуточных культур. При наличии токсина гибель белых мышей наступает через 24-72 ч [21, 30, 41, 61].

2.4. Специфическая профилактика клостридиозов.

Возбудители болезней анаэробной этиологии (злокачественный отек, некротический гепатит, бродячка, эмфизематозный карбункул, столбняк, анаэробная энтеротоксемия, анаэробная дизентерия) вызывают обширные поражения различных систем и тканей организма, сопровождающиеся быстро нарастающим токсикозом, гангренозными поражениями органов и практически в 100 % случаев заканчиваются летально. Клостридиозы являются серьёзной проблемой скотоводства и овцеводства не только за счет нанесения экономического ущерба из-за заболевания и гибели животных, но также из-за возникновения стойкого неблагополучия местности, контаминированной спорами возбудителей и потерями от наложения карантинных мероприятий и ограничений [30, 35, 58, 62, 92, 127, 134].

В связи с широким распространением возбудителей в окружающей среде, острым или сверхострым течением болезни, тяжестью поражения тканей организма, лечение животных почти в 100 % случаев неэффективно [20, 25, 50, 108, 127, 273]. Основным способом предотвращения болезней анаэробной этиологии является специфическая профилактика [3, 48, 92, 259, 262].

Эффективность вакцин зависит от многих факторов, в том числе количества и качества антигена, консервантов, адъюванта, иммуностимуляторов, технологии изготовления препарата, схемы его применения. Важную роль играет и иммунный статус организма животного [29, 114].

При создании средств специфической профилактики исследователи должны стремиться к разработке идеальной вакцины, которая при однократном введении обеспечивала бы пожизненный иммунитет к большинству инфекционных болезней, и обладала при этом абсолютной безопасностью для организма. К сожалению в настоящее время таких вакцин не существует, но при разработке новых иммунобиологических препаратов следует к этому стремиться. Одним из способов достижения этой цели является разработка ассоциированных вакцин, которые позволяют оптимизировать схему вакцинаций, снизить количество стрессов у животных и трудозатраты [30, 40, 43, 61, 117, 127, 134, 175, 262].

При создании ассоциированных вакцин большое значение из-за конкуренции компонентов имеет подбор антигенов, который ограничивает возможности их совместного применения, что отражается на номенклатуре разработанных и применяемых в настоящее время препаратов [13, 19, 49, 61, 69, 91, 118].

Теоретически число компонентов в комплексных вакцинах может быть неограниченным, однако следует учитывать, что взаимодействие антигенов в препарате часто снижает его эффективность. Связано это со значительной антигенной нагрузкой из-за большого количества вводимых чужеродных веществ, высокой концентрацией белковых соединений и т.д., и проявляется возникновением нежелательных системных (аллергии, анафилаксия, аборт и т.д.) и/или местных реакций (отеки, абсцессы, уплотнения).

Нежелательных эффектов можно избежать путем правильного подбора антигенов и их концентраций в комплексных вакцинах. Есть достаточно много примеров, когда специфическая профилактика осуществляется с помощью ассоциированных вакцин, при этом обеспечивается высокий уровень иммуногенности. Также следует учитывать преобладание ожидаемой пользы применения вакцины над риском возникновения нежелательных последствий [35, 69, 105, 118].

Клостридии больше других возбудителей инфекционных болезней животных подходят для создания ассоциированных препаратов, так как сходны в антигенном плане. Несмотря на значительное разнообразие клинических форм болез-

ней, они имеют одинаковый патогенез, при котором болезнь возникает за счет высокоактивных токсинов, образующих при попадании бактерий в ткани организма.

Поскольку анаэробные инфекции часто вызываются ассоциацией возбудителей, для профилактики также целесообразно использовать ассоциированные вакцины, включающие широкий спектр клинически значимых возбудителей таких болезней как анаэробная энтеротоксемия, некротический гепатит, эмфизематозный карбункул, бродяток, столбняк и др. [36, 61, 69].

Вакцинацию животных против клостридиозов, в частности против эмфизематозного карбункула и злокачественного отека, предложили французские исследователи Карневен, Арлуэн и Том в 1882 г. В качестве вакцинного материала они использовали порошок из высушенных и растертых мышц больного животного, разведенный стерильной водой 1:2, который вводили двукратно с интервалом 10-12 дней. Для ослабления вирулентности материал прогревали в течение 7 часов при 95-100 °С. В 1896 г. И.Нильсон и А.И. Иерсен подвергли массовой вакцинации от энтеротоксемии овец, используя порошок тканей животных, павших от этого заболевания. Возбудитель в тканях был предварительно инактивирован нагреванием. Эти исследования не приносили ожидаемого эффекта, так как при нагревании разрушались токсины, обладающие иммуногенными свойствами.

В 20-х годах прошлого века стали создаваться ассоциированные вакцины против клостридиозов. В 1924 г. Аллен и Босвор (Германия) проводили эксперименты по одновременной иммунизации крупного рогатого скота против злокачественного отека и эмфизематозного карбункула. В 1925 г. Даллинг (Англия) провел комплексную иммунизацию овец против эмкара и бродзота. В 1926 г. G. Ramon (Франция), были разработаны препараты из антигенов нескольких возбудителей и получены положительные результаты их применения как в медицине, так и в ветеринарии. В 1928 г. Лекланш и Валле получили положительные результаты вакцинации овец инактивированными препаратами из смеси культур *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. perfringens* и *C. oedematiens* [35, 69, 220, 259].

В тридцатые годы в разных странах практически одновременно были изготовлены и стали активно применяться вакцины против эмфизематозного карбун-

кула и злокачественного отека животных, изготовленные из инактивированных формалином культур. В 1938 г. Вольтерс и Демель получили положительные результаты, иммунизируя двукратно овец сразу против инфекций, вызываемых *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. perfringens* и *C. gigas*. В это же время в Югославии была разработана эффективная бивалентная вакцина против эмкара и злокачественного отека, однако попытки расширить спектр компонентов путем внесения антигенов *C. perfringens* и *C. oedematiens* показали снижение иммуногенности вакцины.

В это же время исследователи начинают постепенно совершенствовать препараты против анаэробных болезней и применять вакцины, изготовленные не на основе культур клостридий, а из очищенных и концентрированных анатоксинов.

В 1942 г. Кольмер, используя поливалентные токсоиды, получил удовлетворительные результаты образования иммунитета к токсинам возбудителей бродзота и злокачественного отека, однако отмечал, что опыты по профилактике анатоксинами некротического гепатита оказались неудачны [62, 110, 206].

Бергеймер А.В. в 1947 г. установил, что одновременное введение токсоидов *C. septicum*, *C. perfringens* и *C. oedematiens* позволяет получить такой же уровень иммунитета, как при вакцинации моно-антигенами этих культур.

В том же году исследователями Титель и Логан был изготовлен и использован для иммунизации лабораторных животных комплексный анатоксин с добавлением алюмокалиевых квасцов, игравших роль адъюванта, что позволило индуцировать у животных напряженный иммунитет к *C. perfringens* и *C. oedematiens*.

В последующем стали получать положительные результаты при применении ассоциированных вакцин не только из различных видов клостридий, но и ассоциации их с другими возбудителями, в частности, с сибирской язвой и пастереллезом. Одновременно Л.П. Дельпи в 1952 г. опубликовал данные о возможности иммунизации крупного рогатого скота одновременно против паратифа, сибирской язвы, эмкара и ящура [35, 62, 69].

Венгерские исследователи Сцелеш и Елек проводили в 1952 г. комплексную иммунизацию ассоциированными препаратами против столбняка и сибирской язвы, а также против сибирской язвы и злокачественного отека. В 1953 г. Квин ре-

комендует для профилактики клостридиозов вакцину из антигенов *C. septicum* и *C. chauvoei* [62, 69].

В том же году в Югославии опубликованы данные (Р.В. Катиш.), свидетельствующие о синергидном действии антигенов при одновременном введении, что доказано в опыте по одновременной иммунизации против столбняка и ботулизма тип С и Д. [35, 62, 69].

В 1955 г. Баргман опубликовал результаты опытов по иммунизации животных лиофилизированным комбинированным препаратом из культур *B. bovis* №19, *C. chauvoei* и *C. septicum*.

В Югославии в 1960 г. Р.В. Катич получил положительные результаты при иммунизации овец против энтеротоксемии и некротического гепатита. Также было установлено, что напряженный иммунитет при вакцинации против перечисленных клостридиозов можно достичь лишь при предварительно проведенной дегильминтизации, особенно от фасциолеза.

В Иране была разработана ассоциированная вакцина против анаэробных болезней, вызванных *C. septicum*, *C. perfringens* и *C. Oedematiens*, её применение позволяло получить положительные результаты, что выражалось отсутствием случаев заболевания иммунизированных овец [35, 40, 62, 69].

По мере совершенствования технологии изготовления препаратов против клостридиозов, возникла необходимость их стандартизации. Также важно было разработать объективные методы контроля анаэробных препаратов, поскольку разные серии одной вакцины не всегда позволяли достичь желаемого эффекта.

В СССР проблема борьбы с клостридиозами стояла чрезвычайно остро, однако против анаэробных болезней изготавливалась и ограниченно применялась только вакцина против эмфизематозного карбункула. Автором препарата являлся С.Н. Муромцев, предложивший его в 1931 г. Производство и внедрение вакцины в практику позволило уйти от ранее применяемых для иммунизации «блеклегоидов», представляющих собой болюсы, спрессованные из порошка мышц животных, павших от эмфизематозного карбункула. Мышечную ткань перед использованием прогревали при 97 °С в течение 5-6 часов. Способ разработал Kitt в Ита-

лии в 1908 г., и до 1918 г. «блеклегоиды» ввозились в Россию из-за границы, а затем их изготовление было налажено в стране на Донской и Днепропетровской ветбаклабораториях [49, 61, 69, 91, 120].

Вакцина, предложенная Муромцевым, представляла собой культуру высоковирулентного штамма *C. chauvoei*, выращенную в питательной среде и инактивированную формалином, что делало ее полностью безопасной для животных и достаточно эффективной [120, 122].

В 1936 г. М.Д. Польшковским была разработана и впервые применена с целью профилактики анаэробной дизентерии ягнят инактивированная вакцина, изготовленная из высокотоксигенных штаммов *C. perfringens* тип В. Препарат отличался тем, что для инактивации возбудителя использовали не физические факторы – нагревание, а химические. Инактивацию проводили путем добавления формалина или фенола, что сразу положительно отразилось на протективных свойствах препарата [102].

В 1946 г. А.А. Волковой была получена полужидкая вакцина против бродзота овец, изготовленная из инактивированных культур *C. septicum*. В 1960 г. В.И. Ленков внедрил в практику препарат против анаэробной энтеротоксемии овец [14, 35, 69].

Параллельно предпринимались попытки изготовить комплексные препараты. Ещё в 1926 г. Аманжулов и др. описывали опыты по одновременной вакцинации против сибирской язвы и эмфизематозного карбункула, не добившись правда положительного результата [37].

В 1932 г. Я.Р. Коваленко разработал метод одновременной вакцинации крупного рогатого скота инактивированной вакциной против эмкара и вакциной Ценковского против сибирской язвы. При этом установлено отсутствие конкуренции антигенов и подтверждено наличие напряженного иммунитета у вакцинированных животных [35, 62, 78].

В последующем ими была доказана возможность применения бивалентных и поливалентных антигенов против анаэробных болезней (эмкара, бродзота, энтеротоксемии, злокачественного отека). В качестве адьюванта при этом использо-

вались алюмокалиевые квасцы. Так в 1948 г. была создана вакцина против браздзота и энтеротоксемии овец из культур *C. septicum* и *C. perfringens* тип С, а в 1952 г. А.В. Ляушкиным препарат аналогичного состава с дополнительным компонентом *C. oedematiens* [76, 77].

А.А. Волковой была создана и применялась в течение нескольких лет вакцина против браздзота и энтеротоксемии овец из штаммов *C. perfringens* тип В. В последующем она была снята с производства в связи с неоднозначными данными по эффективности [14, 36].

В 1954-1957 гг. Ф.И. Каган и А.И. Колесовой создана вакцина против браздзота, злокачественного отека, анаэробной энтеротоксемии овец и анаэробной дизентерии ягнят, изготовленная из *C. septicum*, *C. oedematiens*, *C. gigas* и *C. perfringens* типов В, С и D. Вакцина была внедрена в практику, выпуск освоен несколькими биофабриками. В неизменном виде препарат выпускается до настоящего времени, несмотря на целый ряд недостатков [36, 61].

В Казахском НИВИ в 1957 г. разработана вакцина против браздзота и браздзотоподобных заболеваний овец, получены положительные результаты в опытах на лабораторных животных, однако в дальнейшем препарат не получил распространения в практике.

Также в 1957 г. была разработана вакцина из штаммов *C. septicum*, *C. oedematiens* и *C. perfringens* типов В и D против браздзота, энтеротоксемии и злокачественного отека овец. Однако препарат не имел стабильности по компоненту *C. oedematiens* и был со временем снят с производства [35, 61, 69].

В том же году Г.А. Коломакин и У.С. Сарсеннов проводили опыты по одновременной вакцинации КРС против бруцеллеза вакциной из шт. 19 и фармолвакциной против эмфизематозного карбункула. При этом установили, что совместная иммунизация не снижает реактивности противобруцеллезного препарата. Также не зафиксировано случаев заболевания вакцинированных животных эмкармом, хотя опыты по экспериментальному заражению не проводились.

В 1958 г. Лукашовым И.И. доложено о возникновении осложнений при иммунизации скота ассоциированной вакциной против эмфизематозного карбункула

и сибирской язвы животных. Однако другим автором, В.В. Готовым, в 1959 г. опубликован доклад о применении в Куйбышевской обл. одновременной вакцинации против сибирской язвы и эмкара. Всего было вакцинировано более 255 тыс. голов, при этом отмечалась экономическая целесообразность одновременных вакцинаций [61, 69].

А.С. Легкий в 1958 г. использовал анатоксины *C. septicum*, *C. oedematiens*, *C. perfringens* и *C. histolyticum* для иммунизации лошадей, при этом установил, что длительность иммунитета составляет не менее шести месяцев [35]. .

В последующем было проведено значительное количество исследований, когда в состав уже разработанных вакцин против анаэробных болезней добавлялись компоненты против пастереллеза, лептоспироза, кампилобактериоза и других инфекций, однако широкого распространения они не получили.

Основным препаратом против клостридиозов на протяжении более чем шестидесяти лет остается вакцина концентрированная гидроокисьалюминиевая против браздота, анаэробной энтеротоксемии, злокачественного отёка овец и дизентерии ягнят из *C. oedematiens*, *C. septicum*, *C. perfringens* типов В и Д, инактивированных формалином, с адъювантом гидроокисью алюминия [36, 62]. Недостатками указанной вакцины являются ограниченный антигенный состав, где отсутствуют распространенные виды, такие как *C. perfringens* *mun* А, *C. chauvoei* и *C. tetani*; высокая реактогенность препарата, являющаяся следствием того, что при изготовлении не применялись способы очистки, недостаточная продолжительность иммунитета. К тому же вакцина предназначена только для овец [35, 61, 69].

Также данный препарат является морально устаревшим, так как содержит в своем составе инактивированные клетки клостридий с низкой концентрацией анатоксинов. Недостаточное количество анатоксинов, перегруженность препарата микробными клетками и спорами, а также значительное количество белков питательной среды, полностью переходящих в препарат при адсорбции, приводят к тому, что вакцина обладает недостаточной иммуногенностью, высокой реактогенностью и коротким сроком иммунитета, не превышающим 4-6 мес [36].

Этот препарат в 1979-1984 гг. был усовершенствован Л.В. Кириловым, предложившим при изготовлении вакцины очищать анатоксины от микробных клеток. Полученный таким образом комплексный анатоксин против клостридиозов представлял собой безопасный препарат с иммуногенностью не менее 10 месяце в сравнении с 3-4 мес у основной вакцины [61, 69].

Такое изменение технологии было связано с тем, что многочисленными трудами ученых [13, 18, 30, 34, 36, 41] доказана актуальность при клостридиозах антитоксического иммунитета, и все современные ветеринарные импортные препараты содержат в своем составе концентрированные анатоксины без микробных клеток. О ведущей роли антитоксического иммунитета при токсико-инфекциях клостридиозной этиологии написано много работ [36, 81, 134, 137, 168]. На основании многочисленных экспериментов установлено, что антибактериальный иммунитет имеет второстепенное значение. Широкого распространения полианатоксин не получил, так как, во-первых, был значительно дороже вакцины аналогичного состава, во-вторых, имел достаточно узкий спектр возбудителей, имел сложно выполняемый контроль, поскольку для его проведения требовались стандартные антитоксические сыворотки, которые в СССР не выпускались. К тому же полианатоксин был разработан и предложен только для профилактики болезней овец.

Несмотря на значительное количество выполненных работ по изучению клостридиозов овец (в СССР были заняты несколько ведущих ветеринарных институтов), практически отсутствуют работы по разработке вакцин для КРС.

Так из доступных нам литературных источников можно назвать статью Ф.И. Каган и Никифоровой за 1966 г. [39], сообщающую об изыскании вакцины против эмфизематозного карбункула, злокачественного отека и пастереллеза крупного рогатого скота, которая, несмотря на положительные результаты лабораторных исследований, не была внедрена в практику.

Также известен препарат В.П. Земляковой против клостридиозов животных и птиц, содержащий в качестве антигенов анатоксины клостридий видов *C. perfringens* типов А, В и Д, *C. oedematiens*, *C. septicum*, *C. tetani*, *C. botulinum*, формалин и гидроокись алюминия [30]. Препарат представлял собой смесь ана-

токсинов и анакультур 12 различных видов и типов клостридий, в том числе трех типов *C. botulinum*. Несмотря на наличие патента, утвержденную технологию и хорошую эффективность, препарат никогда не выпускался. В первую очередь это было связано с высокой себестоимостью производства. Помимо стоимости, недостатком препарата являлся слабый антитоксический иммунитет из-за перегруженности антигенами и низкое количество каждого из них, в следствие чего вакцинацию сельскохозяйственных животных проводили трехкратно. Препарат содержал почти весь спектр ботулинистических анатоксинов, неактуальных для КРС. Препарат не был зарегистрирован и внедрен в практику.

Также в литературе есть сведения о ассоциированной вакцине против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозе телят [121], содержащей токсины и суспензии клеток *C. perfringens* типов А, С и Д, адгезивные антигены эшерихий К99, А20 и ТС- и ТЛ-анатоксины, инактиватор формалин и гидроокись алюминия в качестве адъюванта. Вакцина индуцирует напряженный иммунитет у молодняка и взрослого крупного рогатого скота продолжительностью до 12 мес при двукратном введении. У телят, полученных от вакцинированных коров, формируется колостральный иммунитет длительностью до 1,5 мес. Препарат не зарегистрирован и не выпускается.

Следует отметить, что для вакцинации стельных коров с целью создания колострального иммунитета у новорожденных телят против актуальных для молодняка инфекционных болезней, целесообразно применение комплексных вакцин, предназначенные для профилактики болезней различной этиологии, например эшерихиоза, анаэробной энтеротоксемии, ротовирусного энтерита, короновирусной инфекции КРС. Однако на момент начала исследований такие препараты отечественного производства отсутствовали [56, 105, 108].

Достаточно сложно объяснить отсутствие интереса отечественных исследователей к клостридиозам крупного рогатого скота, все исследования проводились исключительно с целью создания вакцин и анатоксинов для овец. Наиболее вероятными причинами этого, являются следующие аспекты: во первых в СССР практически отсутствовали высокопродуктивные животные, приоритетным считалось

разведение универсальных мясо-молочных пород, поэтому получение 2 – 3 тыс литров молока за лактацию от коровы считалось хорошим достижением; во вторых скот содержали и кормили с учетом естественных физиологических потребностей, то есть основу рациона составляли грубые корма, такие как сено и солома, что не приводило к нарушениям обмена и развитию кетозов, тогда как в настоящее время основу рациона составляют различные концентрированные корма, предназначенные обеспечить максимальную молочную продуктивность, которая может достигать 10 и более тыс. литров молока. Однако концентратный тип кормления быстро приводит к выбытию животных, в-третьих, анаэробные инфекции у коров не приобретали масштабов эпизоотий, как у овец, когда за один день можно потерять до 50-70 % стада, как например при браздоте [14, 62].

На момент начала исследований в РФ для иммунизации крупного рогатого скота против клостридиозов было зарегистрировано только три препарата: формолвакцина против эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота и овец концентрированная ГОА. Вакцина изготавливалась из культуры штамма *C.chauvoei* R_{15} (в одной иммунизирующей дозе не менее 10 млрд. бактериальных клеток), инаktivированных формалином и адсорбированных на гидроокиси алюминия в качестве адъюванта, вторая - ассоциированная живая вакцина против сибирской язвы и эмфизематозного карбункула, изготавливаемая из живых аттенуированных штаммов возбудителей, и третий препарат – Концентрированный столбнячный анатоксин. То есть имелись средства специфической профилактики только для иммунизации животных против эмфизематозного карбункула и столбняка. Все остальные анаэробные инфекции профилактировать было не чем.

Отсутствие собственных препаратов привело к тому, что вместе с массовым ввозом в Россию живого крупного рогатого скота из различных регионов Земного шара, стали массово ввозиться импортные вакцины против клостридиозов крупного рогатого скота [45, 50, 65, 105, 108, 127].

В настоящее время в РФ зарегистрирован целый ряд зарубежных препаратов, включающий широкий спектр антигенов, например:

- «Токсипра Плюс» - вакцина против энтеротоксемии, эмфизематозного карбункула и столбняка инактивированная, изготовлена из β - и ϵ -токсоида *C. perfringens* типов С и D, α -токсоида *C. novyi* типа В, α -токсоида *C. septicum*, анакультуры *C. chauvoei*, токсоида *C. tetani* и гидроксида алюминия и тиомерсала как вспомогательных компонентов (Испания);

- «Ультрачойс 8» (Ultrachoice 8) - вакцина для профилактики клостридиозов крупного рогатого скота и овец инактивированная, изготовлена из культур бактерий *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. haemolyticum*, *C. novyi*, *C. sordellii*, *C. perfringens* типов С и D, инактивированных формалином, с добавлением сапонина, сульфата калия и гидроокиси алюминия (США);

- «Когловакс» - вакцина против клостридиозов крупного рогатого скота и овец поливалентная инактивированная, изготовлена из анатоксинов *C. perfringens* типов А, В, С и D (альфа – 2,0 МЕ/мл, бетта – 10,0 МЕ/мл, эпсилон – 5,0 МЕ/мл), *C. septicum* (2,5 МЕ/мл), *C. novyi* тип В (3,5 МЕ/мл), *C. tetani* (2,5 МЕ/мл), анакультуры *C. chauvoei*, раствора гидроксида алюминия и формалина (Франция);

- «Бар Вак® 10» - вакцина против клостридиозов и пастереллеза у КРС и овец инактивированная, содержит инактивированные культуры бактерий и анатоксины *C. chauvoei*, *C. septicum* (1,5 МЕ/мл), *C. novyi* (а-анатоксин –0,5 МЕ/мл), *C. sordellii* (1,0 МЕ/мл), *C. perfringens* тип С (бета анатоксин–10,0 МЕ/мл), *C. perfringens* тип D (эпсилон анатоксин –2,0 МЕ/мл), *Manheimia haemolytica* тип 1, *Pasteurella multocida* тип А (Германия).

- «Альфа 7МВ-1» – вакцина для профилактики клостридиозов и инфекционного кератоконъюнктивита у КРС и овец инактивированная эмульгированная. Содержит инактивированные культуры бактерий и анатоксины: *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. sordellii*, *C. perfringens* тип С, *C. perfringens* тип D, и инактивированный антиген *Moraxella bovis* (Германия).

- «Ван Шот Ультра 8» - вакцина для профилактики клостридиозов и пастереллеза КРС инактивированная, изготовленная из культуры бактерий *Pasteurella haemolytica*, *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. haemolyticum*, *C. novyi*, *C. sordellii*, *C. perfringens* тип С, *C. perfringens* тип D, инактивированных формалином (США).

- «Миллениум» (Millenium) – вакцина для профилактики газовой гангрены, анаэробной энтеротоксемии, внезапной смертности, злокачественного отёка, бактериальной гемоглобинурии и столбняка у КРС, МРС и свиней, состоящая из культур *C. chauvoei* (10^{-3} DL₅₀), *C. perfringens* типов А, В, С и D (20 ME), *C. septicum* (20 ME), *C. novyi* типов А (*C. oedematiens*) и В (20 ME), *C. sordellii* ($10^{-2,5}$ DL₅₀), *C. tetani* (15 ME) и *C. haemolyticum* (*C. novyi* тип D – 20 ME/доза), инаktivированных формалином и адсорбированных гелем гидроокиси алюминия в качестве адъюванта (Бразилия).

- «MULTICLOS» - вакцина для профилактики клостридиозов КРС и овец. Вакцина изготовлена из анатоксинов, полученных из культур *C. septicum*, *C. novyi* тип В, *C. sordellii*, *C. perfringens* тип С и D, а также из инаktivированных культур *C. chauvoei* и *C. haemolyticum*, с добавлением алюмокалиевых квасцов в качестве адъюванта и фенола в качестве консерванта (Нидерланды).

Помимо перечисленных в мире разработаны и применяются Bravoxin-10, Tribovax-10, Ultrabac-7/Somubac, Ultrabac-8, PILIGUARD® Pinkeye +7, Covexsin-10, Exelle 10, Cobalt 8, Vision® 7 with SPUR®, CAVALRY® 9, Fortress 7, Clostri Shield 7, Fermicon 7/Somnugen, TASVAX® 8, Ultravac -7 и другие.

Такое разнообразие средств специфической профилактики клостридиозов, созданием которых были заняты ученые из разных стран, еще раз подтвердило необходимость срочной разработки собственного отечественного препарата для вакцинации крупного рогатого скота от клинически значимых клостридиозов.

Однако создание препарата требовало изучения этиологической структуры для оценки оптимального состава вакцины, усовершенствования технологии изготовления моно-антигенов и разработка приемлемых методов количественного контроля напряженности иммунитета.

2.5. Технология культивирования клостридий

Помимо состава и качества питательной среды, есть целый ряд факторов, влияющих на рост и токсинообразование у клостридий. Так не менее важным фактором получения необходимого уровня токсинов является подкормка культур *Clostridium* углеводами, поддержание оптимальных значений pH, значение окислительно-восстановительного потенциала, объем засевной дозы, температура культивирования, количество пассажей культуры до засева и т.д. [27, 36, 92, 107].

Добавление раствора глюкозы, как наиболее легко усваиваемой бактериями, в количестве 0,5 % к объему, способствует образованию токсина на 50-60 % больше в сравнении со средами без внесения. Также важна и периодичность добавки углевода, поскольку однократное внесение вызывает быстрое усвоение углеродного источника энергии и резкое закисление питательной среды, что отрицательно влияет на накопление бакмассы и токсинообразование. Например, однократное внесение 1 % глюкозы вызывает быстрое снижение pH до 5,4 – 5,6, влекущее за собой остановку размножения бактерий [15, 21, 54, 61, 70, 82, 91, 107].

Кроме состава питательной среды и вносимых добавок, влияющих на окислительно-восстановительный потенциал, при котором ещё возможен рост, также большое значение имеет количество вносимого посевного материала. Для засева клостридиями ферментеров с питательной средой оптимальной засевной дозой является $20 \pm 2,0$ млн.м. клеток на 1 дм^3 питательной среды. Латентный период при этом составляет около одного часа, когда происходит адаптация бактерий к среде, а затем следует фаза активного роста – около 4,5 часов. Снижение посевной дозы до десяти млн. на 1 дм^3 , ведет к удлинению длительности культивирования до восьми ч, а лаг – фазы до 2,0-2,5 ч. Это связано с длительностью адаптации штаммов к непривычной питательной среде, что вызывает временное прекращение размножения [21, 26, 36, 57, 61, 124].

Рост культуры заметно возрастает после установления в среде оптимального значения окислительно-восстановительного потенциала. Экспоненциальная фаза размножения штаммов при этом составляет примерно 2,5-3,5 часа. При этом деление клеток может быть настолько интенсивным, что они не успевают отде-

литься друг от друга, образуя достаточно длинные цепочки. Стационарная фаза роста у клостридий при этом составляет около 0,5 ч. За стационарной фазой следует фаза гибели части клеток *Clostridium* ввиду накопления значительного количества метаболитов, снижения уровня водородных ионов и повышение окислительно-восстановительного потенциала среды.

Уровень образовавшегося токсина при этом напрямую зависит от накопления бактериальной массы штамма клостридии: чем больше клеток, тем выше уровень токсина. Наиболее интенсивно культура растет в конце экспоненциальной фазы, при этом динамика накопления токсина несколько отстает, его наибольшее количество выявляется примерно на 50 мин позже [21, 27, 57, 82, 103, 110, 124].

Таким образом динамика роста и токсинообразования *Clostridium* на казеиново-панкреатических средах зависит от времени, pH, стимулирующих подкормок глюкозой, окислительно-восстановительного потенциала среды. При этом количество общего азота в среде при культивировании практически не меняется.

Использование указанных методов культивирования позволяет накопить значительное количество токсина, но учитывая многокомпонентность токсинов по составу, следует учитывать, что не всегда накапливается именно искомая по составу белковая фракция (токсин может включать до 12 агентов) [27, 34, 70, 79, 105, 110, 225, 230, 231].

Питательные среды на основе казеиновых гидролизатов без использования в составе мясных компонентов со степенью расщепления – 0,6 – 0,7 способствуют продукции гиалуронидазы, λ – токсинов и коллагеназы [19, 21, 42, 57, 61, 82].

Велико и значение пассажей [21, 95]. В существующей технологии культивирования клостридий при получении вакцины против браззота, подразумевался засев ферментеров матровыми культурами, хранящимися в холодильнике до 2 мес. Соответственно после засева в ферментер значительно удлинялась фаза адаптации, так как большая часть клеток находилась в споровой форме. При сравнении результатов роста и токсинообразования при засевах первым и вторым пассажами культур, установлено, что двойной пересев сокращает лаг-фазу, способствует значительному ускорению роста и токсинообразованию. При применении све-

жей активно растущей культуры различий в токсинообразовании не наблюдается. При засеве среды длительно хранящейся культурой лаг-фаза продолжается 6-8 часов, а концентрация к 18 ч. роста может составлять около $12,5 \text{ млрд/см}^3$, а при использовании активно растущей культурой, адаптированной к питательной среде лаг-фаза практически отсутствует, концентрация микробных клеток к 6 ч. роста составляет $10,0 \text{ млрд/см}^3$, а к 18 ч. около $19-20 \text{ млрд/см}^3$. Соответственно при значительном накоплении биомассы штаммов выявлялось и увеличение уровня образования в среде токсина, хоть не всегда соизмеримое [15, 27, 42, 82, 103, 134].

Огромное влияние на рост и токсиногенез оказывает температура питательной среды в ферментере. Наибольшее количество токсинов удается накопить при температуре $36-37^\circ\text{C}$. Колебание температуры даже в пределах 1°C может существенно снизить количество клеток бактериальной культуры. Пониженная температура удлиняет лаг-фазу, что снижает интенсивность образования токсина и его активность. При увеличении температуры ускоряется рост культур, но активность токсинов значительно снижается. Стоит сделать оговорку, что при выращивании столбнячных культур, все же целесообразно вести культивирование при пониженной (34°C) температуре, поскольку из-за длительности процесса до 7-11 суток, происходит не только образование, но и разрушение уже накопленного токсина, а при пониженной температуре этот процесс идет медленнее [21, 24, 57].

Также при культивировании клостридий важно значение $r\text{H}_2$ – показателя кислородно-водородного равновесия среды, который является индексом анаэробности питательной среды. При засеве ферментеров величина $r\text{H}_2$ как правило составляет $18,5-22,5$ единиц, но размножение клеток клостридий начинается лишь при снижении показателя до $2,0-7,0$. При значениях $r\text{H}_2$ выше $9,0$ рост культур незначительный. Снижение окислительно-восстановительного потенциала до оптимальных значений создает благоприятные условия для обмена веществ в клетках, например утилизации глюкозы. Влиять на уровень $r\text{H}_2$ при культивировании можно лишь изменяя состав питательной среды и количество вносимой раскладки производственного штамма, что влияет на длительность фаз роста культур.

Таким образом после засева в лаг-фазе наблюдаются следующие процессы: рН почти не меняет своей величины, потенциал среды имеет значительное отрицательное значение, интенсивно используется глюкоза. То есть культура клостридий активно адаптируется к питательной среде, после чего начинается интенсивное размножение. Лаг-фаза характеризуется понижением уровня рН до 5,5-6,0, значение окислительно-восстановительного потенциала до 550-600 мп. Концентрация бакмассы может достигать до 1,5 млрд/см³, параллельно происходит накопление токсинов. Наибольший титр токсинов устанавливается примерно через 40 мин. после прекращения роста. Наиболее оптимальным значением рН для накопления и сохранения в стабильном количестве является уровень 6,3-6,4, за исключением штаммов *C. perfringens* тип D, где требуется активация трипсином или панкреатином при щелочном значении рН.

Таким образом доказано, что для засева ферментеров целесообразно использовать активно растущие культуры клостридий. Росту культур и токсинообразованию способствуют регулярные подкормки 0,5% глюкозой. В процессе роста клостридии интенсивно используют белковые и пептидные фракции питательной среды. Стабилизация величины аминного азота наступает после прекращения роста *Clostridium* [4, 9, 13, 27, 57, 68, 90, 240, 262, 279].

Используемая технология культивирования *клостридий* различных видов в ферментерах при соблюдении перечисленных параметров (рН, rH₂, температура, качество MSB и доза посевного материала) позволяет получать токсины с высокой активностью, до 4-6 тыс Dlm/см³ у *C. perfringens*; 10-12 тыс Dlm/см³ *C. oedematiens*; 100 и более тыс Dlm/см³ у *C. tetani* [27, 36, 92, 107].

Концентрирование и очистка анатоксинов клостридий.

Ультрафильтрация токсинов представляет собой процесс мембранного разделения, при котором из раствора удаляются частицы размером от 10 до 200 ангстрем и сконцентрировать молекулы с массой от 1,0 тыс до 1,0 млн дальтон. Процесс позволяет увеличить концентрацию таких молекул в растворе после удаления культуральной жидкости [8, 10, 27, 42, 63, 82, 89, 94, 97, 111, 112, 126].

При статической фильтрации под давлением культуральная жидкость проходит мембрану перпендикулярно, то есть направление подачи среды и фильтрации совпадают. Молекулы улавливаются мембраной и постепенно образуют слой на ее поверхности, что замедляет процесс и постепенно приводит к полной его остановке. При тангенциальной ультрафильтрации направления подачи среды и фильтрации не совпадают, то есть они перпендикулярны друг другу. В итоге жидкая часть питательной среды проникает сквозь мембраны как фильтрат, а оставшаяся часть потока выходит из системы в рабочую емкость, а затем вновь идет на фильтрацию. При таком режиме имеет место самоочищение фильтрационного модуля, что значительно увеличивает продолжительность его эксплуатации.

Существует несколько вариантов фильтрующих элементов для установок тангенциальной фильтрации: кассетный, рулонный, трубчатый, половолоконный, керамический [21, 27, 92, 94, 95, 113, 123, 211, 261].

В биологической промышленности наиболее активно применяют плоско-рамные фильтрующие элементы. Их используют при изготовлении альбумина, иммуноглобулинов, анатоксинов, интерферона, гипериммунных сывороток. Такие фильтрационные установки имеют минимальный «мертвый» объем системы.

Ультрафильтрацию в биотехнологии используют для очистки, разделения и концентрирования белковых структур в многокомпонентных растворах. С ее помощью можно получать ферменты, витамины, вирусы, стерилизовать жидкости. В настоящее время наиболее удобным способом концентрирования и очистки бактериальных анатоксинов, является тангенциальная фильтрация [17, 27, 92, 123, 261]. Такой режим фильтрации характеризуется высокой скоростью процесса и

загрязнением поверхности мембраны в меньшей степени. Особенно это важно при фильтрации жидкостей с высоким содержанием нерастворимых веществ [97, 185].

Установка тангенциальной ультрафильтрации состоит из приемную емкость, насоса, модуль ультрафильтрации с заливной емкостью и насоса для введения дополнительных реагентов [112, 138]. В режиме концентрирования из заполненной емкость фильтруемая суспензия или раствор подаются на модуль, из которого через мембрану проходит вода, а концентрат циркулирует через емкость и модуль путем перекачки насосом. Создаваемое им давление постепенно повышается, для чего насос оборудован вентилем, регулирующим давление и расход раствора. При необходимости фильтрации больших объемов может производиться дополнительное внесение жидкости в систему. Систему останавливают после получения необходимой концентрации целевого продукта в емкости, после чего концентрат сливают или используют в той же системе для очистки от балластных веществ диафильтрацией [94].

При использовании тангенциальной фильтрации для концентрирования анатоксинов проводят глубинное культивирование культур анаэробов. Рост останавливают, когда прекращается активное накопление бактериальной массы, и стабилизируется образование токсинов.

Штамм клостридий выращивают в условиях глубинного культивирования в ферментере с питательной среды на основе казеинового перевара, с перемешиванием, добавлением глюкозы и автоматическим поддержанием pH. В начале роста температура составляет 37°C, затем ее снижают до 34-35°C, что позволяет замедлить процесс разрушения образовавшихся термолабильных токсинов. При наступлении стационарной фазы, когда концентрация бактериальных клеток прекращает увеличиваться, что в первую очередь выявляется опаданием образующейся пены, в ферментер вносят раствор формалина для инактивации клеток и токсинов [128, 129, 139, 148, 186, 254].

Выращенную в условиях глубинного культивирования культуры вместе с токсинсодержащей жидкостью инактивируют формалином не менее 12 ч, после чего микробную массу отделяют в проточной центрифуге при 10000-12000

об/мин, а надосадочную жидкость, собранную в отдельную емкость инактивируют еще в течение 3-5 дней (*C. perfringens* и *C. oedematiens*) [7, 27, 29, 254], или 30 дней, при работе с столбнячной культурой. Концентрацию формалина при этом устанавливают 0,2-0,3 % и уровень pH -6,7-6,8, температура не более 12 °С, эти параметры позволяют получить анатоксин без значительных потерь антигенных свойств. Затем проводят выделение, концентрирование и очистку полученных анатоксинов [66, 139, 142, 180].

Тангенциальная ультрафильтрация с использованием ультра- и микрофильтрационных установок позволяет получать стерильные продукты, так как процесс полностью зациклен и идет в асептических условиях. Это особенно важно в настоящее время, поскольку позволяет осуществлять производство лекарственных средств в соответствии с требованиями GMP (ГОСТ Р 52249-2009 «Правила производства и контроля качества лекарственных средств») [21, 27, 91, 128].

Обработка частично обезвреженной жидкости методом тангенциальной ультрафильтрации проходит под давлением 0,24-0,26 МПа с использованием мембран, позволяющих отделять белки с молекулярной массой 30 кДа. Полученный при этом концентрат анатоксина обязательно требует очистки диалфильтрацией минимум двукратным объемом стерильной воды для инъекций при тех же параметрах процесса. Это необходимо для удаления из концентрата балластных веществ питательной среды и метаболиты, а также позволяет осветлить полученный продукт. В полученные таким образом анатоксины дополнительно вносят 0,1 % формалина с целью недопущения бактериального пророста от возможной контаминации, а также служит в качестве консерванта. Столбнячный анатоксин дополнительно подвергают стерилизующей фильтрации, с целью недопущения попадания спор возбудителя в полуфабрикат [24, 41, 57, 59, 104, 111, 158].

Тангенциальная ультрафильтрация является наиболее перспективным методом получения клостридиозных анатоксинов. При правильно подобранных технологических параметрах, таких как давление, температура, pH, время процесса и правильно подобранных ультрафильтрационных мембран в значительной мере увеличивается качество целевого продукта, уменьшается потери антигенности

анатоксинов. Так вакцина для защиты животных против клостридиозов содержит в качестве одного из компонентов *C. perfringens* типа С, концентрированный ультрафильтрации [46, 92, 98, 111, 142, 245, 263].

Помимо клостридиозных описаны способы получения ультрафильтрацией холерного, дифтерийного и стафилококкового анатоксинов [66, 73, 89, 92, 104, 111, 180]. Описан метод концентрирования анатоксинов для вакцины против некробактериоза, при этом концентрирование экзотоксина осуществляют ультрафильтрацией на полых волокнах с номинальной отсечкой молекул с массой 1,5 кДа до содержания белка 5,5–6,0 мг/мл.

Получение антигенов мембранных методов разделения упрощает технологию производства препарата и обеспечивает высокое качество целевых продуктов за счет эффективного освобождения от балластных веществ питательной среды и низкомолекулярных бактериальных компонентов, не обладающих иммуногенной активностью [21, 27, 92, 123, 261] .

Применение методов ультрафильтрации позволило снизить потери на этапах выделения и очистки антигенных препаратов, концентрирование сырья или полуфабриката и уменьшить трудозатраты.

Следует сказать и о недостатках метода. Которыми являются дополнительные капитальные и энергетические затраты, ввиду необходимости использования дополнительного оборудования, а также потерь целевого продукта на мембранах при проведении очистки [21, 27, 97, 123, 261]

Для организации высокой скорости движения в межмембранном пространстве, необходимого для снижения концентрационной поляризации и интенсивного засорения мембран, требуется значительный расход энергии для обеспечения работы насоса.

2.6. Методы контроля иммунобиологических препаратов в РФ

Обращение ветеринарных лекарственных средств в РФ в настоящее время регламентируется Федеральным законом от 12.04.2010 №61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».

В соответствии со статьей 10 ФЗ №61, разработка лекарственных средств включает в себя поиск новых фармакологически активных веществ, последующее изучение их свойств, разработку технологий производства фармацевтических субстанций, составов и технологий производства лекарственных препаратов, доклинические исследования. Доклинические исследования в ветеринарии проводятся путем применения научных методов оценок с целью получения доказательств качества, безопасности и эффективности лекарственного средства [48, 61, 69, 96, 99, 104, 119].

В ст. 17 ФЗ-61 производитель обязан провести исследования и представить отчеты о соответствии качества препарата по следующим параметрам:

- 1) характеристика фармацевтической субстанции с описанием технологии производства, методик контроля качества, наличия примесей, свойств упаковочных материалов, данных о стабильности, сроке годности, условиях хранения;
- 2) сведения о лекарственном препарате: состав препарата; описание производства; микробиологические характеристики; информация об использовании вспомогательных веществ; методики контроля качества; данные о стабильности;
- 3) результаты доклинических испытаний лекарственного средства;
- 4) результаты клинических испытаний препарата для животных всех видов и возрастных групп, которым планируется применять разработанное средство.

Поэтому для регистрации вакцин в РФ с последующим их применением в сельском хозяйстве, проводят исследование свойств препарата, обоснованность дозы, пути введения, продолжительность иммунитета, методы контроля на лабораторных животных.

Согласно ГОСТ 4.492-89 и НД № 13-5-2/1062 "Ветеринарные препараты. Показатели качества. Требования и нормы" показатели качества биологических препаратов подразделяются на показатели назначения, надежности, технологичности, безопасности, эффективности использования, а также эргономические, эстетические, патентно-правовые, качественные характеристики.

В соответствии с используемыми методами испытаний показатели качества биологических препаратов условно подразделяются на органолептические, биологические, физико-химические и комплексные.

Все биологические ветеринарные препараты оцениваются по органолептическим показателям (цвет, вид, форма, прозрачность, осадок, отсутствие посторонних примесей, механических включений, плесени, неразбивающихся конгломератов и др.), концентрации водородных ионов (рН), стерильности, реактогенности, безвредности, безопасности работы при использовании, концентрации инактиванта, воздействию на окружающую среду, термостабильности, температуре хранения и сроку годности, продолжительность иммунитета, активности или содержанию основного действующего вещества.

Минимально допустимые нормативы показателей качества ветеринарных препаратов должны соответствовать следующим величинам:

Внешний вид (цвет, форма, прозрачность, осадок) - показатель, характеризующий качество и товарный вид препарата; определяется визуально. Цвет формируется за счет цвета ингредиентов в препарате. Форма, прозрачность и наличие осадка определяются физико-химическими свойствами препарата. При разработке препаратов нормативные значения данного показателя как правило, не программируются. Фактические данные внешнего вида закладываются в НД на препарат. Допустимо изменение отдельных характеристик внешнего вида в процессе хранения препарата, если эти изменения не влекут за собой снижение других нормативов качества препарата.

Отсутствие посторонних примесей, механических включений, плесени, неразбивающихся конгломератов, также определяются визуально. Норматив данного показателя для большинства препаратов - полное отсутствие примесей и других неоднородных включений. В отдельных случаях допускается наличие ограниченного количества примесей в виде ворсинок и взвешенных частиц. При этом устанавливаются нормативы данных примесей в единице объема, который не должен ухудшать товарный вид, уровень качества и эффективность препарата.

Продолжительность иммунитета - показатель длительности состояния специфической невосприимчивости организма животного по отношению к возбудителю инфекционного заболевания. Норматив определяется экспериментально при разработке и апробации препарата и должен быть указан в инструкции по применению. Продолжительность иммунитета может быть различной, но достаточной для обеспечения хозяйственную целесообразность использования конкретного препарата.

Стерильность – при проверке препаратов предусматривается полное отсутствие живой микрофлоры в контролируемом лекарственном средстве.

Полнота инактивации - показатель, характеризующий потерю способности инфекционного агента размножаться и вызывать инфекционный процесс. Норматив - полная потеря способности к размножению и вызывать развитие инфекции, определяется экспериментально путем посева препарата на жидкие и плотные питательные среды, состав которых указан в НД. Посевы должны быть чистыми, т.е. свидетельствовать об отсутствии живых культур возбудителя.

Сенсибилизация - показатель повышенной специфической реактивности организма на введение лекарственных средств или биопрепарата. Норматив разрабатывается индивидуально для дозы вводимого препарата, времени наступления реакции и вида животного. Показатель характеризуется повышением температуры тела животного или общими и местными клиническими признаками и отражается в ТУ.

Безопасность работы - показатель, характеризующий вероятность безопасной работы персонала при производстве и применении препарата. Требования безопасности должны содержать показатели, направленные на обеспечение безопасности, определяемые законодательными и нормативными актами.

Меры безопасности при работе с биологическими объектами должны обеспечивать предупреждение возникновения у работающих заболевания, состояния носительства, интоксикации, вызванных микроорганизмами и продуктами их жизнедеятельности, а также сенсибилизации организма.

Воздействие на окружающую среду - показатель, характеризующий вероятность вредных воздействий препарата на окружающую среду при производстве и применении. Контроль за содержанием вредных веществ проводят в соответствии с нормативными требованиями. Для всех препаратов должны быть способы и меры безопасности при утилизации (автоклавирование, сжигание, кипячение, химическая нейтрализация) продукции после истечения срока годности, не выдержавшей контрольных испытаний, или при хранении по назначению и после ее использования.

Концентрация водородных ионов (pH) - показатель уровня соотношения ионов H^+ и OH^- в жидких формах препаратов. Для определения pH применяют потенциометры или pH-метры и стандартные буферные растворы (ГФ XIII). Данный показатель очень важен, так как именно он влияет на стабильность свойств препарата при хранении, а также его безвредность, поскольку лишь при нейтральных значениях pH препарат не будет обладать местным раздражающим действием. Норматив концентрации водородных ионов разрабатывается экспериментально для каждого препарата индивидуально, зависит от способа применения и колеблется от 4,0 до 9,0, что указывают в НД.

Концентрация инактиванта, мг/см³, % - допустимое количество остаточного инактивирующего агента в препарате, позволяющего сохранять стабильность свойств препарата в течение гарантийного срока и не вызывать инфекционного процесса в организме животного после его введения. Концентрация инактиванта определяется физико-химическими и биологическими методами.

Поскольку практически все ветеринарные препараты изготавливаются путем инактивации бактериальной массы формалином, разработаны методы определения остаточного свободного формальдегида. В препаратах на основе клостридиозных антигенов его количество не должно превышать 1,85 г/л. Остаточный свободный формальдегид содержащийся в бактеринах, бактериин-токсоидах и токсоидах, кроме тех, которые содержат клостридиальные антигены, не должен превышать 0,74 грамма на литр (г/л).

Безвредность - системное воздействие препарата на организм животного в установленной дозе. Введение вакцины не должно вызывать изменения клинического состояния подопытного животного, поэтому при разработке каждого препарата дозу устанавливают индивидуально, учитывая способ и метод введения.

Реактогенность - негативное влияние препарата на организм животного в месте введения. Препарат не должен вызывать видимых изменений тканей при внутрикожном, подкожном или каком-либо другом способе введения препарата животным, а также общего воздействия на организм.

Активность - способность биологического препарата проявлять специфический эффект, определяемый экспериментально и выражаемый в соответствующих единицах активности. Активность вакцин должна отражать их способность обеспечивать специфическую защиту иммунизированных животных от заболевания [82, 61, 91].

Более целесообразным является определение статистически достоверного проявления эффекта с использованием методов биометрии. Данный норматив определяется по сохранности экспериментальных животных - вакцинированных и контрольных - и должен составлять не менее 70 % у вакцинированных и гибели не менее 80 % у контрольных животных после заражения.

Специфичность - показатель, характеризующий соответствие определенной группы антигенов к гомологичным антителам. Определяется экспериментально в РА, РСК, РНГА, РГА, РКОА и др. Оценку результатов проводят визуально. Препараты должны быть специфичными, т.е. антиген должен вступать в реакцию с гомологичными антителами, что выражается полным просветлением жидкости и образованием плотного зонтика на дне пробирки или крупных хлопьев в капле на предметном стекле. Может допускаться положительная реакция антигена с гетерологичными антителами в титре 1:10 - 1:20, полученная экспериментально в зависимости от группы микроорганизмов.

Одним из самых важных критериев оценки пригодности препарата конечно же является его иммуногенная активность или антигенность, если нет способов оценить иммуногенность прямым заражением животных [50, 54, 91].

2.6.1. Контроль иммуногенной активности вакцин против клостридиозов животных

Стремительное воздействие клостридиозных токсинов на организм животного, не смотря на своевременное лечение, часто заканчивается летальным исходом. В качестве наиболее оптимального метода борьбы с заболеваниями клостридиозной этиологии стоит считать специфическую профилактику. Учитывая важность анатоксинов в борьбе с анаэробными инфекциями, особое внимание необходимо уделять контролю качества выпускаемых иммунобиологических препаратов, в особенности их иммуногенной активности [61, 69, 83, 91, 258, 259, 262].

Необходимость стандартизации методов контроля качества бактериальных препаратов возникла очень давно. Этот вопрос рассматривался еще Международным ветеринарным конгрессом в 1909 г., на котором была согласована и утверждена концепция о стандартизации методов контроля иммунобиологических препаратов [61, 73].

В 1961 г. на очередном международном микробиологическом конгрессе по было принято решение о разработке международных стандартов и референс-препаратов. Образцы таких стандартов создавались изначально Организацией здравоохранения при Лиге Наций, в последующем Всемирной организацией здравоохранения. Однако в связи с большим количеством выпускаемых препаратов, требующих использования международных стандартов, часто спрос превышает предложение, и поэтому в странах создаются свои национальные стандарты и референс-препараты, которые после проведения сличительных испытаний и аттестации могут быть использованы для контроля активности [35, 69].

При современном уровне развития биологической промышленности нет разделения на медицинские и ветеринарные препараты, их производство и контроль регламентируется одними и теми же документами. Эти правила касаются и необходимости установления правил контроля активности средств специфической профилактики инфекционных заболеваний, вызванных *Clostridium* [61]. Иммуногенность препаратов против клостридиозов изначально предлагалось оцени-

вать по выживаемости животных, вакцинированных, а потом зараженных соответствующими контрольными штаммами или токсинами клостридий. Отмечалось, что ни только количество антигена, но и вспомогательные вещества (адъюванты) сильно влияют на способность индуцировать иммунитет [11, 61, 69, 272].

Для оценки иммуногенной активности препаратов используются качественные и количественные методы. Качественные методы позволяют определить только пригодность препарата к использованию на основании лимита минимальной активности. Количественные методы оценки позволяют оценить наличие антител после проведенной иммунизации, а также степень специфической активности индуцированного иммунитета и предположить его продолжительность. Для воспроизведения количественных методов контроля вакцин против клостридиозов используют международные стандартные образцы токсинов и антитоксических сывороток [21, 26, 48, 52, 61, 69, 83].

Такой метод исследования активности препарата подразумевает двухэтапный процесс, при котором испытываемыми образцами иммунизируют кроликов, а затем полученные гипериммунные сыворотки используют в РН токсинов клостридий. Смеси вводят мышам, при наличии в сыворотке антитоксических антител, токсин нейтрализуется, и подопытные животные остаются живы. При этом качество препарата оценивается по наличию в сыворотке определенного количества Международных единиц активности (МЕ), которые предварительно оценивают в сравнении с Международным или Национальным стандартом активности.

Предлагаемый метод оценки иммуногенности имеет ряд преимуществ, так как подразумевает использование большего количества животных (мышей) и позволяет более точно оценить качество препарата [178, 179].

Также большой объем работы проведен исследователями и для контроля нетоксигенных или слаботоксигенных клостридий, в частности *C. chauvoei*, *C. haemolyticum*, *C. septicum*. Согласно международным требованиям, прописанным в ЕФ, а также в Кодах федерального регулирования США, контроль препаратов против эмфизематозного карбункула, осуществляется путем постановки опыта на морских свинках. Группу животных, в количестве не менее восьми голов, вакци-

нируют двукратно определенными дозами препарата, как правило, соответствующими половинной дозе от рекомендованной для восприимчивых животных. А затем через 14-16 дней заражают предварительно подтитрованной споровой лиофильно высушенной культурой контрольного штамма. Препарат, отвечающий требованиям нормативной документации, должен обеспечивать сохранность не менее семи из восьми использованных морских свинок при 80-100 % гибели животных в контрольной группе [35, 51, 53, 61, 96, 120, 122, 210].

При работе с заражающими культурами *S. chaui* принято дополнительно использовать при инъекциях раствор хлористого кальция для обеспечения образования воспалительного очага. При отсутствии воспаления не всегда удается воспроизвести инфекцию, что приводит к выживанию большого количества контрольных животных, даже если для заражения используют высокие дозы возбудителя, например 20 или 100 Ld_{50} [61, 96, 120, 122].

Использовать хлористый кальций при заражении стали достаточно давно. Впервые это сделали Робертс и Гендерсон в 1932 г, что позволило в значительной степени получить воспроизводимые результаты при проверке иммуногенности. Также была отмечена закономерность, что ни только количество спор влияет на результаты проверки, но и концентрация хлористого кальция. Так при использовании 2,5 % раствора удавалось обеспечить заболевание и гибель всех контрольных животных, а 1 % - только 50 % [69, 122].

Чрезвычайно важным вопросом при контроле качества препаратов против эмфизематозного карбункула является применение для заражения именно споротой культуры возбудителя. Для получения споровой формы культуры возбудителя применялись различные методы, подразумевающие предоставление определенной экспозиции для завершения процесса споруляции [120, 122].

Выращенные на бульонных средах культуры выдерживают при комнатной температуре в течение 9-10 недель, после чего центрифугируют и несколько раз отмывают физиологическим раствором. Для обеспечения сохранности и длительности использования культуры лиофилизируют. Как правило в лиофилизированном виде количество спор в суспензии не снижается в течение нескольких лет, а

соответственно не происходит снижение вирулентности культуры. Такие культуры стандартизируют, определяя величину Ld_{50} , и используют для заражения подопытных животных. Перед заражением лиофилизат разводят физиологическим раствором, и полученной суспензией заражают морских свинок, как правило в концентрации 10^5 в объеме 0,1 мл и дополнительно 0,2 мл 10% хлористого кальция в дозе 20-100 Ld_{50} . Метод обеспечивает 80-100 % гибели контрольных морских свинок в течение 20-96 ч.

Этот же метод контроля вакцин против эмкара применяется и в РФ. Эффективность компонента *C. Chauvoei* оценивают в тесте на 10 морских свинок весом 350-450 г, которых иммунизируют подкожно половинной дозой вакцины, рекомендованной для восприимчивых животных. При проверке моновакцин допускается заражение однократно вакцинированных свинок, при ассоциированных вакцинах проводят повторную вакцинацию 25 - 28 дней в той же дозе. Через 14 дней после вакцинации, всех подопытных свинок, а также 5 контрольных животных заражают внутримышечно 20-100 Ld_{50} вирулентного штамма, находящегося в споровой форме, с добавлением раствора хлористого кальция [53, 61, 120, 122].

Вакцина считают иммуногенной, если в течение 5 дней после заражения остаются живыми не менее 80 % вакцинированных морских свинок, при этом все контрольные животные должны погибнуть от инфекции в течение 48 -72 часов. Если погибает больше 20 % иммунизированных свинок, тест повторяют. При повторных неудовлетворительных результатах серию бракуют и утилизируют.

Так же контролируют в другие компоненты, которые в состав препарата входят как бактерины, или бактерий/токсоиды. При невозможности оценить анти-токсический иммунитет, прибегают к заражению вакцинированных животных споровыми культурами клостридий. В основном в виде бактеринов выпускаются вакцины против *C. sordelli*, *C. haemolyticum*, реже *C. septicum*. В качестве подопытных животных используются либо морские свинки, либо мыши. В частности, неплохие результаты по воспроизводимости опытов на других видах животных, в частности, белых мышах и овцах. Однако мыши оказались менее чувствительны к заражению - погибало в параллельно проведенных опытах не более 60 % живот-

ных, а овцы, напротив, более чувствительны к заражению. Это также доставляло определенные неудобства для исследователя, так как было сложно получить несколько раз подряд воспроизводимые результаты [61, 82, 139].

Компоненты вакцин, представленные анатоксинами, проверяются в подавляющем большинстве случаев путем постановки реакции нейтрализации токсинов видоспецифическими гипериммунными сыворотками. Эту методику практически для контроля качества практически всех компонентов используют во многих странах, имеющих биологическую промышленность и контролирующие качество выпускаемых или ввозимых препаратов. В качестве примера можно привести следующую схему: с целью оценки эффективности компонента *C. novyi* тип *B* вакцинируют не менее 10 здоровых кроликов в возрасте 3-6 мес, подкожно в минимальной дозе. Доза регламентируется производителем, но она не должна превышать половину дозы для восприимчивых животных, в данном случае телят. Через 21-28 дней животных иммунизируют повторно в той же дозе, и спустя 14 дней берут кровь у кроликов. Сыворотки крови от всех подопытных кроликов объединяют в равных объемах, смешивают с четко установленной дозой токсина, и выдерживают при комнатной температуре или в термостате в течение 60 мин, и вводят каждую 2 или более мышам внутривенно. В случае обезвреживания токсина сывороткой крови кроликов мыши остаются живы, в противном случае погибают в течение 24-72 часов. Результаты сравнивают с эффективностью эталонного антитоксина *C. novyi*, откалиброванного в МЕ, и обеспечивающего требуемый уровень защиты. Большинство регламентирующих документов предписывают, что компонент *C. novyi* в ассоциированной вакцине должен обеспечивать образование не менее 3,5 МЕ/мл токсин-нейтрализующих антител.

По такой же схеме оценивают и иммуногенную активность всех типов *C. perfringens*, при этом допустимым титром антитоксических антител является не менее 1 МЕ альфа-анатоксина/мл, 10 МЕ бета-антитоксина/мл, не менее 5 МЕ эпсилон-антитоксина/мл; и *C. septicum* - не менее 2,5 МЕ/мл.

Столбнячный анатоксин в мире производят и контролируют в соответствии с требованиями ВОЗ, которые были сформулированы в 1964 г. Несмотря на то, что с

того момента было разработано много новых методов производства и контроля, эти требования до сих пор остаются востребованы. Для оценки эффективности анатоксина *C. tetani* дважды с интервалом 28 дней вакцинируют 5 морских свинок или кроликов. Через 14 дней после ревакцинации у животных берут кровь и получают сыворотки. Титр антител к нейротоксину *C. tetani* определяют в каждой сыворотке индивидуально путем постановки РН или ИФА [21, 103, 226].

Вакцина против столбняка для животных всех видов, кроме лошадей, должна обеспечивать образование антител в титре не менее 2,5 МЕ/мл. Вакцины для лошадей должны индуцировать образование антител в титре не менее 30 МЕ/мл.

Для точного расчета титра антител в крови животных используют следующую методику: содержание антитоксина в сыворотке определяют в РН, для чего готовят разведение стандартной сыворотки до содержания 0,1 МЕ антитоксина в мл, затем делают разведения стандартного токсина, в одном из которых содержится 0,1 L₀ в 1 мл, а в другом 0,1 L₊ в 1 мл.

Полученные разведения стандартной сыворотки, содержащей 0,1 МЕ смешивают с 0,1 L₀ стандартного токсина, и со вторым разведением, содержащим 0,1 L₊ дозой токсина. Каждую смесь доводят до 2,0 мл разбавителем. Объединяют 0,1 L₀ дозу разбавленного стандартного токсина с объемом 0,2 мл неразбавленной сыворотки. Смесь доводят до конечного объема 2,0 мл разбавителя.

Нейтрализация всех смесей проходит при комнатной температуре в течение часа, после чего смеси помещают в ледяную воду до инъекции мышам. Каждую смесь токсина с сывороткой вводят 5 белым мышам массой 16-18 гр в дозе 0,2 мл внутривенно. Срок наблюдения - 72 часа.

Если мыши, зараженные смесью 0,1 МЕ стандартной сыворотки и 0,1 L₀ дозы стандартного токсина, погибают, то результаты РН требуется повторить. В случае повторения результата, серия вакцины считается несоответствующей по иммуногенности. Также требуется повтор исследований в случае гибели менее 80 % мышей в контрольной группе, которым вводится смесь 0,1 МЕ стандартного антитоксина и 0,1 L₊ дозы стандартного токсина, то есть в опыте использована доза токсина, которая не может вызвать гибель животных.

Если мыши погибают после введения 0,2 мл смеси неразбавленной сыворотки и 0,1 Ло дозы токсина, это означает что в сыворотке после иммунизации образовалось менее 0,50 МЕ/мл, что является нижним пределом допустимости.

МЕ (Международная единица) – единица, соответствующая международным стандартам, определенным экспертами комитета биологических стандартов ВОЗ. L+ - минимальное количество токсина, смешанного с 1 МЕ антитоксина, вызывающее гибель животного определенного веса за 4 дня (L+ зависит от вида используемого животного). L+/10 - Минимальное количество токсина, смешанного с 0.1 МЕ антитоксина, вызывающее гибель мыши определенного веса за 4 дня. LD₅₀ – количество токсина, которое убивает 50% животных за 4 дня (LD₅₀ отличается у различных видов животных).

Контроль иммуногенности ветеринарных препаратов против анаэробных болезней в нашей стране, к сожалению, остается далек от совершенства. Если методы определения иммуногенности вакцин или компонентов против эмфизематозного карбункула соответствуют мировым стандартам, то методы антитоксического иммунитета в значительной степени отстают от них. Еще раз повторяюсь, что основным препаратом для профилактики клостридиозов в России являлась «Вакцина против бродзота, злокачественного отека, инфекционной энтеротоксемии овец и дизентерии ягнят» [35, 36, 54, 61]. Препарат создан в пятидесятые годы прошлого века, при этом иммуногенная активность компонентов подразумевает прямое заражение кроликов вирулентными активно растущими культурами клостридий [35, 48, 69]. Такой метод не соответствует целому ряду современных требований к контролю: во-первых используется незначительное количество животных (3 кролика на каждый компонент), во-вторых животных заражают нестандартными нативными культурами клостридий, в-третьих не используются стандартные препараты в сравнении с которыми можно было бы оценить качество проверяемой вакцины, в четвертых такое заражение не гуманно, так как вызывает местный гангренозный процесс даже при наличии иммунитета у животного. Несмотря на это предприятия до сих пор продолжают им пользоваться.

Позже, когда для выпуска препаратов потребовалось их соответствие установленным требованиям, в стране был отработан более современный метод контроля с оценкой активности сывороток в международных единицах, количество которых оценивали в сравнении с стандартами препаратов против определенного заболевания. Его стали применять после начала выпуска «Поливалентного анатоксина против клостридиозов овец» (авторы Кириллов Л.В., Каган Ф.И. и др.). В ВГНКИ были разработаны стандарты антитоксических сывороток к основным типам клостридии перфрингенс. Создан стандарт иммуногенности вакцины против эмкара, вакцины против ботулизма, вызываемого *C. botulinum* тип С, вакцине против браззота. Применение стандартных препаратов и антитоксических сывороток позволило количественно определять титр антитоксических антител в крови вакцинированных животных, выраженный в МЕ [61, 62, 69, 71, 83, 120, 122].

Применение стандартов позволило исключить влияние на выпуск серии препарата таких факторов как качество лабораторных животных и условий их содержания. Контроль серии при этом проходил следующим образом: параллельно с животными, иммунизированными проверяемой серией вакцины, и отрицательным контролем, ставилась группа, которую вакцинировали по идентичной схеме референс-препаратом с заведомо установленными свойствами. Животных содержали в одинаковых условиях и заражали одной и той же тест-дозой культуры и ли токсина. При этом проверяемая серия препарата должна обеспечить уровень иммунитета не ниже, чем индуцированный референс-препаратом.

Стоит отметить, что в литературе отражены данные только о референс-препаратах к моно-анатотоксинам, к многокомпонентным такие стандарты не разработаны [61, 69, 83, 103]. Для оценки иммуногенности контроль стал проводиться по следующей методике: проверяемым препаратом вакцинировали овец, предварительно проверенных на отсутствие у них антитоксических антител ко всем компонентам препарата, их дважды вакцинировали, после чего получали сыворотку крови и оценивали титр антител в единицах связывания токсинов. Метод был очень трудоемок и материально затратен, поэтому не нашел применения.

2.7. ОБСУЖДЕНИЕ ОБЗОРА ЛИТЕРАТУРЫ

Клостридиозы широко распространены и причиняют значительный ущерб животноводству как за рубежом, так и в нашей стране. Поскольку основным резервуаром возбудителей является почва, где споровые формы клостридий сохраняются десятилетиями, полностью исключить возникновение новых вспышек болезней невозможно. Для борьбы с анаэробными инфекциями используют широкий спектр методов, таких как дезинфекция помещений и мест падежа скота, лечение больных и подозреваемых по заболеванию животных, профилактическая вакцинация. Именно специфическая профилактика является основным способом предотвращения вспышек злокачественного отека, эмкара, анаэробной энтеротоксемии, столбняка и других болезней.

В мире разработано и широко применяется с целью предотвращения вспышек клостридиозов у крупного и мелкого рогатого скота более 20 препаратов (Токсипра-Плюс, Ультрачойс-8, Когловакс, Бар-Вак®-10, Альфа-7MB-1, Ван Шо-тУльтра 8, Миллениум, Multiclos, Bravoxin 10, Tribovax-10, Ultrabac 7/Somubac, Ultrabac 8, Covexsin-10, Exelle 10, Cobalt 8, Vision® 7, CAVALRY®9, Fortress-7, ClostriShield-7, Fermicon 7/Somnugen, TASVAX® 8, Ultravac 7 и другие). Вакцинации от клостридиозов подвергается весь высокопродуктивный скот молочных и мясных пород. Благодаря широкому спектру препаратов, разнообразных по антигенному составу, производители могут использовать наиболее актуальные в конкретной местности [49, 50, 61, 120].

Учитывая востребованность вакцин для профилактики клостридиозов КРС в других странах, вызывает некоторое недоумение отсутствие на протяжении длительного времени интереса отечественных исследователей к этому вопросу. Многие советские исследователи (Я.Р. Коваленко, Ф.И. Каган, А.В. Ляушкин, А.А. Волкова, М.Д. Польшковский и др.), занятые изучением клостридиозов и разработкой средств их профилактики и лечения, в основном уделяли внимание только болезням овец. При анализе литературы практически за 80 лет, начиная с 1931 г., когда в СССР стали выпускаться первые препараты против эмфизематозного карбункула и анаэробной дизентерии, встречаются лишь

единичные статьи о проведении исследований в эпизоотологии клостридиозов КРС и разработке вакцин для их профилактики. Единственным широко используемым препаратом является вакцина против эмфизематозного карбункула, разработанная в 1931 г. и с успехом применяемая до настоящего времени, и концентрированный столбнячный анатоксин для профилактики столбняка. Еще упоминается о трех препаратах: вакцина против эмфизематозного карбункула и злокачественного отека (39), препарат для профилактики клостридиозов сельскохозяйственных животных В.П. Земляковой и вакцина против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиоза телят (121). Однако, несмотря на наличие патентов на эти препараты, статей, подтверждающих их эффективность, ни один из них не был внедрен в практику и ни когда не выпускался.

Объяснить отсутствие средств для профилактики анаэробных инфекций крупного рогатого скота в России можно несколькими причинами. Во-первых, селекционная работа в России, а потом и Советском Союзе, была в большей степени направлена на выведении универсальных мясо-молочных пород, способных выживать в трудных условиях и обладающих высокой устойчивостью к болезням; во-вторых, низкой продуктивностью животных, еще лет 20 -25 назад удой 1,5-2,5 тыс литров молока за лактацию считался удовлетворительным показателем, такая продуктивность не подрывала здоровья животных; в-третьих, крупный рогатый скот кормили в соответствии с их физиологией, то есть основу рациона составляли грубые корма, в основном сено и солома. Это не приводило к нарушениям обмена веществ и развитию патологических состояний, таких как ацидозы, кетозы и т.д. В настоящее время для обеспечения генетически заложенной продуктивности в 8 – 10 тыс. литров молока и больше за лактацию, у животных преобладает концентратный тип кормления, что ведет при минимальных нарушениях к образованию кетоза, осложняющегося различными инфекционными болезнями; также к наиболее вероятным причинам можно отнести и то, что злокачественный отек и другие клостридиозы у крупного рогатого скота не приводили к массовым вспышкам заболеваний, как у овец, когда за один день можно было потерять половину стада.

В двухтысячных годах Россия стала массово закупать в разных странах живой крупный рогатый скот как молочных, так и мясных пород. По данным РСХН РФ, за десять лет из Германии, Нидерландов, США, Австралии было завезено не менее одного миллиона голов скота. Это делалось как для восполнения численности животных, поскольку за время девяностых и нулевых годов численность молочного стада резко сократилась (с 1991 по 2005 г. поголовье КРС сократилось на 33 млн. голов), так и для замены скота универсальных пород высокопродуктивными животными. Такой скот для обеспечения продуктивности требует особых условий содержания и кормления, а также использования определенных лекарственных средств. Сельхозпроизводители стали запрашивать ассоциированные препараты для профилактики клостридиозов, но таковых на начало 2009 г. в РФ не было.

Именно возникшая острая необходимость в препаратах для профилактики клостридиозов крупного рогатого скота привела к необходимости срочной разработки собственного отечественного препарата для вакцинации крупного рогатого скота от клинически значимых клостридиозов.

Обзор литературы показал, что этиологическая структура клостридиозов КРС в РФ изучена слабо, в основном все работы посвящены изучению патологии у овец. Однако имеющиеся данные свидетельствовали о преобладании тех же видов, что были клинически значимы для остальных видов животных, а также для человека. Наиболее распространённым и представляющим опасность для скота возбудителем является *C. chauvoei*, далее следуют *C. septicum*, *C. perfringens* тип С, несколько реже тип D, *C. oedematiens*. В отличие от отечественных авторов, зарубежные источники говорят о широком распространении клостридиозов, причем помимо перечисленных видов упоминаются *C. sordellii*, *C. perfringens* тип А, *C. bifermentans*, *C. haemolyticum* и др. [30, 35, 120].

Исследований по усовершенствованию технологии изготовления многокомпонентных вакцин против клостридиозов не велось как минимум последние 40-45 лет. Биофабриками применяются две схемы получения клостридиозных моно-анатоксинов: в первом случае, их готовят в виде бактериин/токсоидов, то есть в

состав препарат включают инаktivированные и концентрированные в 2-3 раза бактериальные клетки возбудителей, в том числе эмкара, браздота, энтеротоксемии и других; во втором случае, при изготовлении, например, столбнячного анатоксина и поливалентного анатоксина против злокачественного отека овец, клетки клостридий предварительно удаляются, как не играющие роль в создании иммунитета, а образовавшиеся в культуральной жидкости токсины инаktivируются и концентрируются посредством осаждения гелем гидроокиси алюминия. Оба способа являются устаревшими и не позволяют получать качественные высокоиммуногенные препараты. При изготовлении вакцин по первому типу, значительные ресурсы организма тратятся на индуцирование иммунитета к клеточным антигенам, при этом актуальный антитоксический иммунитет образуется слабый и незначительной продолжительности, как правило не превышающий 4 мес, при этом титр антитоксических антител в крови вакцинированных животных позволяет достоверно инаktivировать лишь 1-2 Dlm токсина, что является недопустимо малым показателем. Изготовление анатоксинов без бактериальных клеток позволяет значительно улучшить эти показатели. При наличии в культуральной жидкости до инаktivации специфических токсинов *C. perfringens* тип С не менее 4000 Dlm/мл, *C. perfringens* тип D не менее 3000 Dlm/мл, *C. oedematiens* не менее 6000 Dlm/мл, и отсутствии потерь при инаktivации и концентрировании, изготовленная серия препарата способна вызвать образование иммунитета не менее 0,2 антитоксических единиц, чего достаточно для инаktivации не менее 20 смертельных доз специфического токсина. Столбнячный анатоксин, изготовленный по этой схеме, индуцирует иммунитет позволяющий инаktivировать не менее 200 смертельных доз нейротоксина. Продолжительность иммунитета при этом составляет до десяти месяцев [35, 52, 61, 63, 137, 257].

Из недостатков наиболее современного российского препарата против анаэробных инфекций - поливалентного анатоксина против клостридиозов овец, можно выжелить следующие: при его производстве не применяется очистка от балластных веществ культуральной среды, концентрирование антигена возможно лишь в 2-3 раза. Однако за прошедший период времени, после разработки кло-

стридиозного анатоксина, были разработаны различные методы концентрирования и очистки анатоксинов, в частности концентрирование методом мембранной фильтрации, из которых наиболее современным и удобным является тангенциальная ультрафильтрация [21, 92, 103, 113].

Ультрафильтрация как метод концентрирования и очистки широко используется зарубежом при изготовлении различных препаратов, в частности дифтерийного, стафилококкового, холерного анатоксинов, фагов и т.д. Эти способы применяются достаточно широко и при изготовлении медицинских клостридиозных анатоксинов, которыми затем иммунизируют лошадей с целью получения гипериммунных сывороток. [30, 61, 63, 122].

Объяснить отсутствие средств специфической профилактики анаэробных болезней крупного рогатого скота можно тремя причинами. Во-первых, в отличие от клостридиозов овец, клостридиозы крупного рогатого скота не приобретали масштабы эпизоотий, гибель от них наблюдалась спорадически, при этом была возможность индивидуального лечения животных. Второй причиной можно назвать отсутствие в стране высокопродуктивных животных, так как разводили в основном мясомолочные породы с продуктивностью 2-3 тысячи литров молока за лактацию. И третья причина – кормление. Так как в настоящее время для поддержания удоев коров кормят концентратами и силосом, это ведет к нарушению обмена веществ, осложняющегося инфекционными болезнями.

Однако, время не стоит на месте, и сложившаяся ситуация с невозможностью профилактировать анаэробные болезни крупного рогатого скота в связи с отсутствием препарата, требовала быстрого решения. Отсутствие на рынке ассоциированных поливалентных вакцин против клостридиозов крупного рогатого скота привело к ситуации, когда профилактика таких болезней, как злокачественный отек, анаэробная энтеротоксемия, некротический гепатит и энтерит, столбняк, стала не возможна [55, 56, 105, 108, 117].

Поэтому, в настоящее время в связи с развитием интенсивного скотоводства, появлением новых высоко продуктивных пород крупного рогатого скота и завозом на территорию новых болезней, актуальным становится использование

для иммунизации ассоциированных вакцин. Поскольку на рынке отсутствовали отечественные ассоциированные вакцины против анаэробных болезней крупного рогатого скота, была поставлена задача разработать ассоциированную вакцину против наиболее актуальных клостридиозов КРС.

Требованием к новому препарату являлось включение в состав всех наиболее важных возбудителей клостридиозов КРС. Поскольку в РФ ранее были разработаны препараты примерно сходного состава для овец и доказана их совместимость, в состав новой вакцины были включены все ранее использованные компоненты: *C. perfringens* тип C, *C. perfringens* тип D, *C. oedematiens*, *C. septicum*, *C. perfringens* тип A, *C. chauvoei* и *C. tetani* [87, 108, 118].

Соответственно возникла необходимость изучения возможности совмещения этих компонентов в препарате и отсутствие при этом интерференции. Анализ литературных данных позволяет заключить, что ассоциированные вакцины против клостридиозов широко применяются в ветеринарной практике, при этом иммунизация является наиболее перспективным методом предотвращения клостридиозов. Отсутствие в РФ ассоциированных вакцин против клостридиозов КРС является недопустимым, поскольку влечет зависимость от импортных препаратов. Поэтому разработка многокомпонентной вакцины против наиболее клинически значимых клостридиозов, совершенствование технологии изготовления моноксидов и бактеринов, из которых затем компонуется препарат, а также отработка методов контроля эффективности каждого компонента, требуют проведения дополнительных исследований.

3. 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».

3.1 Материалы и методы

3.1.1 Материалы

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 №3, *C. perfringens* тип D №91, *C. septicum* №59, *C. septicum* №1098, *C. novyi* №34, *C. sordellii* №3, *C. sordellii* №44; изоляты клостридий различных видов *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 лиофилизированные стандартизированные с активностью: *C. perfringens*: α (альфа) - 60 Dlm/мл, ε (эпсилон)- 250 Dlm/мл, β (бета) – 600 Dlm/мл, *C. novyi* – 200 Dlm/мл, *C. tetani* – 1000 Dlm/мл, *C. sordelli* – 200 Dlm/мл.

Стандартные антитоксические сыворотки: антитоксические сыворотки к токсинам, изготавливаемые ГИСК им. Тарасевича к α (альфа) и ε (эпсилон) токсинам *C. perfringens*, токсину *C. novyi*, токсину *C. septicum*, токсину *C. tetani*; сыворотки NCBI (Великобритания) к токсинам *C. tetani*, токсину *C. Novyi* тип В.

Растворы: хлористого натрия - 0,9 %; гидроокиси натрия 10 %, хлорамина 5 %, глицерина 50 %, глюкозы 40 %, трипсина, хлористого кальция 10 %.

Питательные среды: мясо-пептонный бульон (МПБ), мясо-пептонный печеночный бульон (МППБ) под вазелиновым маслом, мясо-пептонный агар (МПА), среда Сабуро, среда Китта-Тароцци, агар Шедлера, улучшенный бульон для культивирования клостридий, кровяной агар Цейслера, бульон Хоттингера, мясо-казеиновая среда, казеиново-панкреотическая среда, пептонная вода.

Животные: Крупный рогатый скот различных возрастных групп - 1052 голов, мелкий рогатый скот - 928 голов, 451 кролик, 660 морских свинок, 10195 белых мышей. Животные использовались при проведении диагностических иссле-

дований, для проведения доклинических и клинических испытаний препарата, в частности изучение патогенности и вирулентности штаммов, постановки реакции нейтрализации токсинов клостридий, изучения безопасности введения вакцины, определение иммуногенной и антигенной активности монопрепаратов и ассоциированной вакцины, а также оценка длительности иммунитета после вакцинации.

Приборы и оборудование: ламинарный бокс, микроскоп биологический “JENAMED” (ZEISS), термостат с температурой (37 ± 1) °C, холодильник фармацевтический (4 ± 1) °C “Стинол”, морозильник с температурой (-18 ± 5) °C, автоклав вертикальный по ГОСТ 9586-75, нефелометр, весы аналитические, потенциометр, центрифуга Т-24 с 5 тыс. об/мин, анаэростат, вакуумный насос, шуттель-аппарат, электрический дозатор, реакторы для культивирования бактериальной массы Binder, центрифуга “Весман J2-21”, термостаты “Брува-8” и “И-10”, лупа биноккулярная МБС-2, шприцы 0,5; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0 мл, иглы инъекционные, пинцеты, скальпели, ножницы, зажимы, биксы.

Расходные материалы: пакеты газогенераторные объем 2,5 л, транспортировочные пробирки со средой Эймса, чашки Петри, пробирки микробиологические, пипетки объемом 1, 2, 5, 10, 25, 50 мл, фата, марля, дезинфицирующие средства, диагностические тест-системы, сернокислый аммоний.

3.1.2 Методы исследования

Бактериологические исследования клинического и патологического материала с целью выявления и идентификации возбудителей анаэробных инфекций, а также изучения биологических свойств выделенных и музейных культур, проводили в соответствии с ГОСТ 26503-85 «Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики клостридиозов» [15].

Вскрытие и патологоанатомическое исследование трупов проводилось в обследуемых хозяйствах. Отбор проб материала от павших или вынужденно убитых животных с клиническими признаками анаэробных болезней, осуществляли непосредственно при вскрытии, для анализа отбирали кусочки пораженных тканей, паренхиматозные органы, кровь. В качестве клинического материала, взятого при

жизни животного, использовали экссудат с места поражения мышечной и соединительной тканей, который собирали стерильными тампонами и пересылали в лабораторию в одноразовых пластиковых пробирках со специализированными средами Эймса, а также кровь, мочу, выделения из репродуктивных органов.

Бактериологическое исследование на наличие анаэробов проводили путем посева материала на агаризированные и жидкие питательные среды, которые культивировали в анаэроостате при 37 °С в течение 48-72 часов. В качестве агаровых сред использовали среду Шедлера с добавлением крови и/или мясо-пептонный печеночный агар с добавлением крови и глюкозы. Посев проводили методом мазков отпечатков, либо предварительно готовили суспензии исследуемого материала. Параллельно с посевом на агаризированные среды проводили посев на среду Китта-Тароцци для накопления возбудителя.

Выявление клостридий осуществляли также биологическим методом, проводя заражение приготовленной суспензией материала интактных морских свинок, что позволяло достаточно быстро получить подтверждение наличия клостридий и избавиться от посторонней микрофлоры.

Идентификацию изолятов *Clostridium spp.* проводили путем изучения культуральных и морфологических свойства при росте на жидких и плотных питательных средах, а также изучением биохимических, токсигенных и патогенных свойства культур. Биохимические свойства определяли рутинными методами с использованием сред с различными сахарами и многоатомными спиртами, либо диагностическими тест-системами для идентификации клинически значимых анаэробных микроорганизмов. Для контроля качества работы наборов, параллельно с идентификацией изолятов, использовали тест-культуры клостридий из коллекции ATCC *C. novyi* №7659, *C. sordellii* №9714, *C. septicum* №12464.

Серотиповую принадлежность клостридий осуществляли путем постановки РН токсинов стандартными антитоксическими сыворотками, для чего в пробирке смешивали в равных соотношениях раствор токсина с четко установленной активностью, выраженной количеством D_{1m} (100 % летальная доза) для белых мышей массой 16-18 гр. и антитоксическую сыворотку с титром антител, способным

нейтрализовать указанное количество токсина. Смесь перемешивали и оставляли для нейтрализации в течение 45 минут при 37 °С, после чего вводили в объеме 0,5 см³ внутривенно 4 белым мышам. В случае нейтрализации токсина антителами сыворотки крови, мыши после введения смеси оставались живыми, при наличии в смеси активного токсина животные погибали в течение 24 ч наблюдения.

Мониторинг: эпизоотологические исследования по заболеваемости крупного рогатого скота клостридиозами и их клиническому проявлению проведены в 32 хозяйствах 16 областей Центральной России.

Определение количества бактериальных клеток в суспензиях: концентрацию микробных клеток клостридий в суспензиях определяли с использованием нефелометра, а также стандартов мутности 3 и 4 Ед по МакФарланду, и стандартов мутности с концентрацией 1,0 или 2,0 млрд. м.к., изготовленные институтом Тарасевича. Для оценки мутности культуру центрифугировали при 4 тыс. об/мин 30 мин, фугат полностью удаляли, а осадок ресуспендировали в физрастворе и вновь центрифугировали для удаления остатков питательной среды. После двух последовательных отмываний, осадок ресуспендировали в 10,0 см³ физраствора и сравнивали со стандартом мутности.

Определение количества живых клеток и/или спор в культурах проводили методом титрования образцов с последующим высевом определенного объема суспензии последовательных десятикратных разведений. Из трех последних разведений проводили высеvy на агар Шедлера в чашках Петри. Каждым разведением засекали 3 чашки, внося по 0,1 мл суспензии и распределяя ее по поверхности агара. Посевы помещали в анаэробстат и культивировали 48 – 72 ч при 36-37 °С. Для контроля анаэробнозиса использовали резазурин.

По истечении указанного времени подсчитывали количество выросших колоний в каждом разведении споровой культуры и высчитывали их среднее арифметическое значение. Число живых спор в 1 см³ культуры (X), выраженное в млн. клеток, высчитывали по формуле:

$$X = \frac{\frac{P}{g} + \frac{P_1 \times 10}{g_1} + \frac{P_2 \times 100}{g_2}}{3} \times 10 \times 10^6, \text{ где}$$

- X - число живых бактерий в 1,0 см³;
- P - количество колоний во всех чашках из разведения 10⁻⁶;
- g - количество чашек с разведением 10⁻⁶;
- P₁ - количество колоний во всех чашках из разведения 10⁻⁷;
- 10 - перерасчет на разведение 10⁻⁶;
- g₁ - количество чашек с разведением 10⁻⁷;
- P₂ - количество колоний во всех чашках из разведения 10⁻⁸;
- 100 - перерасчет на разведение 10⁻⁶;
- g₂ - количество чашек с разведением 10⁻⁸;
- 3 - количество проб разведений;
- 10 - перерасчет количества живых бактерий на 1,0 см³;
- 10⁶ - степень разведения вакцины.

Для определения количества живых бактерий подсчитывали выросшие колонии в чашках по каждому разведению, полученные показатели суммировали и делили на количество чашек, определяя тем самым среднее количество живых бактерий в каждом разведении, содержащееся в 0,1 см³. Затем средние показатели каждого разведения суммировали и делили на количество разведений (3), получаемое число умножали на степень разведения (10⁻⁶) и полученный показатель увеличивали в 10 раз, определяя количество живых бактерий в 1,0 см³ вакцины.

Определение вирулентности клостридий. Вирулентность культур определяли путем однократного заражения морских свинок или белых мышей последовательными десятикратными разведениями суспензий (10⁵-10⁹), содержащими ориентировочно 100, 20, 4 и 0,8 млн микробных клеток в 1 см³, которые готовили из агаровых культур или отмытых от питательной среды споровых культур. Каждое разведение в тест-дозе вводили внутримышечно в заднюю конечность четырем морским свинкам. При проверке вирулентности штаммов *C. chauvoei* тест-дозу вводили в смеси с 0,2 см³ 10 %-ного раствора кальция хлорида. Учет результатов проводили в течение 5 сут с момента заражения.

Для определения Ld₅₀ необходимо рассчитать концентрацию клеток в заражающей суспензии так, чтобы часть подопытных животных после инокулирования им материала в разных разведениях, выжила.

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

Для обеспечения достоверности при оценке иммуногенной активности препарата в последующем для заражения животных используют от 5 до 100 Ld_{50} штамма в зависимости от его свойств.

Определение ID_{50} дозы для культур клостридий. Для определения способности различных культур индуцировать образование иммунитета, из каждого проверяемого штамма готовили моно-вакцины. Как правило, для этого использовали наиболее вирулентные и токсигенные изоляты различных видов. Для получения моно-вакцин с агара отбирали по 10 однотипных колоний изолята, засеивали во флаконы с МППБ и культивировали в течение 24-48 часов, периодически проверяя и выравнивая pH и подкармливая культуры добавлением через равные промежутки времени стерильный 40% раствор глюкозы.

Затем из каждого флакона брали пробы объёмом 5 см³ для проверки концентрации и чистоты роста. Чистоту посевов определяли микроскопией мазков, окрашенных по Граму, и посевами на МПА, МПБ, МППБ под вазелиновым маслом и среду Сабуро, с последующим просмотром через 18-24 часа культивирования при 37 °С, а на среде Сабуро - при 22 °С через 10 суток.

Бактериальную массу инактивировали формалином, который добавляли из расчёта 0,3-0,7 % к объёму. Формалин предварительно разводили стерильной водой 1:1 и вносили в культуру при постоянном перемешивании. Для инактивации культуры выдерживали при 37 °С в течение нескольких дней. Полноту инактивации контролировали посевом материала во флаконы с МПБ из расчёта 3,0 см³ культуры на 100 см³ среды. Изготовленные для иммунизации антигены считали стерильными в случае отсутствия роста посторонней микрофлоры. Детоксикацию оценивали введением инактивированной суспензии белым мышам, при этом все подопытные животные должны были остаться живыми.

Степень иммуногенности изготовленных таким образом монопрепаратов, оценивали на лабораторных животных. Антигены вводили подкожно однократно в дозах 1,0 млрд., 200,0 млн, 40,0 млн и 8,0 млн микробных клеток, используя по 5 животных на дозу. Заражение иммунизированных животных проводили в дозе 5 - 20 Ld_{50} на 14-16 день после начала опыта. Наблюдение за животными вели в течение 10 дней с момента заражения. Величину ID_{50} рассчитывали по формуле Кербера в модификации Ашмарина-Воробьева:

$Lg ID_{50} = lgD - \delta (\sum Li - 0,5)$, где: D - максимальная из испытанных доз бактерий; δ - логарифм отношения каждой последующей дозы к предыдущей; Li - отношение числа животных, выживших при иммунизации данной дозой, к общему количеству животных; $\sum Li$ - сумма значений.

Токсичность культур клостридий оценивали путем однократного введения последовательных десятикратных разведений культуральной жидкости штаммов, предварительно очищенных от бактериальных клеток путем осаждения, а затем стерилизующей фильтрации. Для определения степени токсинообразования культур *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. tetani* клостридий проводили посев проверяемого штамма во флаконы с 80-100 cm^3 мясо-казеиновой среды. После инкубирования в термостате при температуре $(37 \pm 1) ^\circ C$ в течение 18-24 ч для *C. perfringens* и *C. novyi*, и 45 - 48 ч для *C. tetani*, реактивированную культуру пересевают по 1 cm^3 в 3 флакона вместимостью 200 cm^3 со 100 cm^3 мясо-казеиновой среды.

Выращивание культур, кроме *C. tetani*, проводили при температуре $37 \pm 1 ^\circ C$, время культивирования устанавливали для каждого штамма индивидуально в зависимости от ростовых характеристик и предполагаемой токсигенности в сравнении с аналогичными культурами того же вида. Штамм *C. tetani* выращивали при $34 \pm 1 ^\circ C$. Культуры во флаконах проверяли на микробиологическую чистоту микроскопией и посевами в МППБ, МПБ, МПА.

При отсутствии в мазках посторонней микрофлоры, культуральную жидкость центрифугировали при 6000 об/мин в течение 30 мин для осаждения бактериальных клеток, после чего производили стерилизующую фильтрацию. Из сте-

рильных фильтратов готовили десятикратные разведения в 0,9 %-ном растворе натрия хлорида: 1:10; 1:100; 1:1000 и т.д. до предполагаемого титра токсина.

Полученные разведения фильтрата вводили 2 белым мышам массой 16 – 18 г в дозе 0,5 см³, при этом для определения токсичности изолятов *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. septicum* культуральную жидкость вводили внутривенно, а *C. tetani* – внутримышечно в области бедра. Токсинсодержащую жидкость каждого штамма можно вводить одним шприцом, начиная с наибольшего разведения фильтрата.

Наблюдение за подопытными мышами проводили в течение определенного времени после инъекции, отмечая наибольшее разведение фильтрата, вызвавшего гибель животных при клинических проявлениях болезни.

Используемые для производства препаратов штаммы клостридий должны отвечать определенным требованиям по токсичности. Для производства допускают культуры *C. tetani*, которые через шесть суток роста образуют не менее 80-100 тыс. Dlm/см³ токсина для белых мышей массой 16–18 г., культуры *C. novyi* – не менее 6 тыс., *C. perfringens* тип А- 100, типы С и D – 2000 Dlm/см³.

Определение безвредности моно-вакцин и экспериментальных серий поливалентного препарата для лабораторных и восприимчивых животных проводили согласно ГОСТ 31926-2013 «Средства лекарственные для ветеринарного применения. Методы определения безвредности». При этом препарат экспериментальных серий вводили крупному рогатому скоту и овцам различных возрастных групп в рекомендованной дозе и дозе, двукратно превышающей рекомендованную. Также оценивали влияние препарата на беременность у подопытных животных и отсутствие тератогенного действия, регистрируя случаи рождения нежизнеспособного молодняка и наличие различных выраженных уродств.

Определение иммуногенности вакцины осуществляли двумя методами: заражение вирулентными контрольными штаммами предварительно иммунизированных животных, и постановкой РН токсинов клостридий антителами сыворотки крови вакцинированных животных.

Опытные образцы моновакцин и ассоциированный препарат изготавливали из бактеринов и токсоидов штаммов клостридий, инаktivированных формали-

ном, концентрированных путем ультрафильтрации и адсорбированных на геле гидрата окиси алюминия. Компоненты препарата смешивали в эффективном количестве, предварительно определенном в опытах на лабораторных животных.

Компоновку серии препарата осуществляли путем объединения всех компонентов в определенном соотношении, после чего они тщательно перемешивались, адсорбировались адьювантом и дополнительно консервировались путем добавления раствора мертиолята до конечной концентрации 0,01%. Полученный препарат после оценки внешнего вида, проверки на стерильность и безвредность для лабораторных животных, расфасовывали, укупоривали, этикетировали и использовали для проведения доклинических и клинических исследований.

Стабильность свойств препарата при хранении оценивали путем проверки его качества по всем показателям НД через равные промежутки времени с интервалом в три - шесть месяцев. Полученные показатели сравнивали с данными, которые были у препарата при выпуске.

Эффективность экспериментальной вакцины в хозяйствах оценивали по уменьшению вновь регистрируемых случаев заболевания животных клостридиозами из числа входящих в состав препарата. Для опытов подбирали хозяйство, ранее неблагополучное или имевшее проблемы с заболеваемостью и падежом животных с признаками анаэробных инфекций. После эпизоотологического обследования хозяйства, проводили отбор материала для лабораторного подтверждения диагноза. Вакцинацию животных проводили в случае выявления в материале тех видов клостридий, которые есть в составе вакцины. Подопытных и контрольных животных содержали в одинаковых условиях. Срок наблюдения составлял до пятнадцати месяцев после вакцинации. Критерий оценки - отсутствие среди иммунизированных животных и полученного от них молодняка случаев возникновения клостридиозов в сравнении с этим показателем в контрольной группе, а также с данными ветеринарных отчетов за предыдущие годы.

4 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

4.1 Этиологическая структура клостридиозов в РФ

Этиологическую структуру клостридиозов КРС и овец изучали путем анализа отчетов ветеринарных лабораторий, предоставленных ФГБУ «Центр ветеринарии», а также исследованием патологического материала от павших или вынужденно убитых животных, имеющих клинические признаки анаэробных инфекций. Материал для исследования отбирали в неблагополучных по клостридиозам животноводческих хозяйствах различных областей РФ при проведении эпизоотологического обследования, включающего клинический осмотр животных, проведение диагностических убоев, вскрытие трупов с отбором образцов для последующего бактериологического исследования.

Согласно данным отчетности, в РФ ежегодно регистрируется значительное количество новых случаев различных анаэробных болезней, среди которых у КРС преобладают анаэробная энтеротоксемия и злокачественный отек, несколько реже встречается эмфизематозный карбункул. Данные о выявлении случаев эмфизематозного карбункула, злокачественного отека, столбняка и анаэробной энтеротоксемии за десять лет наблюдения представлены в таблице 7.

Таблица 7 - Количество неблагополучных пунктов и животных, заболевших различными анаэробными инфекциями (КРС)

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

Из представленных в таблице 7 данных видно, что клостридиозы у КРС регистрируются ежегодно, при этом носят спорадический характер и проявляются в

виде заболевания небольшого количества животных. В среднем в каждом неблагополучном по злокачественному отеку пункту выявлено по 1,78 голов больных животных; эмфизематозному карбункулу - 3,6, по анаэробной энтеротоксемии - 7,99. Следует учитывать, что эмфизематозный карбункул проявляется несмотря на поголовную вакцинацию всего поголовья в возрасте от 3 мес до 4 лет, что говорит о повсеместном распространении инфекции, а также возможных нарушениях при проведении иммунизации. Случаев столбняка у КРС за последние десять лет официально зафиксировано не было.

В современных условиях ведения сельского хозяйства, основными predisposing факторами для возникновения клостридиозов у животных являются случаи нарушения технологии кормления и содержания скота. Учитывая, что животные круглый год находятся в помещениях, происходит постоянное пассажирование штаммов возбудителей, усиление их вирулентности и токсигенности. Высокая скученность животных приводит к постоянному воздействию различных стресс-факторов, способствует развитию травматизма, что в последствии осложняется анаэробными инфекциями. Развитию анаэробной энтеротоксемии также способствует кормление недоброкачественными кормами, обсемененными спорowymi формами возбудителей.

Следует отметить, что количество случаев заболевания, а также количество неблагополучных пунктов по различным клостридиозам за последние десять лет 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 отека почти на 70%. Это связано, в первую очередь, с широким охватом поголовья скота иммунизацией ассоциированными препаратами.

Для наглядной оценки количества неблагополучных пунктов по некоторым инфекционным заболеваниям, вызванных бактериями вида *Clostridium spp.*, на рисунке 1 приведены статистические данные за 2007-2017 годы, где показано, что количество неблагополучных пунктов за эти годы снизилось практически до единичных случаев.

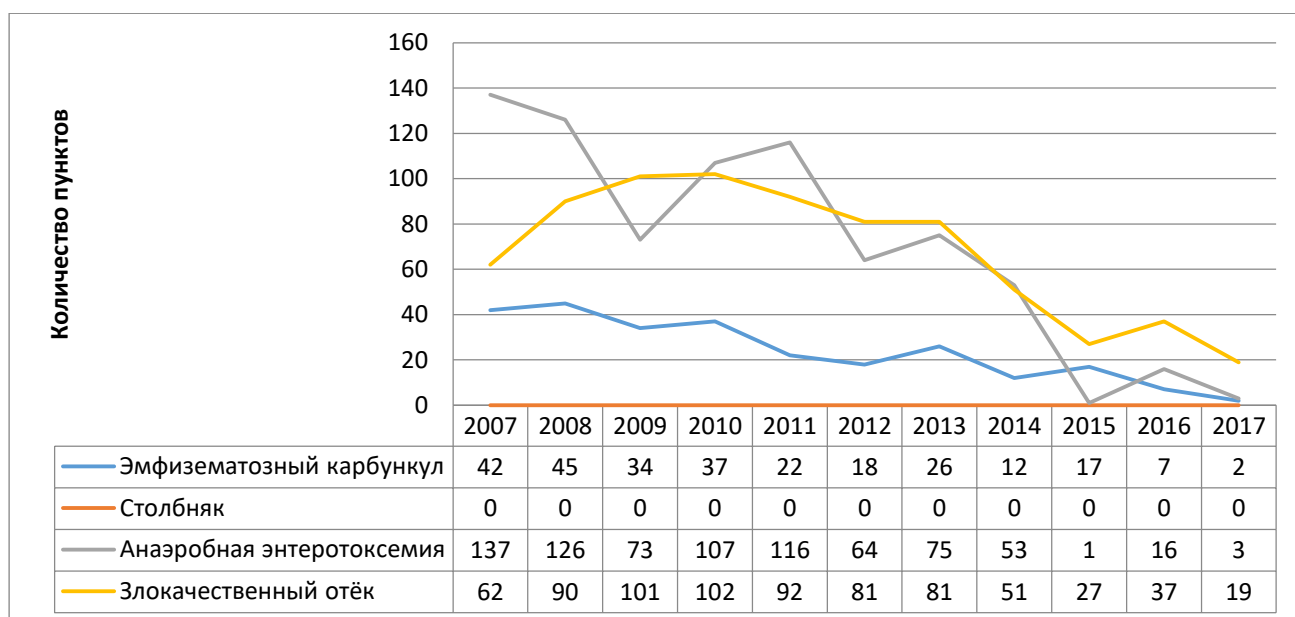


Рисунок №1 - Количество неблагополучных пунктов по клинически значимым клостридиозам КРС за 2007 – 2017 годы на территории РФ

Во многом схожая ситуация по распространению анаэробных инфекций складывается и с клостридиозами овец. Результаты анализа распространенности клостридиозов овец представлены в таблице №8.

Таблица 8 - Количество неблагополучных пунктов и животных, заболевших различными анаэробными инфекциями (МРС)

Инфекция		Период наблюдения										
		2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Эмфизематозный карбункул	Пунктов	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	Животных	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Столбняк	Пунктов	0	0	2	1	0	0	2	0	0	0	0
	Животных	0	0	31	4	0	0	3	0	0	0	0
Анаэробная энтеротоксемия	Пунктов	66	90	131	121	103	61	56	61	7	4	3
	Животных	824	860	737	713	485	263	874	235	117	85	117
Анаэробная дизентерия	Пунктов	0	3	0	5	9	2	1	1	0	0	0
	Животных	69	86	66	131	40	4	4	26	20	47	0
Брадзот	Пунктов	0	0	34	26	11	23	35	17	1	2	1
	Животных	533	325	256	123	36	209	288	55	53	129	67
Злокачественный отёк	Пунктов	1	0	3	5	5	2	1	4	0	0	0
	Животных	8	4	8	6	9	2	2	4	5	2	1

Как видно из таблицы №8, количество вновь выявленных неблагополучных пунктов по всем показанным заболеваниям сократилась к 2017 г. в отношении 2007 года. Так количество неблагополучных пунктов по анаэробной энтеротоксемии овец за анализируемый период сократилось более чем в 20 раз, по злокачественному отёку в 8 раз. Что касается брадзота, то выявляемость инфекции варьи-

рует достаточно сильно, но в последние годы также проявляется в виде единичных случаев. Такие болезни как эмфизематозный карбункул, столбняк, анаэробная дизентерия у овец за последние десять лет не фиксировались, либо зарегистрированы в виде единичных случаев.

Более наглядно динамика заболеваемости клостридиозами у мелкого рогатого скота продемонстрирована на рисунке №2.

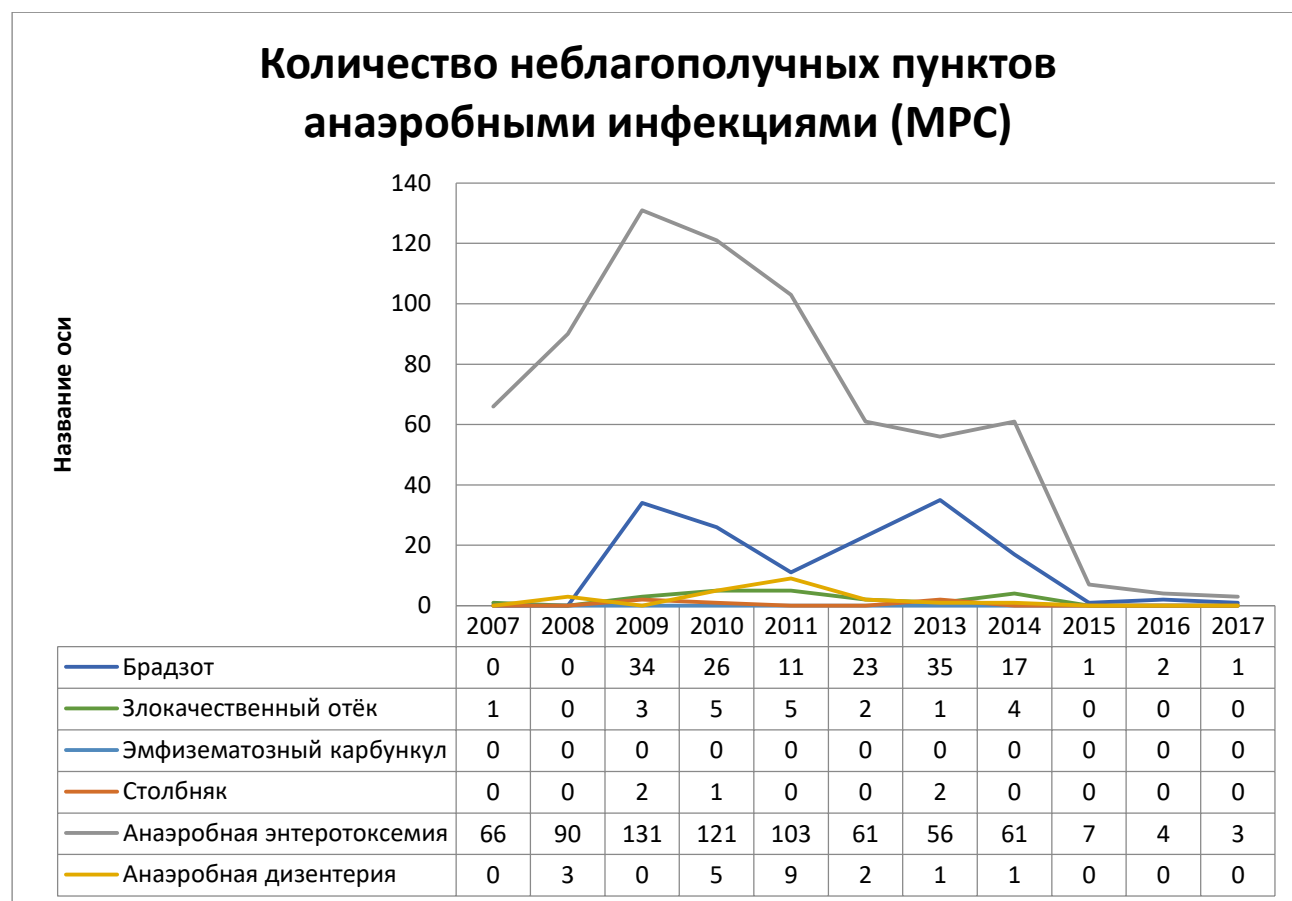


Рисунок 2 - количество неблагополучных пунктов по клинически значимым клостридиозам МРС за 2007 – 2017 годы на территории РФ

Несмотря на убиквитарность возбудителей, у овец, как и у КРС, наблюдается динамика снижения количества неблагополучных пунктов. Связано это с несколькими причинами, из которых наиболее убедительными являются снижение общего количества поголовья овец в стране, переход овцеводства в частные хозяйства, что привело к уменьшению концентрации скота в помещениях и на пастбищах, и с массовым внедрением в практику более совершенных вакцин, обеспе-

чивающих защиту от широкого круга возбудителей высокой напряжённости и большей длительности.

Анализ данных, приведенных на рисунке №3, позволяет говорить о уменьшении количества случаев заболевания животных анаэробной энтеротоксемией к 2017 г. на 63,9% в сравнении с 2007 годом, в отношении браздота значение данного показателя снизилось на 86,6%, а для злокачественного отёка на 56,4%. Стабилизация вышеприведенной эпизоотической ситуация может наблюдаться лишь при проведении своевременных профилактических мероприятий, наиболее эффективным из которых является специфическая профилактика.

Стоит учитывать, что официальные данные не совсем отражают реальную ситуацию с заболеваемостью животных анаэробными инфекциями, так как обращение владельцев в Государственную ветеринарную службу в случае подтверждения диагноза на наличие в материале возбудителей эмфизематозного карбункула, столбняка, браздота и других анаэробов, влечет за собой наложение ограничительных мероприятий и существенные экономические потери. Поэтому владельцы предпочитают проводить диагностику в многочисленных коммерческих диагностических центрах, и принимают решение о применении средств специфической профилактики в зависимости от спектра идентифицированных видов клостридий, либо вовсе замалчивают случаи гибели животных. Несмотря на опасность, эти болезни считаются не заразными, и возникновение отдельных случаев при соблюдении мер безопасности, дезинфекции и профилактике болезни не ведет к массовому распространению инфекций.

4.2 Эпизоотологическое обследование хозяйств неблагополучных по клостридиозам

Для получения собственных данных относительно распространения клостридиозов проведено эпизоотическое обследование 32 хозяйств 16 регионов РФ, откуда получено и исследовано 2913 проб материала от 983 коров и 119 телят различного возраста.

Обследования проводились по обращению ветеринарных специалистов в связи с появлением случаев заболевания и, как правило, гибели животных с ха-

рактерными признаками анаэробной инфекции. У взрослых животных в подавляющем большинстве случаев диагностировался злокачественный отек различных органов и тканей, а также некротический энтерит. Телята неонатального, реже более старшего возраста, заболевали с признаками анаэробной энтеротоксемии.

Анаэробная энтеротоксемия у новорожденных телят проявлялась в виде острой токсико-инфекции, характеризующейся общим сильно выраженным токсикозом с поражением желудочно-кишечного тракта и центральной нервной системы. Возникновение болезни начинается с интенсивного размножения в кишечнике *C. perfringens* различных типов, которые образуют значительное количество токсинов. Наиболее часто при бактериологическом исследовании от телят изолировали *C. perfringens* тип А, реже типы С и D. Стоит однако отметить, что при проверке вирулентности и токсичности выделенных культур, получены данные о низком значении этих показателей у изолятов *C. perfringens* типа А. Частота выделения культур этого типа из материала скорее всего связана с широким распространением их в природе, фекалиях, а также загрязнением материала при вскрытии. Основными возбудителями анаэробной энтеротоксемии у телят являются вирулентные и высокотоксигенные штаммы *C. perfringens* типов С, и реже А и D.

Клостридиозы у коров наблюдали в основном перед отелом или в течение месяца после него, реже после травм. Клинически у коров болезнь начиналась с быстро нарастающего угнетения, вызванного интоксикацией организма, отеками, омертвением пораженных тканей. Как правило, поражаются мышцы тазовых конечностей, органы репродуктивной системы, вымя, реже другие органы и ткани. Наиболее часто у взрослого крупного рогатого скота диагностировали злокачественный отек.

Следует отметить, что независимо от вида возбудителя, вызывающего патологию, 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.

Различные формы клинического проявления злокачественного отека у коров представлены на рисунках 3, 4, 5.



Рисунок 3 - злокачественный отек



Рисунок 4 - злокачественный отек



Рисунок 5 - гангренозное поражение левой передней доли вымени при злокачественном отеке.

В зависимости от токсичности штаммов возбудителя и длительности течения болезни, наблюдались сильно выраженные изменения печени и сердца. При проведении патологоанатомического исследования трупов животных, павших с признаками анаэробной энтеротоксемии, обнаруживали наличие экссудата в брюшной и грудной полостях, вздутие и геморрагическое воспаление слизистой

тонкого отдела кишечника различной степени выраженности, у отдельных животных выявлялось поражение почек, сопровождающееся размягчением паренхимы органа (рисунки 8 и 9). На серозных поверхностях внутренних органов, как правило, присутствовали точечные кровоизлияния.

Печень была увеличена, имела глинистый цвет с четко выраженными очагами некрозов, либо с полностью пораженной тканью. Желчный пузырь наполнен значительным количеством желчи. Сердечная мышца бледная, имеет вид вареного мяса. Легкие отечны, трахея и бронхи в различной степени заполнены пенистой жидкостью, на слизистой полосчатые кровоизлияния.



Рисунок 6 - Эмфизематозный карбункул крупного рогатого скота



Рисунок 7 - Злокачественный отек у коровы с поражением почек



Рисунок 8 – Почка теленка, павшего от анаэробной энтеротоксемии, вызванной *C. perfringens* тип D, «мягкая почка»



Рисунок 9 - Почка теленка без патологических изменений



Рисунок 10 - Желатинозный отек соединительной ткани с желтушной окраской, вызванный *C. sordellii*



Рисунок 11 - Очаги некроза мышечной ткани, так называемый «целлюлит» при поражении, вызванном *C. septicum*

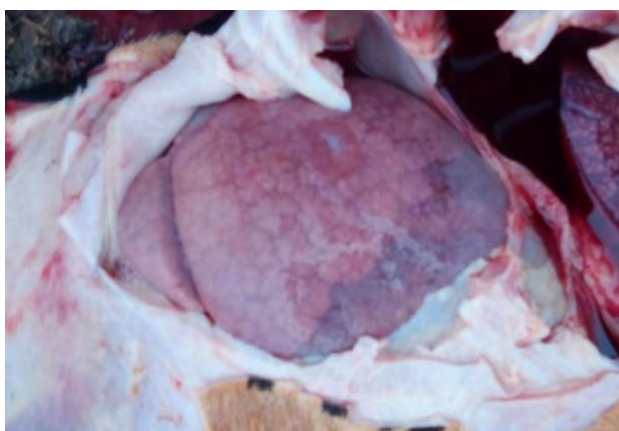


Рисунок 12 - Очаги некроза печени при инфекции, вызванной *C. oedematiens*



Рисунок 13 – Абомазит у коровы, вызванный *C. septicum*

Наиболее часто выявлялись случаи гангренозного поражения мышц бедренной группы, сопровождающиеся образованием обширного отека, крепитацией ткани при надавливании, с последующим их расплавлением, наличием экссудата, пузырьков газа, специфического запаха. У отдельных животных в мышцах обнаруживались ограниченные, покрытые капсулой участки ткани темно-красного или вишневого цвета, с маслообразной консистенцией, размером от 7 до 15 см в диаметре, так называемый «целлюлит», вызываемый *C. septicum* (рисунок 11).

В одном из животноводческих хозяйств Рязанской области, где происходила массовая гибель первотелок, заболевание начиналось через 3-7 суток после отела и начала интенсивной молокоотдачи. У новотельных животных пропадал аппетит, резко уменьшался удой, животное становилось малоподвижным, про-

грессировало быстрое снижение веса. Через несколько дней после этого на крупе, в области бедер, реже на передних конечностях, начинали образовываться отеки различной величины, сопровождающиеся поражением мышечной ткани, не характерным для клостридиозов. Из-за сдавления сосудов и нарушения циркуляции крови, поверхность отеков становилась более холодной в сравнении с окружающими тканями. Животные стояли в вынужденной позе, согнув спину, перенося вес на здоровые конечности. Крепитации тканей на месте поражения не наблюдалось. Лечение антибиотиками не приносило желаемого результата, все заболевшие животные были вынужденно убиты. При проведении патологоанатомического исследования, область образования отека представляла собой полость, заполненную кровянистой жидкостью, в которой находилось значительное количество сгустков и кусочков расплавленной мышечной массы. Вся соединительная ткань, заполняющая межмышечное пространство, была расплавлена. Объем жидкости был различен, мог достигать до 5-7 литров. Вероятно, основным предрасполагающим фактором возникновения болезни являлось неправильное плохо сбалансированное кормление высокоудойного скота. Нарушенное фосфорно-кальциевое соотношение, высокое содержание количества органических кислот, недостаток сахаров на фоне белкового перекорма вызывали нарушение обмена веществ. Недостаток кальция приводил к снижению двигательной активности, в том числе страдала сердечная мышца, что вело к залеживанию, а избыток фосфора приводил к увеличению порозности сосудов, образованию обширных лимфоэкстравозатов и поражению мышечной ткани. В дальнейшем происходило обсеменение их различной микрофлорой, в том числе клостридиями различных видов. При бактериологическом исследовании материала от 4 животных, больных на момент проведения обследования, выявлены *C. hystolicum*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Streptococcus spp.*

4.3 Бактериологические исследования

Для бактериологического исследования на наличие возбудителей анаэробных инфекций отбирали участки пораженных тканей, кусочки паренхиматозных

органов (мышцы, печень, селезенка, почки), кровь из сердца, участок тонкого отдела кишечника с содержимым.

Доставленные в лабораторию образцы исследовали микроскопически и при наличии в мазках крупных грамположительных палочек, проводили посевы на питательные среды. Для выделения *Clostridium* материал высевали на жидкие питательные среды Китта-Тароцци или МППБ и МПБ, агары Цейслера и Шедлера с добавлением 10% крови барана и 0,5 % глюкозы, а также МПА и Сабуро для выявления сопутствующих микроорганизмов. Посевы на плотных средах инкубировали в анаэроостате при 37 °С в течение 24-48 ч, для создания анаэробноза при культивировании посевов использовали газогенераторные пакеты.

Образовавшиеся колонии пересевали для накопления на среду Китта-Тароцци, МППА с кровью и глюкозой для получения чистых культур, МПБ и скошенный МПА для контроля чистоты роста.

Тинкториальные и морфологические свойства изолятов клостридий изучали путем просмотра мазков, окрашенных по Граму.

Изоляты относили к роду *Clostridium*, если они росли на средах Китта-Тароцци и на агаре в анаэроостате, при отсутствии роста на МПА и МПБ. Рост на среде Китта-Тароцци сопровождался обильным помутнением и газообразованием. При этом в мазках, окрашенных по Граму, обнаруживали крупные грамположительные спорсодержащие палочки.

Сцелью усовершенствования диагностики и ускорения процесса изоляции и идентификации культур *Clostridium* spp. нами была разработана схема проведения бактериологического исследования, позволяющая отнести выделенные культуры микроорганизмов к различным родам. Схема проведения бактериологического исследования патологического материала, содержащего анаэробы, и позволяющая систематизировать полученные данные, представлена на рисунке 14.

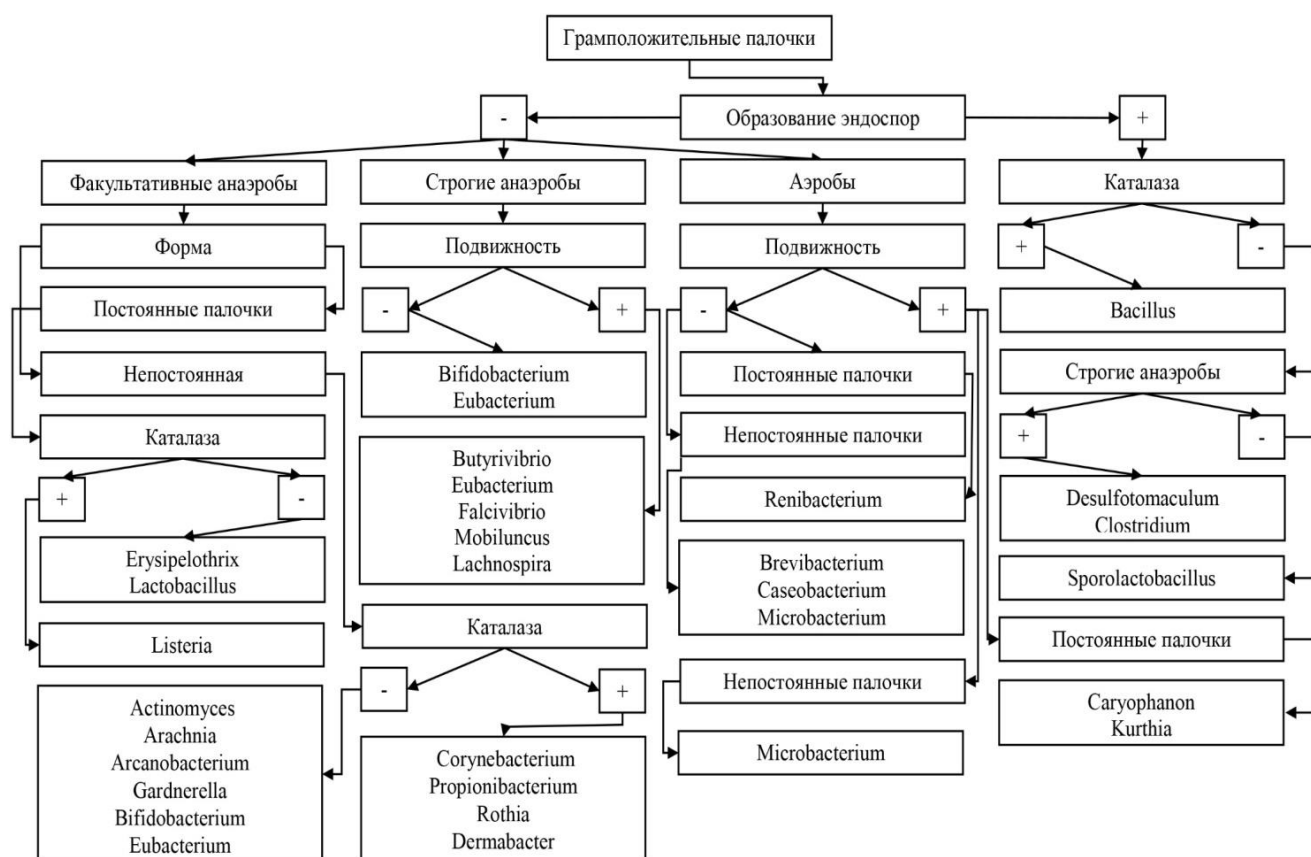


Рисунок 14 - Схема биохимической идентификации грамположительных палочковидных бактерий

Представленная схема позволяет быстро дифференцировать с высокой вероятностью изоляты грамположительных бактерий и изолировать клостридии по наличию эндоспор, каталазной активности и толерантности к кислороду.

В случае наличия роста в средах обильной факультативно-анаэробной микрофлоры, мешающей выделению анаэробов, пробирки со средой Китта-Тароцци выдерживали в темном месте при комнатной температуре в течение 10-14 суток, после чего прогревали на водяной бане при 90 °С в течение 10 мин. Образовавшиеся споровые формы анаэробов сохраняли жизнеспособность, посторонняя микрофлора погибала. Осадок пересевали на среду Китта-Тароцци для накопления, а затем, при наличии роста, на МППА с добавлением крови и глюкозы, что позволяло получить чистые культуры возбудителей.

С целью идентификации культур клостридий, их высевали в две пробирки на скошенный кровяной агар, одну из которых культивировали в анаэробных условиях, а другую на воздухе. Через 24-48 часов, при наличии роста микрофлоры

на агаре в анаэроостате и отсутствии роста на контрольных пробирках, из культуры готовили мазки. При обнаружении в мазках характерных для клостридий папочек, не контаминированных посторонней микрофлорой, готовили бактериальную суспензию с концентрацией 3 единицы по McFarland. Идентификацию по ферментативным свойствам проводили с использованием набора «RapID ANA II», предназначенного для идентификации клинически значимых анаэробов.

Подготовленную суспензию культуры микроорганизма инокулировали в плашку набора, содержащую 18 тестов, равномерно распределяли по лункам и культивировали в термостате при 37 °С в течение 6 часов. Далее в лунки вносили соответствующие реактивы. Реакцию учитывали в течение 2-5 мин, после чего данные обрабатывали специальной программой или с помощью книги кодов.

В случае отрицательных результатов идентификации, дополнительно использовали ряд тестов, позволяющих установить вид микроорганизма.

Всего было проведено исследование 2913 проб патологического материала, из которого выделено 714 изолятов клостридий. Часть культур, выделенных из материала, поступившего из одного хозяйства, в случае схожести морфологии и ферментативных свойств признавалась как один штамм возбудителя. Таким образом для исследования было отобрано 128 изолятов, выделенных из различных источников и имеющих различные свойства. Проведенная идентификация позволила достоверно определить видовую принадлежность 117 из них. Еще 11 изолятов не были идентифицированы, так как не входили в имеющуюся базу видов, заложенных в программе.

В результате исследований удалось установить видовой спектр клостридий, в той или иной степени имеющих отношение к возникновению клостридиозов у крупного рогатого скота. Помимо широко распространенных видов, описанных различными исследователями, встречаются редкие виды, в том числе такие, которые ранее в России не были описаны как возбудители анаэробных инфекций у жвачных животных. Результаты исследования представлены в таблице 9.

Таблица 9 - Видовая принадлежность изолятов клостридий

№№	Наименование региона	Количество хозяйств	Количество образцов	Количество изолятов	Виды возбудителей
1	Московская обл.	8	564	14	<i>C. perfringens m. A</i> <i>C. perfringens m. C</i> <i>C. septicum</i> <i>C. novyi</i> <i>C. tetani</i> <i>C. sordellii</i> <i>C. bifermentans</i> <i>C. baratii</i>
2	Рязанская обл.	3	156	19	<i>C. sordellii</i> <i>C. perfringens m.A</i> <i>C. perfringens m.C</i> <i>C. septicum</i> <i>C. histolyticum</i> <i>C. chauvoei</i>
3	Кировская обл.	3	168	3	<i>C. perfringens A</i> <i>C. perfringens C</i> <i>C. septicum</i>
4	Белгородская обл	5	180	5	<i>C. perfringens A</i> <i>C. perfringens C</i> <i>C. septicum</i>
5	Саратовская обл.	2	54	13	<i>C. perfringens A</i> <i>C. perfringens C</i> <i>C. septicum</i>
6	Иркутская обл.	1	32	2	<i>C. perfringens A</i> <i>C. perfringens C</i> <i>C. septicum</i>
7	Краснодарский край	9	658	24	<i>C. perfringens A, C</i> <i>C. septicum</i> <i>C. histolyticum</i> <i>C. septicum</i> <i>C. sordellii</i> <i>C. hastiforme</i> <i>C. innocuum</i>
8	Ставропольский край	4	319	3	<i>C. perfringens A</i> <i>C. perfringens C</i> <i>C. septicum</i> <i>C. difficile</i>
9	Мордовия	4	226	16	<i>C. perfringens A</i> <i>C. perfringens C</i>
10	Липецкая обл.	1	80	5	<i>C. perfringens A</i> <i>C. perfringens C</i> <i>C. septicum</i>
11	Орловская обл.	3	187	4	<i>C. perfringens A</i> <i>C. perfringens C</i>
12	Ленинградская обл	2	181	15	<i>C. perfringens A</i> <i>C. perfringens C</i> <i>C. septicum</i> <i>C. histolyticum</i>

№№	Наименование региона	Количество хозяйств	Количество образцов	Количество изолятов	Виды возбудителей
13	Тверская обл.	1	74	3	<i>C. perfringens D</i> <i>C. tertium</i>
14	Ульяновская обл	1	6	2	<i>C. septicum</i> <i>C. novyi</i>
15	Челябинская обл	2	13	4	<i>C. sordellii</i> <i>C. bifermentans</i> <i>C. innocuum</i>
16	Калмыкия	1	1	1	<i>C. chauvoei</i>
	Итого	32	2913	714 / 128	

Для наглядности полученные результаты дополнительно отражены на графике отраженном на рисунке 15.



Рисунок 15 – Структура клостридиозов крупного рогатого скота, вызванных наиболее клинически значимыми видами клостридий

Как видно из материалов таблицы 9, при бактериологическом исследовании патологического материала от КРС, выделяются следующие виды возбудителей: *C. septicum*, *C. perfringens*, *C. chauvoei*, *C. oedematiens*, *C. histolyticum*, *C. sporogenes*, *C. tetani*, *C. baratii*, *C. bifermentans*, *C. difficile*, *C. hastiforme*, *C. histolyticum*, *C. innocuum*, *C. sordellii*, *C. sporogenes*, *C. tertium*. Наиболее клинически значимыми являются виды *C. septicum* – обнаруживается в 34,5 % случаев, *C. perfringens* тип A - 23,25%, *C. perfringens* тип C – 14,25 %, *C. perfringens* тип D –

6,5 %, *C. novyi/oedematiens* – 2,5 %, *C. sordellii* – 6,5%. Все 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 %.

Полученные результаты в определенной степени подтверждают литературные данные о важном значении в возникновении клостридиозов у взрослого КРС таких возбудителей, как *C.septicum*, ранее считавшейся более актуальной для овец, *C. perfringens* различных типов, но особенно типа А, являющихся причиной болезни в 44,0 % случаев, *C. oedematiens*, *C. sordellii*, *C. chauvoei*. Поэтому именно эти возбудители являются наиболее часто используемыми при изготовлении иммунобиологических препаратов.

Анализ данных, приведенных на рисунке №15, позволяет утверждать о наличии широкого спектра возбудителей анаэробных болезней крупного рогатого скота, как описанных ранее, так и не упоминавшихся в роли этиологических агентов. Проведенная проверка вирулентности культур показала, что в большинстве случаев они не вызывают гибели лабораторных животных, и после кратковременного переболевания наступает выздоровление экспериментально зараженных морских свинок. Несмотря на это, в ассоциации они усиливают степень поражения органов и тканей.

Следует отметить, что эта структура свойственна злокачественным отекам взрослого КРС, у телят складывается несколько другая картина заболевания.

Анаэробная энтеротоксемия поражает в основном молодняк первых дней жизни, при этом практически всегда возбудителем являются различные серотипы *C. perfringens*. У телят первых дней жизни преобладает анаэробная энтеротоксемия, наиболее часто выявляются *C. perfringens* тип А – 50% случаев, тип С – 39,5%, тип D – 10,5%, при этом тип D преобладает у телят в возрасте от 14 до 60 дней. Стоит отметить, что в последующем при проверке вирулентности и токсичности выделенных изолятов было установлено, что изоляты типа А были непатогенны и не обладали токсигенностью, поэтому несмотря на частую встречаемость, играли незначительную роль в патогенезе заболевания.

Типизацию изолятов *C. perfringens* проводили постановкой реакции нейтрализации с применением коммерческих антитоксических сывороток к различным типам *C. perfringens*.

Определение патогенности выделенных изолятов проводили на морских свинках массой $350,0 \pm 4,32$ г, и кроликах породы шиншилла массой $2,5 \pm 0,54$ кг. При первичном заражении культуру микроорганизма вводили внутримышечно в объеме 0,5 и 1,0 мл двум животным. Часть штаммов, не вызвавших гибель морских свинок, и схожих морфологически с *C. chauvoei* и *C. bifermentans*, исследовали на патогенность дополнительно, вводя культуры с добавлением раствора хлористого кальция.

Признаки развития заболевания у подопытных морских свинок начинались практически сразу после инъектирования. Вероятно, этому способствовало наличие определенного количества токсина в культуральной жидкости заражающего материала. В большинстве случаев гибель животных после заражения наступала через 16-24 часа.

Таким образом, из 128 выделенных изолятов клостридий различных видов, было отобрано 25 культур, вызывающих гибель лабораторных животных. Среди вирулентных штаммов выявлены культуры всех наиболее распространённых возбудителей: *C. septicum*, *C. perfringens* тип С, *C. perfringens* тип А, *C. perfringens* тип D, *C. tetani*, *C. sordellii*.

Для изучения токсигенных свойств использовали только отобранные патогенные штаммы. Токсигенность определяли на беспородных мышах (n=480) живой массой 16-18 г. Культуральную токсинсодержащую жидкость получали путем выращивания изолятов на специальных питательных средах, после чего центрифугировали, а супернатант фильтровали через стерилизующие фильтры. Полученные фильтраты вводили внутривенно белым мышам, используя по две мыши на каждый изолят. Токсигенными признавались культуры, которые вызывали гибель животных в течение 24 ч наблюдения. В результате установлено, что в той или иной степени токсигенными были все выделенные культуры *C. perfringens* тип С, *C. perfringens* тип А и тип D, а также по одному изоляту *C. sordellii* и *C.*

novyi, не было выявлено токсигенных культур *C. septicum*. Для точного определения количества образуемого токсина опыт повторяли, вводя белым мышам различные разведения культуральной жидкости.

Как видно из представленного в разделе материала, клостридиозы широко распространены и часто становятся причиной гибели животных в скотоводческих хозяйствах. Наиболее часто диагностируется анаэробная энтеротоксемия, которой подвержен молодняк неонатального возраста, и злокачественный отек у взрослых животных. Во всех случаях заболевание носило стационарный характер и проявлялось у животных на фоне изменения физиологического состояния, нарушения режимов кормления, использования недоброкачественного корма.

У телят наиболее распространенным заболеванием является анаэробная энтеротоксемия, вызываемая *C. perfringens* тип С, реже А и D. Злокачественный отек у взрослых животных развивался, как правило, после отелов, реже при травмировании тканей. Заболевание вызывали *C. septicum*, *C. novyi*, *C. perfringens* и *C. sordellii*, а также их ассоциации. При возникновении заболевания у новотельных животных болезнь сопровождалась гибелью в 100% случаев. Проведенное бактериологическое исследование материала позволило выявить 25 высоковирулентных и токсигенных штаммов клостридий, среди которых *C. septicum*, *C. novyi*, *C. perfringens*, *C. sordellii*.

4.4 Совершенствование технологии изготовления вакцины

В основе патогенеза клостридиозов лежит токсический фактор, а надежную защиту от анаэробной инфекции обеспечивает антитоксический иммунитет. Поскольку, в большинстве случаев, у крупного рогатого скота клостридиозы протекают в ассоциированном виде, целесообразно создание препарата, индуцирующего образование иммунитета в отношении всех наиболее клинически значимых возбудителей злокачественных отеков. Разработка такой многокомпонентной вакцины подразумевает предварительное получение моно-антигенов каждого производственного штамма, обладающих высокой иммуногенностью и безвредностью для восприимчивых животных.

В связи с этим совершенствование существующих и поиск новых методов изготовления клостридиозных анатоксинов является одной из наиболее актуальных задач при разработке ассоциированных препаратов.

Учитывая, что в технологию изготовления ветеринарных препаратов против анаэробных инфекций животных не вносились изменения как минимум с 1974 г., появилось значительное количество методик, позволяющих влиять на упрощение процесса культивирования, повышение токсинообразования, а также дальнейшие технологические процессы, в частности обеззараживание, очистку и концентрирование анатоксинов.

Поэтому при начале проведения исследований, направленных на получение высокоиммуногенного препарата против клостридиозов КРС, было решено сделать ставку на изменение следующих технологических моментов:

- изготовление MSB производственных штаммов клостридий, обладающих требуемыми свойствами, такими как высокая скорость роста и интенсивное образование токсина;
- замена питательных сред на новые, доказавшие положительное влияние на токсинообразование;
- изменение параметров культивирования, с отслеживанием и поддержанием на заданном уровне таких параметров как pH среды, pO_2 , rH и другие;
- отработка методики детоксикации культуральной жидкости;
- концентрирование токсинов или анатоксинов путем ультрафильтрации на мембранных фильтрах.

4.4.1. Подбор штаммов клостридий

Основой любого иммунобиологического препарата, предназначенного для специфической профилактики инфекционных болезней, являются штаммы микроорганизмов, обладающие определенными свойствами, что позволяет применять их в производстве. Основными требованиями к производственным штаммам клостридий являются высокая токсигенность культур, стабильность образования токсинов в высоком титре при культивировании на различных питательных средах, а также способность штаммов индуцировать иммунный ответ у подопытных животных.

Изготовление MSB штаммов стало приоритетной задачей на первом этапе работы, так как приобретенные и проверенные культуры производственных штаммов клостридий в значительной степени не отвечали заложенным паспортным данным. Так штамм *C. perfringens* тип А №28 в соответствии с паспортными данными должен при культивировании в течении 4-6 часов образовывать не менее 100 Dlm/мл альфа-токсина, однако при многократном исследовании на различных питательных средах достичь такой величины токсинообразования не удавалось. Практически в таком же состоянии находились и остальные штаммы клостридий. Вместо заявленной токсичности в 100 тыс. Dlm/см³ и более при культивировании *C. tetani* удавалось получить при рекомендованных параметрах культивирования лишь 7,5-12,5 тыс. Dlm/см³, у *C. perfringens* тип С – 250 Dlm/см³ вместо 6 тыс, у *C. perfringens* тип D – 0,6 тыс. Dlm/см³ вместо 5 тыс, *C. novyi* – 100 единиц вместо 2,5 тыс Dlm/см³.

Учитывая опыт исследователей [32], доказавших, что, при постоянно осуществляемых неконтролируемых пересевах в значительной мере утрачивается способность штаммов к образованию токсинов за счет накопления в популяции нетоксигенных клонов, была проведена работа по селекционированию культур. На первом этапе селекционирования штаммы пассировали через организм морской свинки. Животных заражали активно растущими культурами внутримышечно в нескольких дозах, с целью определения минимального количества клеток, способных вызвать гибель животного. Наблюдение за подопытными животными

проводили в течение 24 – 72 ч. Все штаммы за это время успевали полностью воспроизвести картину заболевания и вызвать гибель животных с характерными признаками анаэробной инфекции. Вскрытие павших или вынужденно убитых в агональном состоянии лабораторных животных, проводили в стерильных условиях, с целью недопущения контаминации материала микрофлорой.

После гибели животных проводили посев крови сердца и паренхимы печени на среду Китта-Тароцци, при этом использовали животных, гибель которых наступала раньше, что косвенно подтверждало наибольшее количество в культуре образовавшихся токсинов. В случае роста из материала чистой культуры *C. perfringens*, что подтверждалось просмотром мазков и посевов на контрольных средах, её через 6-7 ч. роста высевали на несколько чашек с кровавым агаром и культивировали при 37 °С в течение 24-30 ч. в анаэроостате. Учитывая определенный риск потери штамма при проведении таких пассажей, для проведения работы были приобретены SPF животные – морские свинки и голуби, которые были предварительно выдержаны в карантине сроком не менее 30 суток.

Помимо производственных, были изготовлены заражающие культуры штаммов и токсины клостридий, которые были стандартизированы в сравнении с национальными и международными образцами антитоксических клостридиозных сывороток.

При селекции штамма №28 выросшие колонии просматривали и отсеивали для накопления на МППБ под вазелиновым маслом, каждую колонию отдельно. Через 6-7 часов роста при наличии интенсивного газообразования и помутнения, культуры центрифугировали, надосадок фильтровали через стерилизующие фильтр-насадки, разводили физиологическим раствором 1:10 и 1:100 и вводили внутривенно белым мышам. Наблюдение за животными осуществляли в течение 24 часов. В случае наличия в среде токсина, гибель животных происходила очень быстро, практически в течение 2-10 минут. Таким образом, из 44 отсеянных клонов культуры было отобрано 2 изолята, образовавших за одинаковый промежуток времени наибольшее количество токсина. При последующем исследовании токсичности этих культур на мышах, было установлено, что первый из них образо-

ывал за шесть часов культивирования 80 Dlm токсина в 1 см³ культуральной жидкости, а второй 104 Dlm/см³. Следует отметить, что в опыте четко было выявлено наличие диссоциации и появление слаботоксигенных и полностью утративших способность к токсинообразованию клеток штамма.

Эта же схема использовалась при проведении селекционирования остальных культур клостридий, поскольку примерно таким же оказались и результаты работы с остальными производственными штаммами: так при проверке первичных культур *C. perfringens* *mun C* токсичность составляла 250±35,60 Dlm/см³, а после отбора отдельных колоний уже 1600±956 Dlm/см³, и так далее.

В таблице 10 представлены результаты работы по отбору токсигенных клонов из основной культуры производственной расплодки.

Таблица 10 - Токсичность производственных штаммов клостридий до и после селекционирования, n = 760

№№	Наименование штамма	Время культивирования, ч.	Уровень токсина, Dlm/мл	
			До селекционирования	После проведенного отбора колоний
1	<i>C. perfringens</i> <i>mun A</i>	6-7	5±1,24	80±6,7
2	<i>C. perfringens</i> <i>mun C</i>	16-18	98±12,60	1600±956
3	<i>C. perfringens</i> <i>mun D</i>	16-18*	250±35,60	1500±178
4	<i>C. novyi</i> <i>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.

Как видно из представленных данных, благодаря проведенной селекции штаммов в значительной степени удалось восстановить токсигенные свойства культур. В последующем полученные расплодки были лиофилизированы и аттестованы в качестве MSB для возможного использования в течение длительного времени.

Для выпуска высококачественных биопрепаратов со стабильными антигенными и иммуногенными свойствами у производителя должна быть четко регламентирована работа с производственными штаммами микроорганизмов. Современный уровень развития биологической промышленности подразумевает необ-

ходимость выпуска лекарственных препаратов из стандартизированных расплодок, при этом не допускается более трех пассажей штамма, так как у него происходит потеря необходимых свойств.

Первая генерация штамма - *Master Seed Bacteria (MSB)* представляет собой культуру, выделенную из природного материала или полученную в результате генетических исследований, обладающую необходимыми заявленными свойствами. Во избежание их потери, культуру без проведения дополнительных пересевов, выращивают на питательной среде, при необходимости концентрируют, смешивают со средой высушивания в определенных пропорциях, расфасовывают в ампулы в процессе одной операции, таким образом, чтобы обеспечить однородность, стабильность и отсутствие контаминации чужеродными микроорганизмами, лиофилизируют, после чего изучают на соответствие биологическим показателям, хранят *MSB* при температуре не выше минус 80 °С. При закладке *MSB* бактерий к качеству материала предъявляют особенно жесткие требования, поскольку от выраженности его свойств зависит качество выпускаемой продукции. *MSB* предназначен для изготовления рабочих посевных материалов – *WSB*.

Working Seed Bacteria представляет собой рабочий посевной материал, полученный из *MSB* путем последовательных пересевов в питательные среды. Вторую генерацию штамма также хранят в лиофилизированном виде, однако при температуре минус 20 °С. Следующим этапом работы со штаммами является получение третьего пассажа - *Production seed*. Его готовят из рабочего посевного материала путем последовательных пересевов в жидкие питательные среды, он предназначен только для производства серии продукции. Производственные расплодки могут временно (до 3 мес) храниться при температуре 2 – 4 °С.

Изготовление и аттестация *Master Seed* производственных штаммов осуществлялось в ОБК ООО «Ветбиохим», в ходе работы были получены, проверены на соответствие паспортным данным и заложены на хранение все производственные культуры клостридий. При аттестации изготовленных расплодок культур проведено изучение морфологических, тинкториальных, культуральных свойств, а также степень вирулентности для лабораторных животных и токсигенные свой-

ства штаммов. Таким образом, для производства вакцины «Клостбовак-8» были изготовлены и аттестованы MSB *C. perfringens* тип А - № 28; *C. perfringens* тип С – «ВТ»; *C. perfringens* тип D - № 91; *C. septicum* - № 1098; *C. novyi* тип В - № 34; *C. chauvoei* R₁₅; *C. tetani* - № 8.

4.4.2. Характеристика MSB производственных штаммов клостридий

4.4.2.1. *Clostridium perfringens*

Вакцинные штаммы *C. perfringens* тип А (№ 28), тип С (ВТ), тип D (№91), представляют собой грамположительные неподвижные палочки с закругленными концами, длиной 4-8 и шириной 0,6-1,5 мкм, образующие крупные овальные центрально или субтерминально расположенные споры.

На среде Китта-Тароцци рост штамма *C. perfringens* типа А начинается уже через 3-4 ч после посева, при этом образуется равномерное помутнение с газообразованием. Штаммы других типов растут несколько медленнее, видимый рост наступает через 4-6 часов. Культуры при росте издают слабый запах масляной кислоты. На жидких питательных средах через 3-5 суток клетки оседают, среда просветляется и на дно выпадает обильный светло-серый осадок. Лакмусовое молоко свертывают бурно с образованием кислоты из-за чего образуется плотный губчатый сгусток, пептонизация которого не происходит. При росте на агаризированных средах образуют несколько вариантов колоний, одновременно присутствуют гладкие, шероховатые и, реже, слизистые колонии. На кровяном агаре вокруг колонии *C. perfringens* всех типов образуются зоны гемолиза (рисунок 15).



Рисунок 16 – Колонии *C. perfringens* штамм «ВТ» на кровяном агаре

Все штаммы очень активны в ферментативном плане, сбраживают с образованием кислоты и газа глюкозу, фруктозу, галактозу, мальтозу, лактозу, левулезу, сахарозу, разжижают желатин, не ферментируют маннит и дульцит. Образуют нитраты из нитритов. При выращивании на мозговой среде не образуют почернения осадка. Добавленные в среду Китта-Тароцци кусочки мяса краснеют под воздействием образуемых *C. perfringens* ферментов.

Штаммы патогенны для лабораторных животных, особенно морских свинок и кроликов: активно растущие культуры вызывают гибель морских свинок массой 350 – 400 г в течение 24 – 48 ч после внутримышечного введения. Обладает сильно выраженной токсичностью, образуя несколько токсинов, основным из которых является альфа, бета и эпсилон. При выращивании на средах с кислотным переваром казеина количество образуемых токсинов может достигать до 200 Dlm/мл альфа-токсина, 6000 и более Dlm/мл бета-токсина и 8000 Dlm/мл эпсилон-токсина в питательной среде. Для определения активности эпсилон-токсина его активируют панкреатином или трипсином, так как он образуется в виде про-токсина.

4.4.2.2. *Clostridium septicum*

Производственные штаммы *C. septicum* №59 и №1098 представляют собой полиморфные грамположительные подвижные палочки размером 2-10 x 0,6x0,8 мкм, расположенные обычно парами и цепочками, а на средах с кровью – в виде нитей. Споры овальные, расположены центрально или субтерминально, образуются при культивировании уже через 12 – 16 часов. Культуры являются строгими анаэробами, хотя и более толерантны к кислороду, чем *C. perfringens* (рис. 17, 18).

В среде Китта-Тароцци растут интенсивно с газообразованием, вызывая через 16-24 ч равномерное помутнение среды, затем клетки выпадают в осадок и бульон просветляется. В агаре столбиком растет в виде нежных хлопьевидных колоний диаметром 1-2 мм с уплотненным центром и радиально отходящими переплетенными нитями, а на поверхности кровяного агара с глюкозой - в виде кружевных сплетений нитей-арабесок с зоной гемолиза. Культуры ферментируют с образованием кислоты и газа глюкозу, лактозу, галактозу, мальтозу, салицин. Сахарозу не ферментируют, индол не образуют. Молоко свертывают медленно,

казеин не пептонизируют. Кусочки мяса в МППБ краснеют, почернения в мозговой среде не выражено.

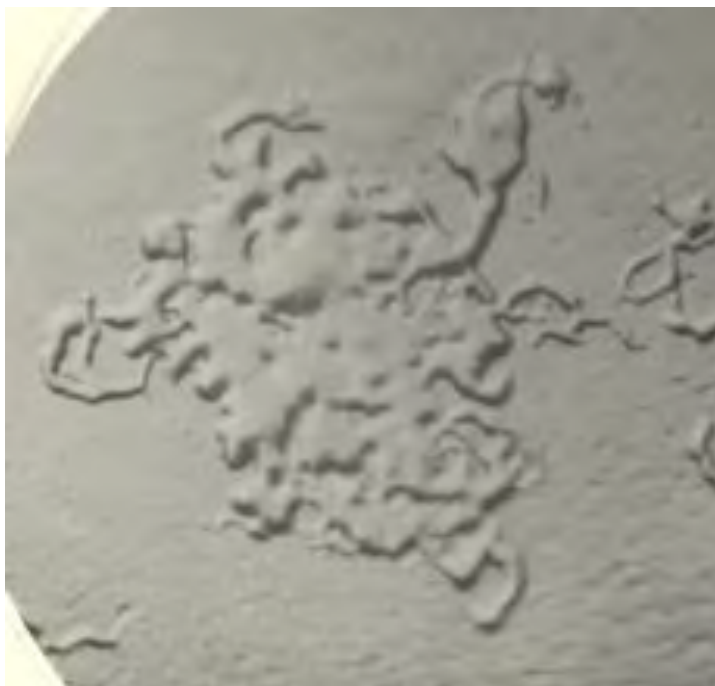


Рисунок 16 - Колония *C. septicum* № 1098

Оба штамма патогенны для лабораторных животных, особенно морских свинок, кроликов и голубей. Суточные культуры, выращенные на МППБ, вызывают гибель морских свинок массой 350 – 400 г в течение 15 – 24 ч после подкожного введения в области брюшных мышц в дозе 0,1 мл.

Токсичность культур выражена слабо, при культивировании в лабораторных условиях на жидких питательных средах образуют токсины активностью около 10-20 Dlm/мл. Однако реакторное культивирование позволяет в значительной степени увеличить выход токсинов, у штамма *C. septicum* №59 при культивировании на казеиновых средах токсичность составляла от 70 до 150 Dlm/см³, однако накопление токсинов у *C. septicum* очень нестабильно.

4.4.2.3. *Clostridium oedematiens*

Производственный штамм *C. oedematiens* (*novyi*) тип В № 34 представляет собой крупные полиморфные подвижные грамположительные палочки размером 2,5-5,0 x 0,8-1,0 мкм, расположенные в виде коротких цепочек из 3-5 клеток, спорулирование начинается достаточно быстро, овальные споры расположены субтерминально, реже центрально. Капсул не образует. В среде Китта-Тароцци

дает обильный рост с помутнением среды и слабым газообразованием. Через 48 часов бульон просветляется, на дне образуется хлопьевидный осадок. На кровяном агаре с глюкозой растет в виде шероховатых серых колоний с бахромчатыми краями и отростками, образующими на периферии колоний переплетенные нити, с зоной гемолиза. В глубине столбика агара с глюкозой колонии имеют форму чечевицы, комочков ваты, хлопьев, с желтоватым или коричневатым центром. Молоко свертывается медленно с выпадением мелких сгустков, без последующей пептонизации сгустка. Ферментирует глюкозу, фруктозу и мальтозу. Глицерин, лактозу, сахарозу, маннит и салицин не разлагает, индол не образует. Является анаэробом, но толерантен к небольшому количеству кислорода. Рост колоний *C. oedematiens* приведен на рисунке 18.



Рисунок 18 – Колония *C. oedematiens* №34

Штамм высоко токсигенен, фильтрат 36-48 часовых культур содержит до 6-20 тыс. Dlm/см³ для белых мышей массой 16 – 18 гр токсина в культуральной жидкости. Патогенен для всех лабораторных животных, суточные культуры вызывают гибель морских свинок массой 350 – 400 гр за 24 – 48 ч после подкожного введения в дозе от 0,05 – 0,1 см³.

4.4.2.4. *Clostridium chauvoei*

Штамм *C. chauvoei* R₁₅ представляет собой грамположительные подвижные палочки с закругленными концами, размером 0,4x0,6 - 2x8 мкм, расположенные одиночно или короткими цепочками. Споры расположены центрально, субтерминально или лежат свободно, форма спор овальная, капсул не образует.

Помутнение при росте в среде Китта-Тароцци наступает через 16-20 часов, газообразование сравнительно слабое. Через 24 – 48 часов роста наступает постепенное просветление среды с выпадением осадка, который при интенсивном встряхивании разбивается в равномерную взвесь.

В ферментативном плане штамм *R₁₅* слабо активен, медленно свертывает молоко, сбраживает глюкозу, фруктозу, галактозу, мальтозу, сахарозу, лактозу. Является строгим анаэробом. На кровяном агаре образует круглые колонии в виде перламутровой пуговицы или виноградного листа с зоной гемолиза (рис. 19, 20).



Рисунок 19 - Колония *C. chauvoei* в виде «виноградного листа» с четко выраженной зоной β -гемолиза

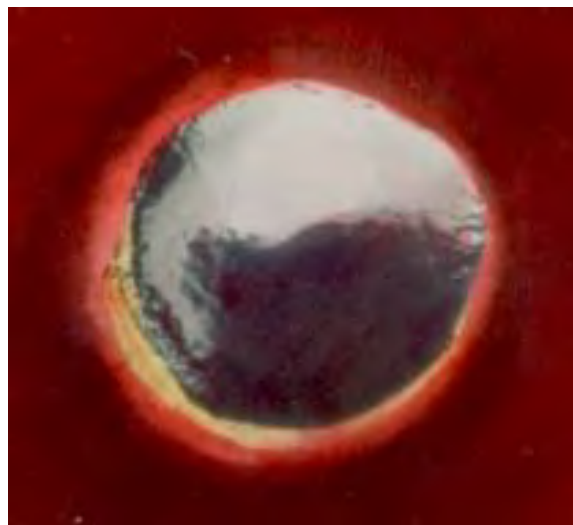


Рисунок 20 - Колония *C. chauvoei* в виде «перламутровой пуговицы»

Штамм *C. chauvoei R₁₅* патогенен для морских свинок, животные других видов к нему слабо чувствительны. Для воспроизведения инфекции следует проводить экспериментальное заражение с дополнительным введением в месте инъекции раствора хлористого кальция для местного раздражения тканей. Суточная культура штамма *C. chauvoei R₁₅* вызывает гибель морских свинок массой 350-450 г. при внутримышечном введении в дозе 0,1-0,2 см³ в течение 20-48 ч. Токсичность штамма выражена слабо, при росте на МППБ под вазелиновым маслом через 28-36 часов роста накопление составляет не более 6-10 Dlm/см³.

4.4.2.5. *Clostridium tetani*

Штамм *C. tetani* №8 представляет собой грамположительные подвижные палочки с закругленными концами размером 0,4x0,6 - 4x8 мкм, которые распола-

гаются изолированно, редко парами или в виде цепочек и нитей. Споры сферические, терминальные сильно расширяющие клетку, что придает бактериям вид барабанных палочек. Штамм является строгим анаэробом, незначительное количество растворенного кислорода значительно замедляет рост культуры.

На агаре растет в виде прозрачных или слегка сероватых колоний размером 2-5 мм с неровной зернистой поверхностью, края колоний шероховатые, ветвящиеся. Более старые колонии имеют желтоватый плотный центр и совершенно прозрачные бесцветные неровные ветвящиеся края. На кровяном агаре все колонии окружены гемолизом (см. рисунки 21, 22).



Рисунок 21 - Колония *C. tetani* Kolle №8

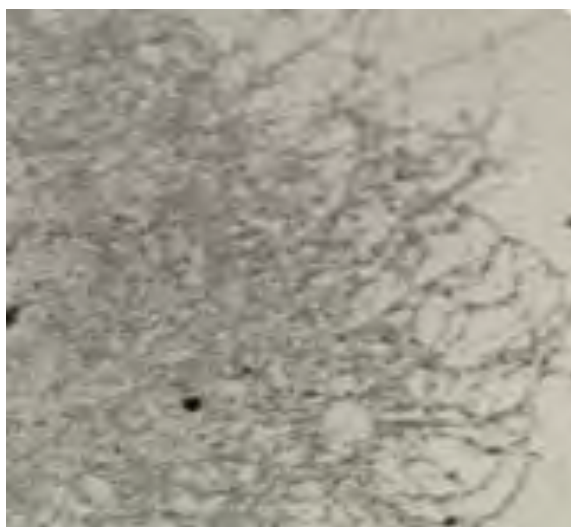


Рисунок 22 - Колония *C. tetani* Kolle №8

При посеве в конденсационную жидкость на скошенном агаре в пробирках, микроб растет в виде тонких, едва заметных нитевидных отростков, вползающих на поверхность агара. Эту особенность микроба применяют при выделении чистой культуры возбудителя.

В среде Китта-Тароцци культура штамма №8 образует помутнение со слабым газообразованием через 18 – 24 часа роста. Интенсивность роста продолжается около 6 – 8 суток, затем наступает постепенное просветление бульона. Штамм не ферментирует сахара и многоатомные спирты, однако при длительном культивировании заметно слабое закисление на средах с глюкозой. Медленно сбраживает молоко с образованием мелких хлопьев. Желатин разжижает слабо.

Культуры штамма №8 выделяет в процессе роста сильный токсин в высоких титрах, количество которого к 4-6 дню культивирования может достигать 100 тысяч Dlm/мл для белых мышей массой 16-18 гр.

4.4.2.6 *Clostridium sordellii* и технология её культивирования

На ряду с широко распространенными возбудителями злокачественного отека (*C. perfringens*, *C. oedematiens*, *C. septicum*, *C. histolyticum*), важное значение в этиологии болезни занимает *C. sordellii*. Современные данные о распространении вида и его значении в патологии у животных отсутствуют, в более ранних источниках [35, 61, 62] указано, что данный вид микроорганизмов выделяется от КРС и овец и может быть этиологическим фактором газовой гангрены, но распространенность его не изучена. Соответственно, отсутствуют данные о возможности его культивирования с целью получения антигенов для вакцин и анатоксинов.

В медицинской литературе 40-50-х годов 20 века представлены результаты бакисследований отечественных исследователей, из которых видно, что возбудитель выделяется в 7-14 % образцов, взятых от человека (таблица 11).

Таблица 11 - Видовой спектр клостридий при раневых инфекциях

Виды анаэробов	Частота выделения, %			
	Ранения конечностей	Ранения головы	Ранения позвоночника	Ранения грудной клетки
<i>C. perfringens</i>	64,8	66,3	32,5	64,8
<i>C. oedematiens</i>	12,6	5,2	16,0	14,4
<i>C. histolyticum</i>	1,2	1,3	2,5	-
<i>C. tetani</i>	6,0	3,9	-	-
<i>C. sordellii</i>	14,4	7,8	-	10,8

Хотя эти данные получены при исследовании материала от людей в военное время, но риск контаминации раневых поверхностей у животных даже выше, поэтому их вполне можно экстраполировать на сельскохозяйственных животных различных видов.

По данным зарубежных авторов, *C. sordellii* выделяется из материала от животных в случаях злокачественного отека, а также при энтеротоксемиях у овец и телят. Как правило, все выделяющиеся культуры возбудителя патогенны для ла-

бораторных животных, а также обладают способностью токсинообразования. Токсин можно выявить как в кишечном или раневом содержимом, так и в культуральной жидкости при росте культур.

Также, вероятно, незначительная изученность распространения этого микроорганизма у животных связана с отсутствием специфических диагностических сывороток и простых методов идентификации, легко воспроизводимых в бактериологических лабораториях ветеринарной службы, поэтому многие случаи заболевания, вызванные *C. sordellii*, остаются не распознанными.

В проведенных нами опытах было установлено, что *C. sordellii* достаточно часто присутствует в образцах исследуемого материала от крупного рогатого скота. В общей сложности изоляты выделены в 6,5 % исследуемого материала, поступившего из разных хозяйств. В материале от животных в отдельных хозяйствах возбудитель выделялся в 50-80 % случаев. Следует отметить, что в подавляющем большинстве случаев *C. sordellii* выделялась как самостоятельная инфекция, и реже в ассоциации при злокачественных отеках. Поэтому была проведена работа по подбору штамма *C. sordellii* для введения его в вакцину.

Полученные изоляты и музейные штаммы *C. sordellii* №3 и №44, были использованы для наработки антигенов с целью проверки их иммуногенности.

Культивирование изолятов *C. sordelli* проводили в питательных средах на основе кислотного гидролизата казеина, рекомендованных для получения максимального количества токсина. Рост культур после засева продолжался в течение 36-48 часов, критерием для его остановки являлось обнаружение в мазках спор возбудителя, что свидетельствовало о максимальном накоплении токсина.

Инактивация культур осуществлялась путем добавления формалина в концентрации 0,5 % в течение 5 суток при комнатной температуре с периодическим перемешиванием. После этого культуры центрифугировали для удаления клеток, а надосадочную жидкость исследовали на остаточную токсичность. При положительных результатах проверки, анатоксины адсорбировали на гидроксиды алюминия с последующей декантацией 70 % надосадочной жидкости. Полученные моноантигены штаммов *C. sordellii* после проверки на стерильность и безвредность,

исследовали в опытах на морских свинках с целью определения их иммуногенной активности. Для изучения иммуногенности изолятов *C. sordelli* из них, а также из имеющихся в нашем распоряжении музейных штаммов *C. sordellii* №3 и №44, были приготовлены экспериментальные моновакцины, которые представляли собой инаktivированные формалином концентрированные анатоксины, освобожденные от бактериальных клеток и адсорбированные на адьюванте.

Для опыта было сформировано семь групп морских свинок-аналогов по 10 голов в каждой. Животные шести групп были двукратно вакцинированы моновакцинами с интервалом 28 дней. Моновакцины вводили подкожно в области холки с соблюдением правил асептики в объеме 1,0 см³. Животные седьмой группы использовались в качестве контрольных.

Через 14 дней после повторной вакцинации всех морских свинок заражали предварительно подтитрованной культурой вирулентного штамма *C. sordellii* в дозе 10 Ld₅₀. Учет результатов проводили через 10 суток. Результаты опыта представлены в таблице 12.

Таблица 12 - Иммуногенная активность моновакцин из штаммов *C. sordellii*

№	Наименование штамма, из которого изготовлены моновакцины	Доза моновакцины при 2-ном введении	Количество зараженных животных	Количество павших животных	Количество выживших животных	Процент выживших животных
1.	Штамм «Рязань»	1,0	10	5	5	50
2.	Штамм «Челябинск	1,0	10	8	2	20
3.	Штамм «Липецк»	1,0	10	5	5	50
4.	Штамм «Москва»	1,0	10	9	1	10
5.	Штамм №3	1,0	10	4	6	60
6.	Штамм №44	1,0	10	5	5	20
7.	Контрольные	-	10	10	0	0

Как видно из результатов опыта, полученные моновакцины из изолятов и музейных штаммов не обеспечивали достаточного уровня иммунитета к заражению вирулентной культурой *C. sordellii*. При гибели всех морских свинок в контрольной группе, выживаемость подопытных морских свинок была различна, но

при этом не превышала 60 % (хорошим эффектом считается обеспечение выживания не менее 80 % отчисла использованных животных). Хорошие результаты получены при использовании для изготовления моноантигенов производственно-музейного штамма *C. sordellii* №3. Моновакцины из изолятов 1 и 3 обеспечивали выживание 50 % животных, показатели выживаемости в других группах были ниже. При повторном проведении опыта были использованы более концентрированные анатоксины, что достигалось декантацией при адсорбировании 80 % надосадка, однако были получены аналогичные результаты.

Проведенные опыты по изучению иммуногенной активности моновакцин из шести штаммов *C. sordellii* позволили выделить несколько культур, обладающих достаточно высоким уровнем токсинообразования. Полученные при стандартных условиях культивирования на их основе антигены не обеспечивали необходимого 80-100 % уровня защиты подопытных морских свинок от заражения вирулентным штаммом. Однако используя для специфической профилактики злокачественного отека, вызванного *C. sordellii*, антигены из отобранных культур возможно добиться необходимой эффективности путем совершенствования технологии приготовления питательных сред, методики и времени культивирования штаммов, а также концентрирования полученных анатоксинов методом ультрафильтрации белков.

Учитывая, что в составе комплексного препарата антиген дополнительно разбавлялся другими антигенами, было принято решение не включать антигены против *C. sordellii* в создаваемую вакцину и продолжить опыты по поиску и селекции высокотоксигенного изолята возбудителя.

4.4.3. Подбор питательной среды, обеспечивающей высокое стабильное накопление токсинов

Следующим этапом работы являлся подбор питательной среды для культивирования производственных штаммов, способствующей накоплению токсина в высоком титре.

Стабильное накопление высоких титров специфических экзотоксинов при глубинном культивировании является обязательным условием получения эффек-

тивных препаратов против клостридиозов. Количество продуцируемых токсинов в значительной мере зависит от качества и химического состава питательных сред. При этом путем многократных опытов доказано, что даже при росте штаммов на питательных средах, имеющих сходные биохимические показатели, такие как рН, количество пептона, триптофана, общего и аминного азота, количество образующихся токсинов может быть различным и колебаться от нуля до тысячи единиц. Поэтому отработка технологии изготовления стандартных питательных сред, стабильно обеспечивающих получение активных токсинов, является чрезвычайно важной задачей при создании новых препаратов против клостридиозов.

Для достижения нужного эффекта необходимо учитывать не только химический состав питательной среды, но и ростовые индивидуальные потребности каждого штамма. При культивировании штаммов *C. chauvoei* и *C. septicum*, используемых в дальнейшем в виде анакультур, требовались среды, позволяющие наращивать максимальное количество бактериальной массы и замедляющие спорулирование культур, а питательные среды для культивирования остальных производственных штаммов должны способствовать проявлению токсинообразования за минимальное время без потери антигенности.

Переход от нестандартных питательных сред на основе мяса и печени к средам, изготавливаемым из гидролизатов казеина, позволяет в несколько раз увеличить выпуск целевого продукта. Такие среды давно применяются при культивировании столбнячной культуры, что в значительной степени способствует накоплению токсинов. Однако культивирование других возбудителей в соответствии с принятой на отечественных биофабриках технологией получения анаэробных препаратов, проводят в жидких питательных средах, основу которых составляет перевар Хоттингера.

Для его изготовления используют фарш мяса КРС без костей, жировой клетчатки, связок и сухожилий, который переваривают химически чистыми ферментами или фаршем поджелудочной железы при заданных параметрах в течение 5-6 суток. В процессе переваривания фарш превращается в рыхлый сероватый осадок, над которым образуется слой жидкости соломенно-желтого цвета. Хими-

ческие показатели перевара стабилизируются и составляют: общий азот – 800-1000 мг%; аминный азот – 700-900 мг%; триптофан – 100-200мг%, рН - 7,6-8,0.

Для приготовления бульона Хоттингера используют только прозрачную надосадочную жидкость основного перевара, которую разводят деминерализованной водой до содержания аминного азота 250-300 мг %. Среду подогревают, добавляют 0,5 % пептона, 0,5% хлористого натрия, 0,8 % химически чистого фосфорнокислого двухзамещенного натрия и 10% воды. Кипятят в течение одного часа, охлаждают, а затем фильтруют до полной прозрачности через плотный ватно-марлевый фильтр и стерилизуют при температуре $(120 \pm 0,5)$ °С в течение 45 минут. Готовая питательная среда должна содержать аминного азота не менее 200 мг %, триптофана 50-100 мг % и иметь рН 7,8-8,0.

Помимо бульона Хоттингера в среды для анаэробов обязательно добавляют печеночный экстракт, который готовят из хорошо очищенной от плёнок и желчных ходов печени крупного рогатого скота или лошадей. Печеночный фарш заливают дистиллированной водой в отношении 1:1 и варят в течение часа, затем автоклавируют при давлении 0,5 атм в течение 30 минут. Смесь фильтруют через ватно-марлевый фильтр.

Питательная среда получается путем смешивания БХ и печеночного экстракта в определенных пропорциях с последующим автоклавированием. Используют среду сразу после получения, либо активируют перед посевом кратковременным кипячением, если срок хранения её в холодильнике более 48-72 ч.

С незначительными вариациями эта пропись питательной среды используется для культивирования всех остальных производственных штаммов клостридий (*C. perfringens*, *C. novyi/oedematiens*, *C. septicum*, *C. chauvoei*), за исключением столбнячной культуры. Для получения столбнячного анатоксина используется мясо-казеиновая среда, приготавливаемая на основе кислотного или ферментного гидролизата казеина и бульона Хоттингера.

Мясо-казеиновую среду для *C. tetani* готовят путем смешения в определенных пропорциях гидролизата казеина с переварами мяса и печени.

Для изготовления гидролизата казеина используют высококачественный казеин, который замачивают в дистиллированной воде в соотношении 1:10 на 10–12 часов для набухания, а затем выдерживают до полного растворения при 90 °С и рН 8,0–8,5. При получении ферментного гидролизата в раствор казеина добавляют 0,5 кг панкреатина с активностью 45 ед, гидролиз проводят при температуре 45 °С и уровне рН в пределах 8,5–9,0 в течение 30 минут. При кислотном гидролизе казеин расщепляют химически чистой соляной кислотой с удельным весом 1,19 ед. при температуре 120 °С в течение 1,5 часов. Гидролизат перед использованием осветляют и разводят до необходимых ростовых параметров.

Мясо-казеиновую среду для столбнячной культуры получают путем смешивания гидролизата казеина, перевара Хоттингера и печёночного экстракта. Готовая среда должна иметь следующие показатели: общий азот - 450 ± 470 мг %; аминный азот - 190 ± 225 мг %; пептон - $3,0 \pm 0,5$ мг %. Перед засевом в среду добавляют 0,5 % глюкозы.

При этом считается, что для *C. tetani* оптимальной средой для культивирования и накопления в ней тетаноспазмина в высоких титрах является мясо-казеиновая среда на основе кислотного гидролизата казеина.

Учитывая положительный опыт предшественников, нами была отработана методика изготовления анатоксинов всех видов клостридий на питательных средах на основе гидролизата казеина без добавления мясных составляющих. Состав питательной среды указан в таблице 13.

Таблица 13 - Состав питательной среды для культивирования клостридий

№№	Компоненты	Среда модифицированная	Среда регламентированная
1.	Казеин	5 г/л	5 г/л
2.	Пептон	3 %	3 %
3.	Кислота соляная	0,02 г/л	0,02 г/л
4.	Ca_2HPO_4	2,4 г/л	3,0 г/л
5.	KH_2PO_4	1,2 г/л	3,0 г/л
6.	Дрожжевой экстракт	5 %	не применяется
7	Витамины группы "В"	0,001г/л	не применяется

Дополнительно, в качестве ростовых добавок, в среду перед засевом добавляли дрожжевой экстракт и витамины группы В, что способствовало более высокому накоплению целевого продукта. Для подтверждения возможности получения большего выхода токсинов на казеиновых средах в лабораторных условиях, были проведены опыты по определению титра токсина клостридий всех используемых типов при культивировании на различных средах. Результаты представлены в таблице 14.

Таблица 14 - Титр токсинов клостридий при культивировании на различных питательных средах

№	Наименование штамма	Время культивирования, ч.	Титр токсина, Dlm/мл					
			МППБ	Среда Китта-Тароцци	Улучшенная для клостридий	Мясо-казеиновая среда ферментная	Мясо-казеиновая 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±1,34	20±2,5
6.	<i>C. tetani</i>	6 суток	17650±3805	12870±1790	1550±348	18560±2890	30660±2586	55880±3290

Представленные в таблице 14 результаты наглядно демонстрируют, что замена питательной среды при идентичных условиях культивирования позволяет в лабораторных условиях получить накопление токсинов в 2-4 раза больше в сравнении с контрольной средой, в данном случае МППБ под вазелиновым маслом.

Таким образом, было получено подтверждение, что замена мясо-печеночных сред при культивировании клостридий, на казеиновые среды с содержанием казеина не менее 5 %, позволяет более чем в два раза увеличить образование специфических токсинов.

4.4.4. Совершенствование технологии культивирования клостридий

Следующим этапом исследования была отработка технологии выращивания штаммов в ферментере, имеющая значительное количество отличий от лабораторного культивирования. Во-первых, в лабораторных условиях анаэробноз достигается наслоением масла на поверхность среды, которое в дальнейшем препятствует проникновению кислорода, во-вторых, возможно добавление дополнительных веществ и субстратов, поглощающих растворенный кислород и улучшающих рост клостридий - кусочки печени или мяса, что невозможно при производственном культивировании.

При культивировании штаммов на модифицированной среде с предварительно отработанным режимом выращивания, было достигнуто значительное улучшение токсинообразования, чем при использовавшейся ранее технологии, что положительно повлияло на активность полученных монопрепаратов.

Следующим, пожалуй, наиболее важным параметром технологии, требующим изменения, являлась необходимость изготовления моно-антигенов для клостридиозной вакцины путем очистки анатоксина от балластных веществ и его концентрирование. Стоит напомнить, что при изготовлении ветеринарных препаратов против анаэробных болезней животных в РФ вовсе не применялась очистка, а концентрирование осуществлялось путем осаждения белковых фракций гелем гидроокиси алюминия. Из-за этого препарат получался интенсивно желто-коричневого цвета, поскольку вместе с токсинами концентрировались содержащиеся в питательной среде балластные вещества. Такая методика позволяла сконцентрировать анатоксины не более чем в 3-4 раза, чего явно было недостаточно для образования у животных иммунного ответа высокой напряженности. Особенно сильно это проявлялось при создании ассоциированных препаратов, поскольку каждый антиген дополнительно разводился другими, входящими в её состав. В этой связи препараты были достаточно реактогенны, продолжительность иммунитета у овец, привитых вакциной против брадзота, анаэробной энтеротоксемии, злокачественного отека и дизентерии не превышала 4-6 мес.

Поскольку при изучении современной этиологической структуры клостридиозов было выявлено и идентифицировано значительное количество токсигенных культур возбудителей, была проведена работа по сравнению иммуногенных свойств различных штаммов с целью возможной замены ранее используемых производственных культур. Для изготовления экспериментальной вакцины изучались как вновь выделенные штаммы возбудителей, так и культуры производственных штаммов, ранее использовавшиеся при производстве биопрепаратов.

Моно-антигены из отобранных для изучения штаммов готовили путем выращивания в модифицированной среде на основе казеиновых гидролизатов. Время культивирования для каждого вида клостридий подбирали индивидуально. После прекращения роста и достижения максимально возможного в лабораторных условиях накопления бактериальной массы возбудителей, отбирали пробы для проверки токсичности культуры, а штамм инаktivировали дробным добавлением формалина до конечной концентрации 0,6-0,7 %. Инаktivированную культуру центрифугировали для осаждения клеток при 5-6 тыс об/мин в течение 30 минут, осадок утилизировали, а содержащиеся в супернатанте токсины концентрировали ультрафильтрацией до 10-15 % от первоначального объема с последующей диафильтрацией.

Способность каждого антигена индуцировать образование специфических антител к возбудителям проверяли путем вакцинации лабораторных животных. Антигены при этом вводили подкожно в дозе 1 мл двукратно с интервалом между инъекциями 25-28 сут. Через 14 сут после повторной инъекции у животных брали кровь и проверяли наличие титров антител в сыворотке.

Результаты исследования представлены в таблице 15.

Таблица 15 - Иммуногенная активность моновакцин

№	Наименование возбудителя	Номер штамма, из которого изготовлена моновакцина	Количество выживших животных*	Процент выживших животных	Токсичность штамма
1	<i>C. perfringens</i> <i>mun A</i>	914/8	2/10	20	6±1
		«Ч-14»	3/10	30	41±12
		28	10/10	100	156±19
		Контроль	0/10	0	
2	<i>C. perfringens</i> <i>mun C</i>	Трудовой	10/10	100	3650±286
		№3	10/10	100	6580±590
		ВТ	10/10	100	5690±586
		Контроль	0/10	0	
3	<i>C. perfringens</i> <i>mun D</i>	Ставрополь	7/10	70	1400±268
		91	10/10	100	3560±420
		213	8/10	80	2100±140
		Контроль	0/10	0	
4	<i>C. novyi</i>	Киров -2/6	0/10	0	
		Орел-1	4/10	40	220±15
		34	8/10	80	1680±124
		Контроль	0/10	0	
5	<i>C. tetani</i>	8	10/10	10	87090±12600
		154	10/10	100	67700±5880
		ОЗМ-1	2/10	20	20750±2550
		Контроль	0/10	0	

*Числитель – выживших после заражения; знаменатель – использованных в опыте.

Как видно из результатов опытов, иммуногенность штаммов одного вида колебалась весьма значительно, хотя приготовление анатоксинов проводили по одной технологии. Наиболее вероятной причиной такого явления можно считать различное количество токсина, образуемого культурами при выращивании. Токсичность колебалась достаточно сильно, так, например у культур *C. perfringens* тип D у штамма №91 составила 3560±420 Dlm, а у штамма 213 - 1400±268 Dlm, что меньше в 2,3 раза.

Несмотря на то, что в работе были использованы свежие, только выделенные из патологического материала микроорганизмы, не было выявлено культур, которые по токсичности и иммуногенным свойствам были лучше используемых ранее и подвергнутых селекции производственных штаммов.

При лабораторном способе культивирования, штамм *C. perfringens* тип A №28 позволил получать культуры с активностью α-токсина не менее 156 Dlm/мл культуральной жидкости, тогда как наиболее активные изоляты показывали лишь

41 Dlm/мл у штамма Ч-14 и 6 Dlm/мл у штамма 914/8. Соответственно это отразилось и на иммуногенности, что выражалось в 100 % выживании морских свинок, вакцинированных моно-вакциной из штамма 28, тогда как в группе вакцинированных штаммом 914/8 лишь 20%.

Поэтому, в конечном итоге, для работы (отработка технологии культивирования, получения контрольных споровых культур и токсинов), были использованы обладающие высокой токсигенностью и иммуногенностью штаммы клостридий, ранее уже используемые для производства. Штаммы были депонированные в коллекции микроорганизмов ФГБУ «ВГНКИ»: *C. perfringens* тип А - № 28; *C. perfringens* тип В - № 1; *C. perfringens* тип С – «ВТ»; *C. perfringens* тип D - № 91; *C. septicum* - № 59; *C. novyi* тип В - № 34; *C. chauvoei* R₁₅; *C. tetani* - № 8, в дальнейшем, на их основе, изготовлены производственные раскладки MS и WS.

4.4.5. Технология культивирования штаммов

Для изготовления каждой новой серии полуфабриката использовали новую ампулу производственного штамма. Ресуспендирование содержимого ампулы производили в ламинарном боксе, обеспечивающем асептические условия. Лиофилизат растворяли внесением стерильного физраствора или среды, на которой проводили культивирование.

Первую генерацию штаммов получали в пробирках со средой Китта-Тароцци или МППБ, из которых проводили пересев через 24 – 48 часов в зависимости от выраженности роста культуры.

Вторая генерация штаммов осуществлялась во флаконах с той же средой. Дополнительно проводили высевы на контрольные среды (МПБ, МПА и Сабуро) для исключения наличия контаминации посторонней микрофлорой.

Третья генерация штаммов осуществлялась в бутылках по 20,0 дм³ с МППБ, куда раскладку штамма засевали с флаконов в соотношении 1:10.

При получении экспериментальных серий моно-анатоксинов использовали культуры, выросшие на бутылках в количестве, достаточном для проведения опыта. При получении промышленных серий проводили засев ферментеров, запол-

ненных аналогичной питательной средой, приготовленной непосредственно перед работой и охлажденной до 40 °С. Культивирование штаммов клостридий для получения моно-антигенов вакцины проводили в реакторах.

Культивирование производили при определенных параметрах, несколько отличающихся для каждого штамма, которые регламентированы технической документацией. В процессе роста в ферментерах контролировали температуру, уровень водородных ионов, обороты мешалки, наличие посторонней микрофлоры.

Особое значение уделялось контролю токсичности культур, что осуществлялось путем отбора проб из ферментера с интервалом 60 минут начиная с 3-го часа культивирования. Из полученных образцов культуральной жидкости готовили двукратное и десятикратное разведение и вводили внутривенно белым беспородным мышам массой 16 – 18 г. Учет гибели проводили в течение одного-двух часов. При наличии токсина в высоких титрах гибель животных происходила в течение нескольких минут.

В случае, если засев культуры не был проведен в день приготовления среды, а также для улучшения роста строгих анаэробов, осуществляли удаление из ферментеров остаточного кислорода, пропуская через среду очищенный азот или бескислородную смесь газов. Объем пропускаемой газовой смеси составлял 1-3 л/мин на 400-450 л среды, при этом смесь должна свободно проходить через среду и выходить наружу через клапан. При барбатировании целесообразно не допускать вспенивания среды.

Засев штаммов в ферментер осуществляли через засевной патрубок с соблюдением правил асептики. При засеве реакторов со свежеприготовленной и остывшей до 40-41 °С средой, культуру подавали в сосуд за счет образовавшегося при остывании среды вакуума либо перекачивали культуру перистальтическими насосами.

Перед засевом реактора, а также сразу после внесения культуры, из него отбирали пробы питательной среды для посевов в МПБ, МПА и среду Китта-Тароцци, для выявления возможной контаминации.

Рост культур контролировали визуально через смотровое окошко, а также путем отбора и микроскопии проб, которые берут с интервалом 1 – 1,5 ч в зависимости от выраженности роста штаммов. Концентрацию микробных клеток в культуре определяют согласно оптическому стандарту мутности или по показаниям нефелометра с последующим пересчетом.

Штаммы *C. perfringens* типов А, С, D выращивали на казеиново-панкреотической среде с содержанием аминного азота около 140 – 150 мг% и pH 7,5-8,0. Питательную среду перед засевом подогревали до температуры 37 – 39 °С, непосредственно перед культивированием в среду вносили 0,5 % глюкозы и витаминно-ростовые добавки.

Культивирование штаммов проводили при 37 °С: тип А - 4 - 6 ч.; тип С – 8-12 ч., тип D – в течение 16-18 часов.

Поскольку одним из признаков наличия в культуральной жидкости токсинов в высоком титре является появление спор в клетках, процесс останавливают, как только замечали в окрашенных мазках их появление. Однако в разработанной нами технологии наличие спор в культуре не имело значения, так как культуральная жидкость помимо инактивации подвергалась стерилизующей фильтрации. Поэтому наличие спор не являлось критерием остановки роста, напротив, учитывая имеющиеся литературные данные, в это время применяли дополнительную подкормку культуры глюкозой и внесение свежей питательной среды. Это позволяло добиться увеличения образования количества микробных клеток, что положительно отражалось на токсинообразовании.

Токсичность культуры определяли путем внутривенного введения разведений культуральной жидкости 1:10, 1:20, 1:50, 1:100, 1:150, 1:200 и так далее до 1:3200 белым мышам по 0,5 см³. На каждое разведение использовали по 2 мыши. Срок наблюдения за животными устанавливали 24 часа. Если гибель мышей наблюдали после заражения токсином в разведении 1:50, а от разведения 1:100 мыши остались живы, значит содержание токсина в культуральной жидкости составляло 100 Dlm в см³ и т.д.

В результате проделанного опыта установлено, что токсичность культуральной жидкости *C. perfringens* тип А №28 составляла 120 Dlm/см³, культуральной жидкости *C. perfringens* тип С «ВТ» - 6500 Dlm/см³, *C. perfringens* типа D – 3500 Dlm/см³, после активирования её раствором трипсина.

По сходной схеме проводили культивирование *C. novyi*. Штамм *C. novyi* №34 выращивали на казеиновой среде на основе кислотного гидролизата, приготовленной по рецепту для *C. tetani*. Засев культуры проводили в глубину питательной среды, из расчета 4 литра активно растущей культуры на 100 литров среды. Перед этим в среду добавляли стерильный раствор 40 – 50% глюкозы до 0,5% в пересчете на сухое вещество. Культуру выращивали при 37 °С в течение 18 – 30 часов. В процессе культивирования поддерживали pH на уровне 7,2 ед, перемешивание культуры достигалось пропусканием через питательную среду бескислородной газовой смеси.

После прекращения культивирования отбирали пробы для определения чистоты роста и общей токсичности. Для этого фильтрат культуральной жидкости *C. novyi* разводили 1:10 и вводили внутривенно белым мышам массой 16 – 18 гр. в дозе 0,5 см³. Гибель животных происходила в течение 1,5 - 3 часов. Степень токсичности определяли вводя белым мышам внутривенно разведения культуры 1:100, 1:300, 1:500, 1:1000 и так далее до предполагаемого титра по 0,5 см³. Срок наблюдения 72 часа. Токсичность культуральной жидкости до инактивации соответствовала 6500 Dlm/см³.

Готовый полуфабрикат должен быть стерильным, безвредным, pH - в пределах 7,0 – 7,2. Стерильный и безопасный для лабораторных животных антиген *C. novyi* помещали в холодильную камеру и хранили до момента составления серии вакцины при 2-6 °С.

Изготовление компонента анатоксина *C. tetani*. Для изготовления столбнячного анатоксина культуру *C. tetani* выращивали глубинным методом в казеиновой среде на основе кислотного гидролизата казеина. Штамм предварительно освежали в МППБ с pH 7,5-8,0, а затем засевали в бутылки с казеиновой средой, содержащей не менее 3/4 от объёма бутылки. Перед посевом в среду добавляют 0,5%

глюкозы, температура среды составляла 38 ± 1 °С. Объем вносимого при засеве посевного материала должен составлять примерно 40-50 мл (5%) культуры на один литр среды.

Культивирование проводили в течение 24-30 ч. при температуре 34 °С. После этого проверяли культуру на чистоту роста путем микроскопии мазков, и посевом на контрольные питательные среды. При наличии типичной морфологии и отсутствии роста в контролях, проводили засев ферментера.

В реакторе культуру *C. tetani* выращивали в течение 6-8 сут при температуре 34–35 °С. Культивирование при пониженной температуре не влияет на рост и токсинообразование, однако снижается разрушение образовавшегося токсина находящимися в среде протеолитическими ферментами.

Рост возбудителя останавливали путем добавления формальдегида, предварительно отобрав пробы для определения токсичности и антигенности полученной культуральной жидкости. Токсичность полученного фильтрата проверяли на белых мышах массой 16–18 г. Фильтрат разводили физраствором, не допуская при работе попадания в жидкости пузырьков воздуха, и вводили мышам подкожно в корень хвоста. На каждое разведение использовали 2 мыши. Минимальный титр токсина должен быть не менее 1:40000 (80000 Dlm/мл). Определение токсичности проводили сразу после фильтрации.

Формалин добавляли в количестве 0,2-0,3 % от объема. Так достигалась плавная инаktivация белковых структур, что положительно отражалось на антигенности полученного целевого продукта.

После частичной детоксикации проводили сепарирование полученной культуры, после чего надосадочную жидкость фильтровали через стерилизующие пластины, а бакмассу *C. tetani* обеззараживали и утилизировали.

Следующим этапом проводили полное обезвреживание токсина, для чего дополнительно добавляли 0,3% формалина с активностью не менее 37%, предварительно установив рН в пределах 7,0–7,2. Формалин добавляли дробно, разведя его физиологическим раствором в соотношении 1:1, и тщательно перемешивали.

Инактивацию проводили в течение 10-12 суток при температуре 37 ± 1 °C с ежедневным трехкратным перемешиванием.

После завершения процесса контролировали наличие остаточной токсичности и стерильности. В случае наличия роста столбнячной культуры проводят дополнительную фильтрацию. Остаточную токсичность проверяют путём внутривенного введения двум белым мышам инаktivированного токсина в дозе 0,5 мл. Если белые мыши гибнут в течение 6 суток, добавляют еще 0,1% формалина и продолжают инаktivацию ещё на 5 суток. С целью проверки стерильности фильтрат токсина засеивали в два флакона среды Китта-Тароцци под вазелиновым маслом и на две пробирки с МПА и МПБ.

На этом этапе классическая технология подразумевает осаждение полученного анатоксина алюмокалиевыми квасцами, с частичным концентрированием путем декантации надосадка в количестве 60-70 %. Такая технология была неприемлема для получения анатоксина с целью создания нового комплексного анаэробного препарата. Во-первых, требовалась замена квасцов на гидроокись алюминия, во-вторых, требовалась дополнительная очистка анатоксина от балластных веществ и питательной среды, поскольку выпускаемый анатоксин обладал высокой реактогенностью. Поэтому очистка супернатанта и концентрирование частично инаktivированных анатоксинов осуществлялась путем фильтрации, а затем ультрафильтрации культуральной жидкости.

Стерилизующая фильтрация культуральной жидкости осуществлялась при передавливании инаktivированной культуральной жидкости из одного ферментера в другой подачей сжатого воздуха через стерилизующие пластины с размером пор 0,45 и 0,22 мкм последовательно под давлением $(0,05 \pm 0,01)$ Мпа. Пробу нативного токсина на этом этапе проверяли по физическим свойствам, стерильности, активности и антигенности. Антигенность при этом должна быть не менее 18 L+/мл, активность - 100000 Dlm /мл.

Концентрирование очищенного анатоксина осуществляли ультрафильтрацией. Для этого на вход ультрафильтрационной установки устанавливали бутылку с очищенным анатоксином, в него помещали шланг возврата и перистальтиче-

ским насосом подавали на установку. Ультрафильтрация проводилась при давлении 0,05+0,01 МПа. Перед окончанием процесса установку промывали несколькими литрами стерильного фосфатно-буферного раствора, внося его в емкость с концентрированным анатоксином. После завершения процесса установку промывают путем пропускания через неё 10 -12 литров фосфатно-буферного раствора, а затем 5-6 л 1 % раствора едкого натрия для консервации.

Полученные таким образом анатоксины *C. perfringens*, *C. oedematiens* и *C. tetani* хранят при температуре 4 ± 1 °С до компоновки серии препарата.

4.4.6. Инактивация культур и токсинов клостридий

Также были внесены изменения в процесс инактивации культур и образовавшихся токсинов. Существующая технология инактивации клостридий предусматривает однократное единовременное добавление высоких доз формалина от 0,7 до 1,0 % от объема по действующему веществу. Такое количество добавляется с целью обезвреживания споровых форм возбудителей, которые оставались в составе препарата. Однако, это в значительной степени сказывается на иммуногенности препаратов, поскольку происходит грубая денатурация белков и значительная потеря антигенной активности.

С целью максимального сохранения количества и качества полученных токсинов, мы отработали технологию инактивации с уменьшением формалина, при этом в реактор к полученной бактериальной массе добавляли формалин в количестве 0,2-0,3 % к объему. Обезвреживание проводили в течение 24-48 часов, после чего приступали к обработке частично обезвреженной культуральной жидкости.

Схема имеет ряд преимуществ, так как позволяет предотвратить потери антигенных свойств токсина, которые в значительной мере снижаются при контакте нативного токсина с кислородом, и в дальнейшем значительно повысить иммуногенность анатоксинов, поскольку при постепенном обезвреживании токсинов сохраняется их антигенная структура. Через 48 - 52 ч предварительной инактивации, культуру центрифугировали, полученную бактериальную массу утилизировали автоклавированием, а в очищенный от бактериальных клеток супернатант, содер-

жащий частично обезвреженный токсин, дополнительно вносили формалин для инактивации в конечной концентрации 0,3 %. Инактивацию супернатанта проводили в течение 4 суток, после чего фильтровали его через стерилизующие фильтры и подвергали проверке на остаточную токсичность на белых мышах путем внутривенного введения в объеме 0,5 см³. При выживании всех подопытных животных приступали к концентрированию полученного анатоксина. В случае гибели хотя бы одной мыши, инактивацию продолжали в течении еще 2-3 дней, после чего опыт повторяли.

Учитывая значительное количество штаммов клостридий, имеющих определенные индивидуальные ростовые свойства, схему корректировали для каждого штамма. Для получения анатоксина *C. perfringens* тип D проводили предварительное активирование, поскольку образуемый штаммом токсин находился первоначально в неактивном состоянии. Для этого через 8-10 ч культивирования, в среду добавляли стерильный раствор трипсина с активностью не ниже 200 единиц из расчета 1:10. Активацию культуры *C. perfringens* тип D проводили без удаления бактериальной массы. Смесь тщательно перемешивали и выдерживали при температуре + 40 °С в течение 2 - 4 ч, при этом в среде устанавливали и поддерживали рН на уровне 8,0-8,2 единиц. Затем проводили отбор проб материала для проверки общей токсичности полученного эпсилон-токсина, а культуральную жидкость инактивировали формалином.

В случае высокой токсичности антигенов, концентрирование фильтрацией не проводили, антиген осаждали гелем гидроокиси алюминия, для чего в реактор вносили его 3%-ный раствор в количестве 16 – 18 % к объёму культуральной жидкости. Смесь тщательно перемешивали и оставляли при комнатной температуре на 5 суток до полного просветления надосадочной жидкости.

После просветления надосадочной жидкости, что свидетельствовало о сорбции анатоксина, 75-80 % её декантировали с таким расчетом, чтобы в 1 см³ анатоксина содержалось бы не менее 50 ЕС эпсилон–токсина.

Также установлено, что кроме концентрации формалина и времени воздействия, важное значение на процесс оказывают температура и рН среды, поэтому

нами были отработаны эти параметры при получении полуфабрикатов. Было установлено, что процесс инактивации сильно варьирует при воздействии различных температур. Так при 37 °С токсины полностью инактивировались в течение 56-72 часов. Однако такой процесс очень сильно отражался на антигенных, а соответственно и иммуногенных свойствах полученного продукта. При 37 °С потеря антигенной активности составляла не менее 50 %. В другом опыте, при инактивации токсинсодержащей жидкости при температуре 10-12 °С, установлено, что антигенная активность сохраняется практически полностью, однако инактивация токсина растягивается на неопределенное время, вплоть до 21 дня (далее наблюдение на осуществляли), что было не приемлемо с технологической точки зрения.

Оптимальной для инактивации токсинов является температура 20-22 °С, при которой уже через 4-6 дней в зависимости от вида возбудителя происходи полная потеря активности токсинов, а антигенная активнсоть снижается незначительно.

Полученные полуфабрикаты трех типов анатоксинов *C. perfringens* проверяли на стерильность и остаточную токсичность, для чего антигены, предварительно разведенный физиологическим раствором 1/1, вводили белым мышам. В случае отсутствия гибели подопытных животных при подкожном введении 0,5 см³ антигена в течение 10 суток, антиген помещали в холодильную камеру и хранили до составления серии вакцины при 2-6 °С.

4.4.6.1 Культивирование производственных штаммов *C. chauvoei* и *C. septicum*.

Культуры штаммов *C. chauvoei* R₁₅ и *C. septicum* №59 культивировали на одинаковых по составу средах, так как из-за отсутствия стабильности образования токсинов среда должна была способствовать накоплению значительного количества бактериальной массы возбудителей. Культуры выращивали на мясо-печеночной среде с добавлением 3 % гидролизата казеина. Содержание аминного азота 140 – 150 мг%. Среду перед засевом подогревали до 37–39 °С, непосредственно перед культивированием в неё добавляли 0,2% глюкозы.

Засев осуществляли из расчёта 8-9 литров активно растущей культуры на 100 литров среды. Культуру выращивали до времени прекращения газообразова-

ния и опадания пены и появления в мазках спор, в среднем процедура занимает около 16 -20 часов у *C. septicum* и 28-36 часов у *C. chauvoei* и накопления в реакторе не менее 6 млрд. микробных клеток штамма в 1 см³.

В процессе культивирования проводили отбор проб для проверки чистоты роста, морфологии и концентрации микробных клеток, спорообразования, отсутствия посторонней микрофлоры.

Культуру инактивировали дробно, добавляя формалин с содержанием не менее 37% активного формальдегида, вначале 0,3 % к объему, а через 24 часа еще 0,3 %. Инактивацию проводили при 38 – 39 °С в течение 5 суток с ежедневным перемешиванием, затем центрифугировали, концентрацию бактериальной массы устанавливали 100 млрд. микробных клеток/см³, рН - в пределах 7,0 – 7,2.

Полученный полуфабрикат проверяли на стерильность и безвредность, для чего антиген, предварительно разведенный физиологическим раствором до концентрации 10 млрд. мкр. кл. /см³, вводили подкожно белым мышам в объеме 0,5 см³. Проведенные опыты показали, приготовленный таким образом антиген не вызывает гибели животных, а также проявления серьезных системных и местных реакций в течение 10 дней после инъекции. Стерильный и безопасный для лабораторных животных антиген *C. septicum* помещали в холодильную камеру и хранили до момента составления серии вакцины при 2-6 °С.

4.4.7 Определение эффективной дозы каждого компонента

Таким образом, были приготовлены антигены восьми производственных штаммов клостридий, из которых *C. chauvoei* в виде анакультуры, *C. septicum* в виде бактерий-токсоида, и пять анатоксинов – альфа-, бета- и эпсилон анатоксины *C. perfringens*, анатоксины *C. novyi* и *C. tetani*. Все моноантигены были стерильными и безопасными при введении лабораторным животным.

Для компоновки серии препарата необходимо было определить эффективное количество каждого компонента, а также их соотношение в препарате, и изучить отсутствие отрицательного воздействия друг на друга.

Определение эффективной дозы проводили на лабораторных животных, при этом для изучения иммуногенности анатоксинов использовали кроликов, для компонента *C. chauvoei* - морских свинок и белый мышей для *C. septicum*.

Для проведения опытов формировали несколько групп из 6 животных, которых двукратно иммунизировали моно-препаратами в различных дозах.

Активность монопрепаратов, изготовленных в виде анатоксинов, проверяли путем иммунизации кроликов различными дозами антигенов, после чего объединенную пробу сыворотки использовали для постановки РН на белых мышах. Результаты опытов представлены в таблице 16.

Таблица 16 - Определение минимальной иммунизирующей дозы анатоксинов

№№	Наименование испытуемого 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. oedematiens</i>	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 указано количество выживших животных, в знаменателе количество использованных в опыте.

Как видно из представленных в табл. №16 данных, активность анатоксинов различалась достаточно сильно. Полученные из культуральной жидкости анатоксины *C. perfringens* тип С и *C. oedematiens*, имевшие высокую степень накопления токсинов (не менее 4000 и 6000 соответственно), показали иммуногенную активность в дозе 0,025 мл.

Наиболее высокая доза была у антигенов, полученных из культуральной жидкости *C. perfringens* тип А. Производственный штамм этого типа обладает незначительной токсичностью и даже при полном соблюдении параметров культивирования позволяет получить не более 100 летальных доз токсина в 1 мл культуральной жидкости.

При оценке иммуногенности монопрепаратов из антигенов *C. chauvoei* и *C. septicum* использовали морских свинок и белых мышей, которых через определенное время после двукратной иммунизации заражали предварительно подтированными дозами вирулентных культур возбудителей. Результаты опыта отражены в таблице 17.

Таблица 17 - Определение эффективной иммунизирующей дозы анакультур

№	Наименование испытуемого 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/токсоид)	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 указано количество выживших животных, в знаменателе количество использованных в опыте.

Как видно из представленных в табл. №17 данных, активность бактериона *C. chauvoei* при двукратном введении антигена в дозе 0,025 мл позволяла обеспечить выживаемость не менее 50 % подопытных морских свинок при 100 % гибели животных в контрольной группе.

Что касается компонента *C. septicum*, то опыт был проведен в нескольких вариациях. Учитывая, что в отечественных препаратах этот компонент находится в виде бактериона, так как культивирование штамма на мясо-печеночных средах не способствует накоплению токсина, было изготовлено несколько образцов: первый в виде бактериона, второй компонент в виде токсоида, полученного путем сорбции анатоксина гидроокисью алюминия, и третий вариант в виде бактерион/токсоида, где сочеталось наличие анатоксина с клетками культуры *C. septicum* в концентрации 4 млрд./мл. Несмотря на селекцию штаммов и замену питательных сред, не удалось добиться высокой токсичности ни у одной из культур *C. septicum*.

Все три варианта индуцировали у животных выраженный иммунитет, однако наиболее перспективным является вариант препарата в виде бакте-

рин/токсоида, обеспечивающий 80-100 % защиту белых мышей, вакцинированных препаратом в объеме от 0,1 мл и выше, тогда как другие индуцировали необходимый уровень защиты только от 0,25 и 0,5 мл соответственно. Неудачные опыты по изготовлению токсоида *C. septicum* объяснялись, в первую очередь, низким накоплением токсина в культуральной жидкости. Конечно, можно было бы добиться эффективности за счет большего концентрирования ультрафильтрацией, но в таком случае материальные затраты были бы высоки, а количество полученного анатоксина незначительным, что приводило бы к значительному увеличению стоимости препарата.

Таким образом было установлено, что эффективным количеством антигенов является 0,1 мл для *C. septicum*, 0,05 мл для *C. chauvoei*, *C. perfringens* тип А – 0,2 мл, *C. perfringens* тип D – 0,05 мл, *C. perfringens* тип С – 0,25 мл, *C. oedematiens* – 0,1 мл, *C. tetani* – 0,0125 мл.

Определение оптимальной дозы антигена *C. chauvoei*, обеспечивающей выживаемость 80-100 % иммунизированных животных.

Проведенные опыты позволили установить объем антигена, способного вызвать стойкое состояние невосприимчивости к болезни. Однако для дальнейшей работы требовалось установить дозу антигена, обеспечивающую выживаемость 80-100 % иммунизированных морских свинок при двукратном введении, выраженную в количестве микробных клеток. Такие данные в литературе отсутствовали, поскольку применяемые отечественные препараты против эмфизематозного карбункула применяются однократно. Результаты опыта отражены в таблице 18.

Таблица 18 - Определение иммунизирующей дозы штамма *C. chauvoei* - R₁₅

№№	Дозы штамма R ₁₅ , кол-во м.кл.	Дата вакцинации	Дата заражения (споровая культура R ₁₅ в дозе 20 Ld ₅₀ .)	Кол-во животных в группе	Кол-во павших животных	Кол-во выживших животных
1.	100,0 млрд. мкр. кл	11.05.2009 24.06.2009 01.08.2009	02.06.2009 14.07.2009 22.08.2009	4 4 4	4 4 4	0 0 0
2.	500,0 млрд. мкр. кл	11.05.2009 24.06.2009 01.08.2009	02.06.2009 14.07.2009 22.08.2009	4 4 4	4 4 4	0 0 0
3.	1,0 млрд. мкр. кл	11.05.2009 24.06.2009 01.08.2009	02.06.2009 14.07.2009 22.08.2009	4 4 4	3 4 3	1 0 1
4.	1,5 млрд. мкр. кл	11.05.2009 24.06.2009 01.08.2009	02.06.2009 14.07.2009 22.08.2009	4 4 4	3 0 2	1 4 2
5.	2,0 млрд. мкр. кл	11.05.2009 24.06.2009 01.08.2009	02.06.2009 14.07.2009 22.08.2009	4 4 4	1 2 1	3 2 3
6.	2,5 млрд. мкр. кл	11.05.2009 24.06.2009 01.08.2009	02.06.2009 14.07.2009 22.08.2009	4 4 4	0 0 0	4 4 4
7.	3,0 млрд. мкр. кл	11.05.2009 24.06.2009 01.08.2009	02.06.2009 14.07.2009 22.08.2009	4 4 4	0 0 0	4 4 4
8.	3,5 млрд. мкр. кл	11.05.2009 24.06.2009 01.08.2009	02.06.2009 14.07.2009 22.08.2009	4 4 4	0 0 0	4 4 4
9.	4,0 млрд. мкр. кл	11.05.2009 24.06.2009 01.08.2009	02.06.2009 14.07.2009 22.08.2009	4 4 4	0 0 0	4 4 4

Иммунизацию морских свинок проводили согласно рекомендованной схеме однократно различным количеством антигена штамма *C. chauvoei* R₁₅, бактериальную массу вводили подкожно в области брюшных мышц. Заражение подопытных животных проводили через 20 дней путем внутримышечного введения предварительно подтитрованной споровой культуры штамма R₁₅ в дозе 20 Ld₅₀.

Из представленных в таблице 18 данных видно, что после заражения выживают морские свинки, вакцинированные дозами 2,0 млрд.мкр.кл и выше. Опыт был повторен трехкратно. Таким образом установлено, что 2,5 млрд.мкр.клеток является оптимальной эффективной иммунизирующей дозой.

Определение оптимальной дозы антигена *C. septicum*, обеспечивающей выживаемость 80-100 % иммунизированных животных.

С целью определения оптимальной дозы антигена *C. septicum*, позволяющей индуцировать иммунитет достаточной напряженности, нами проведены опыты по определению иммунизирующей дозы вакцинных штаммов *C. septicum*. Для этого было сформировано несколько групп белых мышей –аналогов, по 10 животных в группе, которых вакцинировали проверяемыми антигенами в различных дозах. Результаты отражены в таблице №19.

Таблица 19 - Определение иммунизирующей дозы штамма *C. septicum*

№№	Дозы штамма, кол-во м.кл.	Дата вакцинации	Дата заражения (культура 1098 в дозе 5 Ld ₅₀ .	Кол-во животных в группе	Кол-во животных, павших	Кол-во животных, выживших
1	2	3	4	5	6	7
1.	100,0 млрд. мкр. кл	11.05.2009 24.06.2009 01.08.2009	02.06.2009 14.07.2009 22.08.2009	10 10 10	10 10 10	0 0 0
2.	500,0 млрд. мкр. кл	11.05.2009 24.06.2009 01.08.2009	02.06.2009 14.07.2009 22.08.2009	10 10 10	10 10 10	0 0 0
3.	1,0 млрд. мкр. кл	11.05.2009 24.06.2009 01.08.2009	02.06.2009 14.07.2009 22.08.2009	10 10 10	4 4 7	6 6 3
4.	1,5 млрд. мкр. кл	11.05.2009 24.06.2009 01.08.2009	02.06.2009 14.07.2009 22.08.2009	10 10 10	3 6 2	7 4 8
5.	2,0 млрд. мкр. кл	11.05.2009 24.06.2009 01.08.2009	02.06.2009 14.07.2009 22.08.2009	10 10 10	1 0 0	9 10 10
6.	2,5 млрд. мкр. кл	11.05.2009 24.06.2009 01.08.2009	02.06.2009 14.07.2009 22.08.2009	10 10 10	0 0 0	10 10 10

1	2	3	4	5	6	7
7.	3,0 млрд. мкр. кл	11.05.2009	02.06.2009	10	0	10
		24.06.2009	14.07.2009	10	0	10
		01.08.2009	22.08.2009	10	0	10
8.	3,5 млрд. мкр. кл	11.05.2009	02.06.2009	10	0	10
		24.06.2009	14.07.2009	10	0	10
		01.08.2009	22.08.2009	10	0	10
9.	4,0 млрд. мкр. кл	11.05.2009	02.06.2009	10	0	10
		24.06.2009	14.07.2009	10	0	10
		01.08.2009	22.08.2009	10	0	10

Подопытных белых мышей иммунизировали двукратно подкожно с интервалом 21 день, через 14 дней после повторного введения препарата, животных заражали споровой культурой штамма №1098 в дозе 5 Ld_{50} . Заражающую дозу предварительно подтитровывали на аналогичных белых мышах. Через 14-16 дней после второй вакцинации 10 иммунизированных и 10 контрольных белых мышей заражали лиофилизированной споровой культурой контрольного штамма *C. septicum* №1098 в дозе 3 Ld_{50} . Культуру вводили внутрибрюшинно в объеме 0,5 см³.

Наблюдение за зараженными животными устанавливали в течение 72 часов, регистрируя случаи гибели в опытной и контрольной группах.

Из представленных в таблице 19 данных видно, что после заражения выживают мыши, вакцинированные дозами 2,0 млрд. м. кл и выше. Опыт был повторен трехкратно.

После систематизации полученных результатов, было решено считать дозу 2,5 млрд. м. клеток оптимальной, так как ее введение обеспечивает выживаемость не менее 80 % подопытных мышей и может быть использована в таком количестве при компоновке серии препарата.

4.4.8 Составление серии вакцины

Для составления экспериментальной серии вакцины анатоксины *C. perfringens* типов A, C, D, *C. tetani*, *C. novyi*, а также инаktivированные культуры *C. septicum* и *C. chauvoei* смешивали в эффективном количестве. Все работы по изготовлению экспериментальных образцов препарата проводили с соблюдением условий стерильности в подготовленном боксе под ламинарным потоком сте-

рильного воздуха, а при изготовлении опытно-промышленных серий в реакторных емкостях, снабженных мешалкой с электроприводом, воздушным фильтром и манометром. В начале компоновки серии в ферментер вносили необходимый объем фосфатно-буферного раствора, подачу которого осуществляли с использованием проточного насоса полупогружного типа. Затем через заливное отверстие в ферментер по порядку вносили заранее отмеренные количества бактериальных полуфабрикатов и анатоксинов. Полученную вакцину тщательно перемешивали, устанавливали pH препарата на уровне 7,0 – 7,7 раствором 10% NaOH, консервировали 10% раствором мертиолята до его конечной концентрации 1:10000. Смесь тщательно перемешивали с помощью мешалки в течение 60 минут, после чего устанавливали pH в пределах 7,0-7,7.

Таблица 20 – Антигенный состав вакцины против клостридиозов

№№	Наименование компонента	Содержание в вакцине*	
		%*	Объем, л
1.	<i>C. tetani</i>	6,7	8
2.	<i>C. chauvoei</i>	13,4	16
3.	<i>C. septicum</i>	13,4	16
4.	<i>C. perfringens</i> mun A	10	12
5.	<i>C. perfringens</i> mun C	10	8
6.	<i>C. perfringens</i> mun D	10	10
7.	<i>C. oedematiens</i> mun B	10	10
8.	3 % раствор ГОА	10	12
9.	Вода для инъекций	до 100%	32
10.	Мертиолят Na (10% р-р)	1 мл/л	0,120
11.	Гидроокись натрия (20 % р-р)	До уровня pH 7,2-7,7	
	<i>Итого</i>		125

*- приведен приблизительный объем, вносимых бактериальных полуфабрикатов и анатоксинов, и он может меняться в зависимости от исходной активности сырья.

Готовый полуфабрикат вакцины проверяли по физическим параметрам и стерильности, а затем переливали в емкости для хранения или подавали на фасовку. Бутыли с изготовленной серией вакцины этикетировали с указанием наименования препарата, его объема, номера серии и даты изготовления. Маркированные бутылки с вакциной хранили при 4 ± 2 °С не более 6 мес при условии сохранения стерильности и целостности укупорки.

Таким образом, были изготовлены три экспериментальные серии вакцины против клостридиозов крупного рогатого скота и овец поливалентной инактивированной, в которой все компоненты были объединены в дозах, доказавших свою эффективность. Все изготовленные серии вакцины были подвергнуты испытаниям по морфологическим и иммунобиологическим свойствам.

В случае, если при проверке не были получены убедительные данные иммуногенности какого-либо антигена, проводили дополнительно его концентрирование или корректировали объем антигена в составе препарата.

В результате лабораторных и производственных испытаний было установлено, что наиболее оптимальной дозой препарата является объем $3,0\text{ см}^3$.

Вводимого при этом количества вакцины достаточно для образования иммунитета необходимой напряженности, препарат достаточно легко вводится при массовой обработке поголовья. Установленная доза вакцины обеспечивала защиту вакцинированных животных от заболевания болезнями анаэробной этиологии.

В качестве основного способа введения препарата было выбрано подкожное, поскольку вновь созданный препарат являлся многокомпонентным, содержащим значительное количество антигенов, что влекло за собой проявление различных реакций на месте инъекции.

4.4.9 Характеристика вакцины

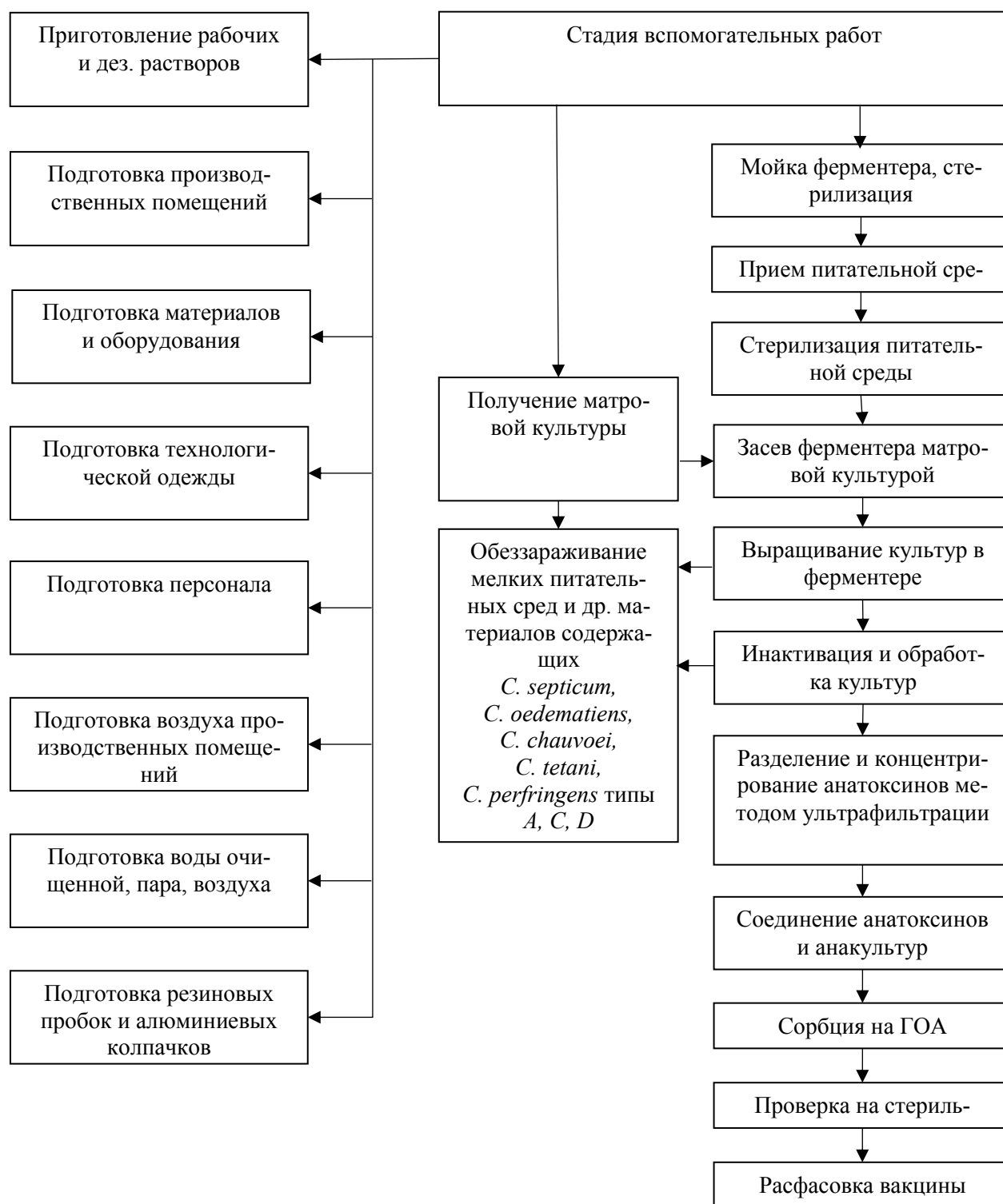
Полученный препарат по внешнему виду представляет собой суспензию желто-серого цвета, при хранении которой образуется рыхлый светло-серый осадок, легко разбивающийся при взбалтывании в гомогенную взвесь. Осадок состоит из адсорбированных на гидроокиси алюминия инаktivированных формалином клеток и анатоксинов наиболее клинически значимых видов клостридий. Каждая упаковка препарата проверяется на отсутствие механических примесей, не разбивающихся хлопьев и других возможных включений. Концентрацию водородных ионов (рН) определяли в соответствии с ГФ XI, т. 1, с. 113, её параметры составляли 7,0-7,7 единиц.

Все три экспериментальные серии препарата были стерильны, что подтверждено результатами посевов, выполненных в соответствии с ГОСТ 28085 «Средства лекарственные биологические для ветеринарного применения. Метод бактериологического контроля стерильности».

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.

Технологическая схема производства вакцины инаktivированной поливалентной против клостридиозов овец и крупного рогатого скота представлена на рисунке 23.

Рисунок 23 - Технологическая схема производства вакцины против клостридиозов



4.4.10 Определение безвредности препарата

Для определения безвредности вакцину вводили различным видам лабораторных и восприимчивых животных: белым мышам в дозе 0,5 см³ подкожно; морским свинкам в дозе 1,5 и 2 см³ подкожно; кроликам в дозе 2 и 4 см³; ягнятам подкожно в дозе 3 и 6 см³ в области бесшерстного участка под лопаткой, телятам подкожно в дозе 3 и 6 см³ в области шеи.

Наблюдение за животными устанавливали в течение всего срока опыта (45 дней) 28 дней между введениями и 14 дней после повторной инъекции. Было установлено, что после однократного и двукратного введения вакцины у животных отсутствовали какие-либо серьезные местные или системные реакции, все использованные животные оставались живы и клинически здоровы.

Выраженная местная реакция на введение препарата была у подопытных белых мышей. После инъекции у животных этого вида отмечалось кратковременное возбуждение, проявляющееся в виде ускоренного перемещения по клетке, дрожи, повышенной жажде. Через 10-15 мин наступало достаточно выраженное угнетение, мыши становились малоподвижными, скупивались, не проявляли интереса к воде и комбикорму. Такие симптомы наблюдались в течение 1-3 часов, после чего состояние нормализовывалось. Через 24 – 48 ч. на месте инъекции, особенно первой, образовывались отеки, четко заметные в области холки при осмотре. В последующем примерно у 40 % белых мышей на месте отека формировались уплотнения, которые сохранялись на протяжении всего опыта. Абсцессов на месте инъекций не выявлено, случаев гибели белых мышей после введения препарата также не наблюдалось. Учитывая, что все другие животные, использованные в опыте, не проявляли столь резко выраженной реакции на введение препарата, в дальнейшем мышей при оценке безопасности вакцины не использовали.

Наиболее удобной моделью для оценки безопасности препарата были признаны морские свинки, которым вакцину вводили подкожно в области холки в объеме 1,5 мл. При этом за весь период наблюдения не отмечалось каких-либо системных реакций, аллергии, токсического проявления и т.д. На месте введения у

отдельных животных образовывались асептические уплотнения размером 2-3 см, которые самостоятельно исчезали за 10-14 дней.

На основе проведенного опыта было принято решение при формировании технической документации на методы контроля препарата по безопасности использовать в качестве подопытных животных морских свинок массой 300-350 гр, которым препарат вводится однократно подкожно в дозе 1,5 см³. Серию вакцины считали безопасной для животных в случае отсутствия заболевания и гибели подопытных животных, а также возникновения на месте введения абсцессов и длительно не рассасывающихся болезненных уплотнений. Безвредность вакцины для восприимчивых животных различных возрастных групп проводили в животноводческих хозяйствах.

4.4.10.1 Изучение безвредности вакцины для КРС и МРС различных возрастных групп, а также беременных животных.

Безопасность препарата изучали согласно требованиям ФЗ-61 для всех видов и возрастных групп животных, 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.

Определение безвредности вакцины для телят.

Исследование проведено в племенном молочно-товарном скотоводческом хозяйстве «Васильевское», Сергиево-Посадского района Московской обл.

В опыте использовано 100 телят, не разделенных по полу, в возрасте 42-49 дней. Каждой серией вакцины иммунизировано по 50 гол согласно рекомендованной схеме: двукратно с интервалом 24-28 сут в объеме 3 см³. Проведение опыта было растянуто во времени, так как одновременно было сложно подобрать для исследования такое количество животных. Для отслеживания наличия каких-либо реакций на месте введения, первую инъекцию препарата проводили с одной стороны, повторно его вводили с противоположной стороны шеи.

Примерно в течение одного часа после проведения иммунизации животных отслеживали появление случаев возможных аллергических реакций.

Оценка клинического состояния подопытных животных проводилась ежедневно на протяжении всего опыта в течение 42 дней. Осмотру и пальпации места инъекции подвергались все животные, манипуляции проведены через 24 часа после каждого введения, а также через 7, 14, 21, 42 дня после каждого введения.

У вакцинированных животных не было отмечено каких-либо нежелательных реакций после введения препарата. Телята были активны, потребности в воде и корме оставались в норме, анафилактических реакций не наблюдалось. За весь период наблюдения из подопытной группы выбыли два теленка, однако их убой проведен в связи с заболеванием прогрессирующей, не поддающейся лечению бронхопневмонии, и не связан с проведенной иммунизацией.

При осмотре через 24 ч у телят на месте инъекции отмечались отеки подкожной клетчатки размером около 5-8 см, у большинства животных отеки самостоятельно исчезали в течение 7 – 14 дней без дополнительных воздействий. У части животных (~6 % от общего количества) отеки сохранялись весь период наблюдения до 42 дней, становясь более плотными и уменьшаясь до 2-3 см.

Также отмечено, что при повторном введении у животных несколько увеличились срок редукции отеков. Если после первой инъекции практически у всех животных они исчезали к седьмому дню наблюдения, то после повторного введения через 14-16 суток. Не было отмечено ни одного случая абсцедирования образующихся отеков и уплотнений.

Для оценки безвредности вакцины для телят 5-6 мес возраста в том же хозяйстве использовано 48 животных. Каждой серией вакцины иммунизировали по 24 теленка двукратно с интервалом 28 суток в объеме 3 мл, при этом первую дозу препарата вводили с одной стороны, вторую с противоположной стороны шеи.

Критерии оценки были те же, что и в опыте на телятах 45 дневного возраста.

У подопытных животных отсутствовали какие-либо нежелательные системные реакции на введение препарата. Телята были активными, потребности в воде и корме оставались в норме, анафилактических реакций не наблюдалось. За период наблюдения не было случаев гибели телят подопытных групп.

Температура тела оставалась в пределах физиологической нормы, отмечено повышение данного показателя на $0,6 \pm 0,12$ °C у телят и $0,5 \pm 0,22$ °C 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. После повторной вакцинации проявления были аналогичными. Случаев образования абсцессов и нерассасывающихся уплотнений не выявлено.

Учитывая отсутствие системных реакций в виде анафилактического шока, проявления угнетения и снижения аппетита у подопытных животных после введения препарата, можно сделать заключение, что вакцина Клоствовак-8 является безопасным препаратом для животных этой возрастной группы. Отмеченные отеки и уплотнения на месте инъекции не имеют существенного значения, так как не отражаются на жизнедеятельности телят и не причиняют ущерба.

У крупного рогатого скота различных возрастных групп, в частности, в возрасте 40 - 45 суток и в 6-месячном возрасте, вакцинированных препаратом «Клоствовак-8», не отмечалось случаев проявления серьезных нежелательных реакций, а именно анафилаксии и гибели. Образование отеков на месте инъекции препарата, не смотря на достаточно частое появление, не несет серьёзных последствий для жизни подопытных животных.

Определение безвредности препарата для стельных животных.

В опыте использовано 20 коров и нетелей, стельность которых составляла около 220 – 230 дней. Десяти животным вакцину вводили подкожно с соблюдением правил асептики и антисептики, двукратно с интервалом 28 суток в объеме 3 мл, еще 10 коровам препарат вводили в удвоенной дозе. Животные были клинически здоровы и помечены специальными бирками с индивидуальными номерами.

Для точного учета появления каких-либо реакций на месте инъекции, первую дозу препарата вводили с одной стороны шеи, а повторную с с противоположной стороны. В течение часа после иммунизации за животными проводили наблюдение с целью выявления случаев возможных аллергических реакций.

Срок наблюдения за подопытными животными составлял 28 дней между введениями препарата и 14 дней после повторной вакцинации. Оценка клинического состояния животных проводилась ежедневно на протяжении всего опыта. Осмотру и пальпации места инъекции подвергались все животные, манипуляции проведены через 1, 7, 14, 21 и 42 сут после каждого введения.

Критерием оценки являлось отсутствие у вакцинированных животных абортов после применения препарата, количество полученных жизнеспособных телят, а также отсутствие у молодняка, полученного от вакцинированных коров каких-либо врождённых уродств.

У подопытных животных, вакцинированных как однократной, так и превышающей рекомендованную дозу, не было отмечено каких-либо нежелательных реакций после введения препарата. Вакцинация не отражалась на общем состоянии животных, не было отмечено снижения аппетита, потребности в воде и корме оставались в норме, анафилактических реакций не наблюдалось.

Также отмечено, что при повторном введении у животных несколько увеличился срок редукции отеков, если после первой инъекции практически у всех животных они исчезали через 5-7 дней, то после повторного введения через 14-18 суток. Не было отмечено образования абсцессов на месте инъекций и уплотнений. Результаты оценки безвредности препарата для крупного рогатого скота различных возрастных групп представлены в табл. №21.

Таблица 21 - 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 при менении
	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

Учитывая отсутствие системных реакций в виде анафилактического шока, проявления угнетения и снижения аппетита у подопытных животных после введения препарата, можно сделать заключение, что вакцина Клостбовак-8 является безопасным препаратом для животных этой возрастной группы.

Установлено, что введение препарата в рекомендованной дозе двукратно не вызывало у животных опытной группы каких-либо осложнений течения стельности, не выявлено случаев абортот на поздних сроках. От 20 голов вакцинированных животных получено 20 голов жизнеспособных телят, у которых не было зафиксировано врожденных аномалий.

Не было выявлено каких-либо аномалий развития и врожденных уродств у телят, матерей которых вакцинировали в двукратной дозе. От 10 контрольных коров, привитых вакциной «Клостбовак-8», получено 10 здоровых телят, не имеющих аномалий развития.

4.4.11 Безвредность вакцины «Клостбовак-8» для МРС в неблагополучных по клостридиозам овцеводческих хозяйствах

Определение безопасности вакцины при подкожном введении для ягнят 40 – 45 дневного возраста, молодняка 4-5 мес возраста и овцематок проводили в ЗАО «Глазырское» Высокловского района и ОАО «Племзавод им. В.И.Чапаева Динского района Краснодарского края. Также проведена оценка влияния вакцинации на

течение беременности у овец и отсутствие у препарата тератогенного действия. Для проведения клинических испытаний иммунизацию проводили согласно разработанной временной инструкции по применению вакцины. Результаты проведенных опытов представлены в таблице 22.

Таблица 22 - Безвредность вакцины «Клостбовак-8» для мелкого рогатого скота

Предприятие (вид примичивых объек- тов)	Ягнота 40-45 дневного воз- раста (голов)	Молодняк 4-5 мес. возраста голов)	Суягные ов- цематки (го- лов)	Доза первого введения см ³	Доза второго введения см ³	Серьёзные по- следствия применения
	Безвредность при однократном введении вакцины в рекомендо- ванной дозе					
ЗАО «Глазырское»	15	15	10	3	-	Отсутствуют
ОАО «Племзавод им. Чапаева»	10	10	5	3	-	Отсутствуют
	Безвредность при двукратном введении вакцины в рекомендо- ванной 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

В результате проведённых исследований установлено, что однократное и двукратное введение вакцины в дозе 3 см³, а также в дозе, двукратно превышающей рекомендованную, молодняку мелкого рогатого скота, не вызывает у подопытных животных гипертермии и системных реакций на введение препарата: угнетения, снижения аппетита, адинамии. При пальпации места инъекции отмечено образование отека и гиперемии кожи, которые сохранялись у животных в течение 24 - 72 часов, а затем исчезали самостоятельно. Гибели животных не фиксировали, у отдельных животных при повторном введении отмечали кратковременно выраженную хромоту на конечность, в которую вводили препарат.

При определении безвредности препарата для указанных групп животных изменение клинического статуса не выявляли. Температура тела оставалась в пределах физиологической нормы, отмечено повышение значения данного показателя на $0,8 \pm 0,18$ °С у ягнят и $0,6 \pm 0,28$ °С у молодняка старшего возраста через 6 часов

после вакцинации, которое нивелировалось в течении 24 часов. Проведение пальпации позволяло обнаружить образование небольшой отёчности в области инъекции с повышением местной температуры и незначительной болезненностью, которые проходили 24 часов. Отёк полностью рассасывался в течение 5-7 суток. После повторной вакцинации проявления были аналогичными.

После однократного введения препарата в дозе, двукратно превышающей рекомендованную, у отдельных животных в опытных группах было замечено снижение подвижности. При этом у всех животных образовался небольшой отёк в области инъекции, рассасывавшийся в течение 5-7 суток, с повышением местной температуры, самостоятельно нормализующейся в течение 24 часов. Иных признаков развития общих и местных реакций на введение экспериментальной вакцины в двойной дозе зафиксировано не было.

Проведенные опыты показали, что применение вакцины инактивированной против клостридиозов овец и КРС «Клостбовак-8» безвредна для ягнят и телят 40-45 дневного и 5-6 мес возраста, а также стельных и суягных животных как в рекомендованной, так и в удвоенной дозе. У животных не зафиксированы случаи абортов, полученные от вакцинированного поголовья телята были жизнеспособны и не имели врожденных аномалий развития.

4.5 Разработка методов контроля иммуногенной и антигенной активности вакцины.

Контроль биопрепаратов для специфической профилактики инфекционных болезней животных подразумевает необходимость выполнения испытаний различных показателей, основным из которых стоит считать определение иммуногенности. При испытаниях ассоциированных препаратов контроль иммуногенной активности проводят для каждого антигена, входящего в состав вакцины.

Иммуногенность биопрепаратов оценивают с использованием качественных и количественных методов. С помощью качественных методов можно определить только пригодность препарата к использованию на основании лимита минимальной активности. Количественные методы оценки иммунитета позволяют оценить

не только качественный состав препарата, но и степень его специфической активности и спрогнозировать продолжительность иммунитета. Для воспроизведения количественных методов контроля вакцин против клостридиозов используют международные стандартные антитоксические сыворотки и образцы токсинов с определенной активностью.

На момент начала исследований в РФ не выпускались ассоциированные вакцины для профилактики анаэробных инфекций крупного рогатого скота, соответственно, отсутствовали и методы их контроля. Спектр препаратов против анаэробных болезней был представлен двумя вакцинами против эмфизематозного карбункула и концентрированным столбнячным анатоксином. Профилактика злокачественных отеков различной этиологии, некротического гепатита, анаэробной энтеротоксемии, некротических энтеритов, вызываемых широким спектром возбудителей, была невозможна из-за отсутствия препаратов. Это обстоятельство послужило толчком к тому, что на Российский рынок ветеринарных препаратов стали массово поступать вакцины против клостридиозов зарубежного производства. Так на период с 2008 г. по 2012 г. в РФ Россельхознадзором было зарегистрировано в РФ шесть лекарственных препаратов для специфической профилактики клостридиозов крупного рогатого скота и еще двум отказано в регистрации.

Для вновь созданной вакцины требовалась отработка и совершенствование методов контроля иммуногенной и антигенной активности, для чего было необходимо установить наиболее подходящую для контроля иммуногенности вакцины модель лабораторных животных, подобрать оптимальную дозу препарата, вызывающую достаточный уровень иммунитета у лабораторных животных, установить титр антител в крови вакцинированных животных.

Существующие методы контроля иммуногенности анаэробных препаратов, применяемых в ветеринарии, были устаревшими и не давали реального представления о их качестве. Еще раз оговариваясь, что ассоциированных вакцин против клостридиозов КРС не существовало, в качестве примера можно привести описание методов контроля иммуногенности препаратов против клостридиозов овец, частично совпадающих по антигенной структуре с новым препаратом.

Наиболее распространенным и широко используемым препаратом против клостридиозов овец в стране является «Вакцина против браззота, анаэробной энтеротоксемии, злокачественного отека овец и дизентерии ягнят инактивированная концентрированная», разработанная в 1931 г. и несколько усовершенствованная в 1956 г. Препарат представляет собой смесь инактивированных формалином бактериальных клеток культур *C. perfringens* типов С и D, *C. septicum* и *C. oedematiens*, адсорбированных на геле гидроокиси алюминия. Препарат является морально устаревшим, так как при производстве не предусмотрена очистка его от микробных клеток производственных культур, имеющих второстепенное значение при формировании иммунитета к клостридиозам и даже мешающих образованию полноценного антитоксического иммунитета.

Контроль иммуногенности компонентов *C. perfringens* тип С, а также *C. oedematiens*, проводится путем прямого заражения трех дважды иммунизированных и двух контрольных кроликов активно растущими культурами указанных видов. Данный метод имеет существенные недостатки: во первых, используется незначительное количество животных, что не позволяет достоверно подтвердить иммуногенность и статистически обработать полученные результаты; во вторых, отсутствует возможность стандартизировать заражающую дозу контрольных штаммов, так как используются нативные активно растущие культуры, что ведет к получению недостоверных результатов при контроле выпускаемых серий; в третьих, заражение штаммами, вызывающими гангренозное поражение мышц, не гуманно, так как даже при выживании подопытных животных, что говорит о наличии иммунитета, вызванного введением испытуемого препарата, образуется гангренозное поражение конечности, что ведет к страданиям животного; в четвертых при использовании нативных растущих культур не правильно воспроизводится механизм инфекционного процесса, поскольку в природе клостридии находятся в виде споровых форм, соответственно, для заражения целесообразно использовать споровые культуры возбудителя, что практикуется в мире.

Компонент *C. perfringens* тип D в вакцине контролируется путем постановки реакции нейтрализации эпислон-токсина сыворотками дважды иммунизиро-

ванных кроликов, что в принципе отвечает современным требованиям к контролю качества анаэробных препаратов, но метод исключительно качественный, так как при постановке РН используется эpsilon-токсин с активностью рабочего разведения 4 D_{1m}, соответственно каждая подопытная мышь получает всего одну летальную дозу токсина в смеси с сывороткой, что не позволяет оценить степень его напряженности. Еще одним существенным недостатком вакцины является очень высокий процент формалина в препарате, составляющей минимально 0,8 % к объему. Такое количество добавляется в связи с необходимостью обезвреживания спор возбудителей, образующихся при культивировании, однако это сильно отражается на качестве и продолжительности иммунитета, так как формальдегид в высокой концентрации приводит к денатурации клеток и их токсинов.

Вторым препаратом против клостридиозов овец является «Поливалентный анатоксин против клостридиозов овец», разработанный Ф.И. Каган и Л.В. Кирилловым в 1980 г. По составу анатоксин идентичен предыдущей вакцине, но является более современным препаратом. При производстве анатоксина предусмотрена очистка культуральной жидкости производственных штаммов от бактериальных клеток с последующей концентрацией инаktivированных анатоксинов. Препарат безопасен, что отражается в отсутствии при введении отеков и асептических уплотнений, а также индуцирует более напряженный иммунитет продолжительностью до 10 мес (у вакцины против браздота длительность иммунитета 4-6 мес).

Контроль данного препарата подразумевает определение титра анитоксических антител в крови иммунизированных животных, выраженном в единицах связывания токсина (ЕС). Это позволяет определить не только наличие, но степень напряженности иммунитета, однако разработанный и используемый метод контроля имеет огромные недостатки. Во первых, контроль имеет очень высокую стоимость, так как в качестве подопытных животных используются не лабораторные, а восприимчивые животные (взрослые овцы), а во вторых, использование овец имеет еще одну негативную сторону, поскольку при формировании групп для контроля приходится проверить значительное количество животных на нали-

чие антител к клостридиям для выявления серонегативных особей, так как у многих овец присутствуют собственные антитела в высоком титре.

Еще одним недостатком метода является отсутствие в РФ выпуска стандартных антитоксических сывороток, которые необходимо использовать при контроле препарата. В связи с этим, описанный в ТУ на препарат метод контроля становится практически не воспроизводимым, а для определения иммуногенности производители пользуются прямым заражением кроликов.

Что касается методов контроля противостолбнячного иммунитета, то единственный выпускаемый в РФ препарат, Анатоксин столбнячный концентрированный, разработанный в 1956-1964 гг., контролируется путем введения однократно вакцинированным белым мышам высоких доз столбнячного токсина, что представляет собой устаревшую схему контроля. В настоящее время иммуногенность столбнячных препаратов проверяется постановкой РН токсина антителами сыворотки крови вакцинированных животных.

Таким образом, для всесторонней и количественной оценки качества нового ассоциированного препарата, существующие методы не подходили, и предстояло разработать современный и приемлемый способ контроля качества иммуногенности вновь разработанной вакцины. Для отработки методов проведен ряд экспериментов по контролю иммуногенной активности многокомпонентной вакцины.

Согласно литературным данным, в мире контроль качества анаэробных препаратов по иммуногенной активности осуществляется в РН токсинов клостридий сыворотками крови кроликов.

К основным преимуществам этих животных можно отнести удобство работы исследователя, возможность получения большого количества сыворотки крови от одного животного, а также отсутствие в популяции серопозитивных особей.

Для оценки напряженности иммунитета у подопытных животных предварительно требовалось определить какая доза токсина может быть инактивирована полученными сыворотками.

Для определения активности вакцины по компонентам *C. perfringens* типов А, В, С, D, *C. tetani*, *C. novyi* т. В, использовались кролики, которых иммунизиро-

вали двукратно с интервалом 28 дней. Для определения титра токсиннейтрализующих антител в крови иммунизированных кроликов, использовали беспородных белых мышей массой 16-18 гр. Необходимые для РН токсины *C. perfringens* типов А, В, С, D, *C. tetani*, *C. novyi* т. В, изготавливали и стандартизировали в лаборатории контроля качества бактериальных препаратов ФГБУ «ВГНКИ». Стандартизация проводилась с использованием коммерческих антитоксических сывороток, приобретенных ГИСК им. Тарасевича.

Группу подопытных кроликов массой 2,5–3,0 кг в количестве 8 голов вакцинировали двукратно подкожно с интервалом 28 дней в объеме 1,5 см³, что составляло половину дозы для восприимчивых животных. Через 14 дней после повторного введения препарата, у кроликов брали кровь. Сыворотку крови каждого животного в группе объединяли в стерильном флаконе в равных объемах, перемешивали и использовали для постановки реакции нейтрализации.

Для РН использовали стандартизированные токсины *C. perfringens* типов А, В, С, D, *C. novyi* с различной активностью. Стандартизацию указанных токсинов проводили с использованием международных антитоксических сывороток, приобретенных в ГИСК им. Тарасевича. Всего было использовано пять разведений токсинов с активностью 10, 15, 20, 25, 30 Dlm/мл для белых мышей массой 16–18 г и токсин *C. tetani* в разведениях 50, 100 и 200 Dlm/мл.

Общую пробу сыворотки разливали по 1,5 см³, после чего смешивали с рабочими растворами токсинов клостридий в объеме 1,5 см³: в первой - *C. perfringens* тип А, во второй - *C. perfringens* тип В, в третьей - *C. perfringens* тип С, в четвертой - *C. perfringens* тип D, в пятой - *C. novyi*, в шестой - *C. tetani*.

Смесь токсинов с сывороткой перемешивали, стараясь не допускать образования пузырьков воздуха, и помещали в термостат на 45 мин при температуре 37 °С. Этого времени достаточно для нейтрализации токсинов имеющимися в сыворотке крови антителами. Затем каждую пробу смеси токсин/сыворотка вводили 5 белым мышам внутривенно в объеме 0,5 см³.

Для контроля активности токсинов каждый из них разводили так, чтобы в 1,0 см³ раствора содержалось 2 Dlm/мл для белых мышей указанной массы. Рас-

творы прогревали в термостате 45 мин при 37 °С и вводили внутривенно белым мышам в дозе 0,5 см³, используя по 5 мышей на каждую пробу, токсин *C. tetani* вводили внутримышечно в области корня хвоста.

После проведения инъекций за животными устанавливали наблюдение в течение 72 часов. Реакцию считали положительной, если после введения смеси сыворотки с токсинами в различных разведениях, выживаемость мышей была не менее 80 % при гибели не менее 4 контрольных белых мышей. Результаты опытов представлены в таблице 23.

Таблица 23 - Определение дозы токсинов клостридий, нейтрализуемых антитоксическими сыворотками

Контролируемый компонент	Дозы токсинов, Dlm/мл							
	10	15	20	25	30	50	100	200
<i>C. Perf. Tun A</i>	5/5	5/5	4/5	2/5	0/5	-	-	-
<i>C. Perf. Tun B</i>	5/5	5/5	5/5	4/5	2/5	-	-	-
<i>C. Perf. Tun C</i>	5/5	5/5	5/5	5/5	4/5	-	-	
<i>C. Perf. Tun 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 проведенной работы установлено, что мыши, которым вводили смеси с активностью токсинов *C. perfringens tun 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 вакцинированных кроликов, позволяющих нейтрализовать токсин *C. tetani* с активностью 100 и 200 Dlm/мл.

Помимо разработки методов контроля иммуногенной активности анатоксинов, проведены опыты по определению активности компонентов *C. chauvoei* и *C. septicum* в ассоциированном препарате.

Оценку проводили методами, предусматривающими заражение предварительно двукратно иммунизированных животных. Для определения иммуногенной

активности компонента *C. chauvoei* вакцины использовались морские свинки, а для *C. septicum* – белые мыши.

Для контроля активности компонента *C. chauvoei* вакцину вводили 10 морским свинкам двукратно подкожно в области холки с интервалом 21 день в дозе 1,0 см³. Через 14 дней после второй вакцинации 10 иммунизированных и 10 контрольных морских свинок заражали лиофилизированной споровой культурой контрольного штамма *C. chauvoei* R₁₅ в дозе 20 LD₅₀, которую предварительно устанавливали на животных-аналогах. Заражающую культуру вводили внутримышечно в дозе 0,1 см³ с добавлением 0,2 см³ 10 % раствора хлористого кальция. Срок наблюдения за животными устанавливали 5 суток.

Для оценки иммуногенности компонента *C. septicum* заражали вакцинированных белых мышей. Вакцину вводили 10 белым мышам массой 16–18 г двукратно подкожно с интервалом 21 день в области холки в дозе по 0,5 см³. Через 14–16 дней после второй вакцинации 10 иммунизированных и 10 контрольных белых мышей заражали лиофилизированной споровой культурой контрольного штамма *C. septicum* №1098 в дозе 3 Ld₅₀. Заражающую культуру вводили внутрибрюшинно в объеме 0,5 см³. Учет результатов проводили через 72 часа.

Проведенное исследование показало, что вакцина эффективна в отношении создания иммунитета у животных, так как обеспечивает выживание не менее 80 % иммунизированных белых мышей при гибели 80–100 % контрольных животных, и не менее 80 % морских свинок.

Как видно из представленных данных, в результате проведенных опытов был отработан метод контроля иммуногенной активности ассоциированной вакцины против клостридиозов крупного рогатого скота. В полученных сыворотках крови от дважды иммунизированных испытуемым препаратом кроликов, титры антитоксических антител в отношении альфа, бета и эпсилон токсинов *C. perfringens* и токсина *C. novyi* позволяли нейтрализовать не менее 20 Dlm/мл, а *C. tetani* – 100 Dlm/мл. Также получено подтверждение иммуногенности компонентов против эмфизематозного карбункула и браздота в ранее описанном варианте, несмотря на большее количество компонентов в препарате.

4.5.1 Изготовление заражающих токсинов и культур клостридий

Применяемые для контроля иммуногенной активности вакцин против клостридиозов заражающие культуры должны быть стандартизированы, это касается и контроля анатоксинов, и бактеринов.

Контроль вакцин против эмфизематозного карбункула во всем мире осуществляется по одному методу, заключающемуся в заражении иммунизированных и контрольных интактных морских свинок. Метод был предложен Лекланшем и Валле в 1925 г. во Франции, и заключался в том, что однократно вакцинированные в дозе $0,4 \text{ см}^3$ морские свинки, заражаются минимальной смертельной дозой активно растущей суточной культуры контрольного вирулентного штамма. Иммуногенность оценивается по количеству выживших в течение определенного времени животных при гибели всех контрольных. Метод применяется во всех странах, имеющих биологическую промышленность, в том числе и в России. В СССР для контроля первой разработанной вакцины против эмкара её автор, Муромцев С.Н., также использовал этот метод контроля.

Метод имел существенный недостаток, поскольку не всегда удается получить положительные результаты контроля с первого раза из-за нестандартных питательных сред, когда за установленный период культивирования в среде накапливалось различное количество бактериальных клеток заражающей культуры. Поэтому метод был усовершенствован, и в настоящее время в специализированных учреждениях для контроля препаратов всегда используются стандартизированные споровые культуры возбудителя, применение которых позволяло точно оценить наличие иммунитета у животных.

Поскольку с 2006 г. ФГУ ВГНКИ перестал снабжать предприятия биологической промышленности штаммами микроорганизмов, в том числе заражающими культурами, возникла необходимость изготовления и стандартизации споровых культур клостридий.

Основные требования к заражающей культуре: стабильность при хранении в течение установленного срока, жизнеспособность спор, количество споровых

форм не менее 95 % от общего количества микробных клеток, вирулентность для интактных животных.

С целью получения споровой формы, культуру штамма выращивали на среде Китта-Тароцци в течение 24-30 часов, выдерживали в течение нескольких суток в тёмном месте при комнатной температуре до полного спорулирования. Культуру центрифугировали, трижды отмывали физиологическим раствором от остатков питательной среды и разводили так, чтобы в оставшемся осадке концентрация спор составляла около 4 млрд. в мл. Предварительно, для усиления вирулентности штамм пассировали на чистых морских свинках, и культуру высевали из крови сердца или печени подопытного животного.

Полученную споровую массу смешивали с сахарозо-желатиновой средой в соотношении 1:1, расфасовывали по 1 см³ в ампулы и лиофилизировали.

Одним из наиболее важных аспектов работы является четкая расфасовка споровой культуры, так как погрешность в значительной мере влияет на результаты опытов по стандартизации.

После высушивания и проверки на чистоту роста культуру *C. chauvoei* R₁₅, проводили опыты по определению концентрации живых спор возбудителя и Ld₅₀.

Определение количества жизнеспособных спор в заражающей культуре проводили культуральным способом, для чего лиофилизат в ампуле растворяли до первоначального объема, а затем разводили путем десятичных разведений до 10⁸ степени.

Каждое разведение культуры вводили внутримышечно морским свинкам в дозе 0,1 мл, используя по 4 свинки на дозу. Дополнительно к культуре добавляли 0,2 мл 10 % раствора хлористого кальция, чтобы вызвать воспаление в месте инъекции. Данный метод описан в литературе и широко применяется на практике, так как даже высоко вирулентные штаммы не всегда могут вызвать заболевание без дополнительно организованного очага воспаления в тканях.

Разница в количестве спор в ампулах практически отсутствовала. При наблюдении за полученной заражающей культурой в течение 12 месяцев, удалось установить, что количество жизнеспособных спор в лиофилизате снижается

незначительно, не более 3-5 %. Для контроля качества вакцин против эмфизематозного карбункула использовалась заражающая культура *C. chauvoei* с четко установленной концентрацией и вирулентностью, обеспечивающая 100 % гибель невакцинированных морских свинок в дозе 20 Ld_{50} .

Изготовление споровой заражающей культуры *C. septicum* проводили по аналогичной технологии с некоторыми отличиями в связи с различными ростовыми свойствами штаммов. Стоит отметить, что в настоящее время практически все производители вакцин определяют активность этого компонента по уровню антитоксических антител к альфа-токсину. Однако данная методика не отработана в ветеринарии, что приводит к необходимости контроля качества вакцин путем прямого заражения споровой культурой вирулентного штамма вакцинированных белых мышей. Иммуногенность оценивается по количеству выживших животных при гибели всех контрольных. Метод применяется всеми странами, имеющими биологическую промышленность, в том числе РФ.

Данный метод весьма проблематичен, поскольку при контроле многокомпонентных вакцин часть подопытных белых мышей гибнет до заражения от высокой антигенной нагрузки, что не всегда позволяет получить результаты контроля с первого раза.

Основными требованиями к заражающей культуре *C. septicum*, является стабильность при хранении, жизнеспособность спор, вирулентность для невакцинированных животных.

Для получения споровой культуры штамм выращивали на среде Китта-Тароцци в течение 16 - 20 часов, выдерживали в течение нескольких суток в темном месте при комнатной температуре до полного спорулирования, при слабо выраженном образовании спор дополнительно подщелачивали среду до уровня , при слабо выраженном образовании спор дополнительно подщелачивали среду до уровня , при слабо выраженном спорулировании подщелачивали среду до уровня pH 7,6-7,8. После трехкратного центрифугирования культуру разводили физиологическим раствором до концентрации спор 5 млрд./см³. Предварительно для уси-

ления вирулентности штамм пассировали на морских свинках, культуру высевали из крови сердца или печени подопытного животного.

После высушивания и проверки на чистоту, проводили опыты по определению концентрации живых спор *C. septicum* и Ld_{50} культуры.

Определение количества жизнеспособных спор в заражающей культуре проводили культуральным способом, для чего лиофилизат в ампуле растворяли до первоначального объема, а затем разводили путем десятичных разведений до 10^8 степени.

Каждое разведение культуры вводили внутрибрюшинно белым мышам в дозе 0,1 мл, используя по 4 мыши на дозу.

Для контроля качества моновакцин, изготовленных из штаммов *C. septicum*, а также комплексного препарата, использовали заражающую культуру в дозе 3 Ld_{50} , которая обеспечивала 100 % гибель невакцинированных мышей.

Изготовление контрольных токсинов для проверки активности моновакцин, и экспериментальных образцов ассоциированной вакцины по компонентам *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. tetani* использовали стандартизированные токсины, которые изготавливали двумя способами.

В первом случае при наличии типичной морфологии и отсутствии контаминации посторонней микрофлорой, выращенные культуры центрифугировали 30 мин при 5000 об/мин, супернатант фильтровали через стерилизующие фильтры и проверяли на активность токсина путем внутривенного введения белым мышам культуральной токсин содержащей жидкости в объеме 0,5 см³. За животными устанавливали наблюдение в течение 24 часов, регистрируя все случаи гибели мышей. В случае достаточно высокой активности токсина (не менее 1 тыс. Dlm/мл), культуральную жидкость смешивали со средой высушивания 1:1, лиофилизировали и запаивали под вакуумом.

В случае, если активность токсинов была не высокой, особенно это касалось *C. perfringens* типов А и D, проводили высаливание. Для этого в стерильную культуральную жидкость с pH 5,5-6,0, вносили до насыщения сернокислый аммоний. Предварительно соль тщательно измельчали и прокаливали при 150-160 °C в те-

чение суток. Для достижения эффекта высаливания требовалось внести около 900 граммов соли на каждый литр культуральной жидкости. Смесь тщательно перемешивали в течение нескольких минут для насыщения раствора. Растворение сернокислого аммония вызывало образование на поверхности культуральной жидкости белковой токсинсодержащей пленки, которую собирали шпателем, отжимали, распределяли тонким слоем в чашке Петри. Для удаления влаги чашки Петри с собранной белковой фракцией помещали в эксикатор на полочку, под которой насыпали обезвоженный хлористый кальций. Высушивание проводили в течение 24 часов при температуре 37 °С.

Полученную сухую массу, представляющую собой высушенный токсин нужного штамма, растирали в ступке до порошкообразного состояния и расфасовывали. Хранили образцы при температуре 2-8 °С. Для получения рабочих растворов токсина, навеску порошка растворяли в пептонной воде или физиологическом растворе, выдерживали для стабилизации в течение 30-40 минут.

Постановку РН токсинов клостридий, входящих в состав вакцины, и учет её результатов с каждым из антигенов, проводили в соответствии с методикой, описанной в методическом руководстве по лабораторной оценке качества активности гангренозных анатоксинов [83]. Полученные таким образом токсины имели активность в пределах 2,5-3,0 тыс Dlm/см³.

Иммуногенная активность экспериментальных образцов вакцины.

В связи с отсутствием в РФ ассоциированных вакцин против клостридиозов животных широкого спектра действия, возникла необходимость отработки методов контроля иммуногенной активности изготовленного препарата, позволяющих при минимальных затратах лабораторных животных провести всестороннее исследование свойств для объективной оценки её качества.

Иммуногенную активность вакцины по отношению токсидов *C. perfringens* типов A, B, C, D, *C. tetani*, *C. novyi* тип В оценивали по выживаемости белых мышей, которым вводили смесь стандартизированных токсинов указанных видов клостридий с сыворотками крови вакцинированных кроликов после прохождения предварительной нейтрализации в *in vitro*. Проверяемые сыворотки получали пу-

тем иммунизации 8 кроликов массой 2,5 – 3,0 кг, которым двукратно подкожно с интервалом 25 – 28 дней вводили препарат в объеме 1,5 см³ (половина дозы для восприимчивых животных). Через 14 дней после повторной инъекции у животных брали кровь. Сыворотки крови каждого кролика из группы объединяли в равных объемах, перемешивали и использовали для постановки РН на белых мышах.

Для постановки РН использовали стандартизированные рабочие разведения токсинов *C. perfringens* типов *A*, *B*, *C*, *D*, *C. novyi* тип *B* с установленной активностью 20 Dlm/см³ для белых мышей массой 16 – 20 г, и токсин *C. tetani* с установленной активностью 200 Dlm/см³. Контрольные токсины предварительно стандартизировали в соответствии с национальными или международными антитоксическими сыворотками.

Общую пробу сыворотки от животных каждой группы разливали в 6 пробирок по 1,5 см³, после чего в них вносили рабочие растворы токсинов клостридий в равном объеме: в первую - *C. perfringens* тип *A*, во вторую - *C. perfringens* тип *B*, в третью - *C. perfringens* тип *C*, в четвертую - *C. perfringens* тип *D*, в пятую - *C. oedematiens* тип *B*, в шестую - *C. tetani*.

Смесь токсинов с сывороткой перемешивали, стараясь не допускать образования пузырьков воздуха, и помещали в термостат на 45 мин при температуре 37 °С. Затем каждую пробу вводили 5 мышам внутривенно по 0,5 см³.

Для контроля активности токсинов каждый из них разводили так, чтобы в растворе содержалось 2 Dlm /см³ для белых мышей массой 16 – 18 грамм. Растворы токсинов перемешивали, прогревали в термостате 45 минут при 37 °С и вводили внутривенно белым мышам в дозе 0,5 см³, используя по 5 белых мышей на каждую пробу. Предварительно устанавливали дозу токсина, которая могла быть обезврежена полученными сыворотками иммунизированных животных.

Таким образом было установлено, что после двукратной вакцинации в крови иммунизированных кроликов образуется количество антител, достаточное для нейтрализации 20 Dlm/ мл клостридиозных токсинов.

Серию вакцины считали активной, если после введения белым мышам смеси токсина с сывороткой живыми оставались не менее 4 из 5 использованных жи-

вотных при гибели не менее 4 контрольных белых мышей. Срок наблюдения за животными составлял 72 ч. Результаты иммуногенной активности трех экспериментальных серий вакцины представлены в таблице 24.

Таблица 24 - Иммуногенная 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.

На основании результатов, представленных в табл. №24, можно сделать заключение, что испытанные экспериментальные серии вакцины «Клостбовак-8» обладают высокой иммуногенной активностью в отношении компонентов *C. perfringens* типов А, В, С, D, *C. tetani*, *C. novyi* (*oedematiens*) т. В., *C. chauvoei*, *C. septicum*, обеспечивая выживаемость не менее 80 % лабораторных животных.

4.5.3 Определение антигенной активности экспериментальных образцов вакцины на восприимчивых животных.

Также определены показатели гуморального иммунитета, который оценивали по накоплению токсиннейтрализующих антител. Антигенную активность вакцины оценивали путем исследования сыворотки крови вакцинированных телят в РН токсинов клостридий. Для этого из общего стада было отобрано 10 гол телят разного пола, у которых на второй день жизни после выпойки молозива, перед

первой вакцинацией, а затем через 14 дней после двукратной вакцинации брали кровь для оценки уровня антитоксических антител.

Для сравнения полученных в опыте результатов также была сформирована группа контрольных животных в количестве пяти голов, которым вместо вакцины вводили физиологический раствор в том же объеме. Результаты определения иммуногенной активности представлены в таблице 25.

Таблица 25 - Титр антитоксических антител в крови вакцинированных телят при двукратной иммунизации.

№№ животных	Титр антитоксических антител у животных, МЕ/мл				
	<i>C. perfringens</i> тип А	<i>C. perfringens</i> тип С	<i>C. perfringens</i> тип D	<i>C. novyi</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 (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

Как видно из таблицы 25, иммунизация стельных коров способствовала образованию у новорожденных телят высокого уровня колострального иммунитета. Так накопления антител в крови молодняка неонатального периода составляло к α -токсину *C. perfringens* 2.10 МЕ/мл, β -токсину *C. perfringens* - 7.80 МЕ/мл, ϵ -токсину *C. perfringens* 3,20 МЕ/мл, к *C. oedematiens* тип В -3.1 МЕ/мл, к токсину *C. tetani* - 1.50 МЕ/мл. Однако к 45 дню 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 значительное нарастанию специфических антител. В среднем показатели по каждому антигену составляли 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. oedematiens* тип В-3.5 МЕ/мл, к токсину *C. tetani* - 4.50 МЕ/мл, что является показателем высокой иммуногенно-

сти и сопоставимо с активностью, заявляемой производителями иностранных вакцин против клостридиозов.

4.6 Изучение интерференции компонентов в вакцине «Клостбовак-8»

Для определения интерференции компонентов в вакцине проводили изучение конкуренции антигенов на морских свинках, кроликах и белых мышах, которых вакцинировали моновакцинами из указанных штаммов, а также из вакциной экспериментальной серии, изготовленной из тех же штаммов, объединенных в эффективных дозах. О наличии или отсутствии интерференции между антигенами судили по величине титров специфических токсинов, нейтрализующих антител в крови вакцинированных кроликов.

Поскольку вакцинация является единственным надежным способом профилактики анаэробных инфекций, а также в связи с тем, что в большинстве случаев клостридиозы протекают в виде ассоциированных инфекций, для профилактики целесообразно использовать ассоциированные вакцины, включающие широкий спектр клинически значимых возбудителей.

Ученые-исследователи, занятые созданием новых иммунобиологических препаратов, должны стремиться к изобретению вакцины, позволяющей обеспечивать при однократном введении непарентеральным методом формирование пожизненного иммунитета к большинству клинически значимых инфекционных болезней без каких-либо побочных эффектов. В настоящее время не существует препарата, который бы соответствовал этим требованиям.

Одним из способов достижения этой цели является разработка ассоциированных вакцин на основе высокоактивных монопрепаратов. Использование ассоциированных вакцин позволяет оптимизировать схему вакцинаций, что в приводит к снижению стрессов у животных и нагрузки на ветеринарных врачей.

Теоретически, число компонентов в ассоциированных вакцинах может быть неограниченным, однако следует учитывать, что между антигенами при их совместном введении возникает определенное взаимодействие, часто приводящее к снижению эффекта вакцинации в сравнении с монопрепаратами. Однако, при правильном подборе штаммов и концентраций антигенов в комплексных вакци-

нах можно избежать сильного отрицательного воздействия их друг на друга (отсутствие интерференции). В организме существует огромное разнообразие субпопуляций лимфоцитов с различной специфичностью, поэтому практически каждый антиген может найти соответствующий клон лимфоидных клеток, обеспечивающий выработку антител или формирование эффекторов клеточного иммунитета.

Также следует учитывать, что одни антигены могут угнетать активность других не из-за количества в комплексном препарате, а в зависимости от своих иммунобиологических свойств. Это следует учитывать при компоновке препарата, вводя в его состав большее количество менее активных антигенов. Следует отметить, что, помимо отрицательного воздействия друг на друга, в отдельных случаях может наблюдаться феномен синергии, когда один компонент вакцины стимулирует активность другого антигена.

Поэтому при разработке нового многокомпонентного препарата было необходимо определить наличие интерференции между антигенами в поливалентной вакцине против анаэробных болезней жвачных животных.

Для изучения интерференции компонентов поливалентной вакцины против клостридиозов, проведено изготовление моновакцин из каждого вида клостридий, входящих в её состав. Экспериментальные образцы антигенов готовили в лабораторных условиях, культивирование проводили на стандартных питательных средах ведущих мировых производителей микробиологической продукции, что способствовало не только высокому уровню токсинообразования, но и в значительной мере позволяло стандартизировать процедуру культивирования.

Полученные после культивирования, инаktivации, очистки и концентрирования анатоксины клостридий адсорбировали на адьюванте гидроокиси алюминия. Каждый из монопрепаратов проверяли по следующим показателям: внешний вид, pH, стерильность, безвредность введения в рекомендованной дозе, иммуногенная и антигенная активность.

С целью определения наличия интерференции между компонентами изготовили экспериментальную серию поливалентной вакцины, смешивая отдельные

компоненты в эффективном количестве. Полученный образец препарата был исследован по тем же параметрам, что и моновакцины.

Отсутствие интерференции определяли в опыте изучения иммуногенной активности моновакцин в сравнении с иммуногенностью каждого компонента в комплексном препарате. Иммуногенность в отношении *C. perfringens* типов А, С, D, *C. tetani*, *C. novyi* тип В, оценивали путем постановки РН токсинов указанных видов клостридий с антителами сыворотки крови вакцинированных кроликов.

С этой целью иммунизировали 8 кроликов массой 2,5–3,0 кг поливалентной экспериментальной вакциной и по 8 кроликов каждым монопрепаратом. Вакцину вводили двукратно подкожно с интервалом 25 дней в объеме 1,5 см³, моновакцины в дозе 0,5 см³. Через 14 дней после второй вакцинации у кроликов брали кровь, получали пробы сыворотки, которые объединяли в равных объемах.

Для постановки РН использовали стандартизированные токсины *C. perfringens* типов А, С, D и *C. novyi* с установленной активностью 20 Dlm/см³ для белых мышей массой 16–20 г и токсин *C. tetani* с активностью 100 Dlm /см³.

Общую пробу сыворотки разливали в 5 пробирок по 1,5 см³, после чего в них вносили рабочие растворы токсинов в объеме 1,5 см³: в 1 – *C. perfringens* т. А, 2 – *C. perfringens* т. С, в 3 - *C. perfringens* т. D, 4 – *C. novyi*, 5 - *C. tetani*. Смесь токсинов с сывороткой перемешивали и прогревали 45 мин при температуре 37 °С. Затем каждую пробу смеси вводили 5 мышам внутривенно в дозе 0,5 см³.

Для контроля активности токсинов каждый из них разводили так, чтобы в 1,0 см³ раствора содержалось 2 Dlm для белых мышей массой 16–20 г. Растворы токсинов перемешивали, прогревали в термостате 45 мин при 37 °С и вводили внутривенно белым мышам в дозе 0,5 см³, используя по 5 мышей на каждую пробу. Критерием оценки являлась выживаемость подопытных животных в течение 72 часов. Вакцину считали активной, если после введения мышам 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 таблице 26.

Таблица 26 - 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> тип 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> тип 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> тип D	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 18 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. Заражающую культуру вводят внутримышечно в дозе 0,1 см³ с добавлением 0,2 см³ 10 % раствора хлористого кальция.

Вакцину считали активной, если после заражения выживаемость опытных морских свинок составляла не менее 80 % при гибели 80–100 % контрольных. Срок наблюдения за животными составлял 5 суток. Результаты исследования представлены в таблице 27.

Таблица 27 – 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 Клоствовак-8	1,0	5	5	100
		1,0			
3.	Контрольные	-	5	0	0

Иммуногенность вакцины в отношении *C. septicum* оценивали 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 лиофилизированной споровой культурой контрольного штамма №1098 в дозе 3 LD₅₀. Заражающую культуру вводили внутрибрюшинно в объеме 0,5 см³.

Вакцину считали активной, если в течение 3 суток после заражения выжило не менее 80 % иммунизированных белых мышей при гибели 80–100 % контрольных животных. Исследования представлены в таблице 28.

Таблица 28 - Контроль иммуногенной активности 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	Клоствовак-8	0,5	10	9	90
		0,5			
3	Контрольные	-	10	0	0

Как видно из представленных в таблицах 26, 27, 28 данных, экспериментальная вакцина обеспечивала образование заявленного уровня напряженности иммунитета практически у 100 % подопытных животных. Эти показатели не имели существенных отличий от иммуногенности моновакцин, при этом следует учитывать, что в обеих случаях животных иммунизировали одинаковыми дозами действующих веществ, только в комплексной вакцине они были более концен-

трированы. Вакцина обеспечивала 90 % выживаемости при заражении *C. septicum*, 100 % при заражении *C. chauvoei*, 90-100 % выживаемость мышей в РН токсинов *C. perfringens*, *C. novyi* и *C. tetani*.

Полученные результаты позволяют считать, что проведенная компоновка экспериментальной вакцины однородными компонентами позволила избежать отрицательного влияния их друг на друга при индуцировании иммунитета против широкого спектра болезней, вызываемых клинически значимыми видами клостридий.

Проведенные опыты по изучению интерференции между компонентами в поливалентной вакцине против клостридиозов животных, позволили подтвердить высокую иммуногенную активность комплексного препарата. Как видно из представленных в таблицах данных, между компонентами вакцины практически отсутствует отрицательное взаимное влияние, что проявляется выживаемостью 90-100 % использованных в опытах иммунизированных лабораторных животных, как в группах, вакцинированных моновакцинами, так и в группах вакцинированных поливалентной вакциной «Клостбовак-8».

4.6 Изучение стабильности препарата в процессе хранения и обоснованность срока годности

Наряду с безопасностью и эффективностью при использовании, стабильность свойств препарата при хранении является наиболее важным показателем качества лекарственного средства.

Для оценки стабильности свойств препарата в процессе хранения и установления срока его годности, проведен отбор образцов вакцины и закладка их на хранение. Препарат хранился в течение 24 месяцев в условиях фармацевтического холодильника при температуре 2 – 8 °С и влажности около 50 %. Через равные промежутки времени (6 мес) из общей пробы делали выборку и проводили исследование по всем параметрам, заложенным в СТО, сравнивая полученные результаты с данными при выпуске исследуемой серии. Оценивали внешний вид, стерильность, концентрацию водородных ионов, безвредность, иммуногенную активность. Результаты изучения стабильности представлены в таблице 29.

Таблица 29 - Стабильность свойств вакцины Клостбовак-8 в процессе хранения

Показатели	Норма	Серия вакцины	Срок хранения вакцины				
			0 мес.	6 мес.	12 мес	18 мес	24 мес
Внешний вид	Суспензия желтовато-серого цвета с рыхлым осадком, образующимся на дне флакона при хранении, легко разбивающимся при встряхивании	эксп. с.1	+*	+	+	+	+
		эксп. с.2	+	+	+	+	+
		эксп. с.3	+	+	+	+	+
Стерильность	Должна быть стерильна	эксп. с.1	+	+	+	+	+
		эксп. с.2	+	+	+	+	+
		эксп. с.3	+	+	+	+	+
рН, в пределах	7,0-7,7	эксп. с.1	7,24	7,24	7,20	7,20	7,20
		эксп. с.2	7,46	7,46	7,46	7,45	7,45
		эксп. с.3	7,32	7,32	7,31	7,29	7,29
Безвредность в тест дозе: -м/св-1,5 см ³ -ягнята-3 см ³	Должна быть безвредна	эксп. с.1	+	+	+	+	+
		эксп. с.2	+	+	+	+	+
		эксп. с.3	+	+	+	+	+

Примечания: «+» показатель отвечает требованиям НД; «-» показатель не отвечает требованиям.

Как видно из данных, представленных в табл. №29, на протяжении всего срока хранения экспериментальных серий вакцины проверяемые показатели оставались в пределах нормы. Препарат оставался стерильным, безвредным, изменение рН не выходило за пределы установленной нормы.

Стабильность иммуногенных свойств вакцины определяли согласно разработанным методам контроля по каждому компоненту, входящему в её состав. Для этого проводили иммунизацию кроликов, морских свинок и белых мышей вакциной, хранившейся при температуре 2-8 °С в течение 6, 12, 18 и 24 мес.

Изучение иммуногенности вакцины в отношении *C. tetani*, *C. novyi* и всех типов *C. perfringens* проводили по ранее описанной схеме. Через 14 дней после повторного введения у вакцинированных кроликов брали кровь, получали пробы сыворотки, которые использовали для постановки РН токсинов указанных видов клостридий, предварительно проверенных на активность. Эффективность препарата оценивали по выживаемости белых мышей, которым внутривенно вводили смесь токсина и сыворотки. Активность токсинов *C. perfringens* всех типов и *C.*

novyi, для РН устанавливали 20 Dlm/мл, токсина *C. tetani* – 200 Dlm/мл, контрольных животных заражали токсинами в дозе 1 Dlm. Смесь предварительно прогревали при 37 °С в течение 45 мин, затем вводили мышам. Учет результатов проводили через 72 ч после заражения. Результаты представлены в табл №30.

Таблица 30 - Стабильность антигенной активности компонентов вакцины *C. perfringens*, *C. tetani*, *C. oedematiens* 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.

Для изучения иммуногенности компонентов *C. chauvoei* и *C. septicum* вакцинировали морских свинок и белых мышей в установленных дозах. 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 штаммом *C. septicum* №1098 в дозе 3 Ld₅₀, срок наблюдения – 3 суток.

Таблица 31 - Стабильность иммуногенной активности компонентов вакцины *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	10/10
	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 таблицах 30 и 31 данных видно, что при хранении в условиях холодильника при температуре 2-8 °С и влажности около 50% иммуногенные свойства всех компонентов вакцины остаются стабильными на протяжении 24 месяцев наблюдения. Учитывая результаты опытов обоснованным сроком хранения является хранение препарата в течение 18 месяцев, по прошествии которых не установлено каких-либо изменений показателей качества в сторону их ухудшения.

4.8 Определение длительности иммунитета на лабораторных и восприимчивых животных

Одним из наиболее важных показателей оценки иммунологической полноценности иммунобиологических лекарственных средств является длительность индуцируемого ими иммунитета.

Длительность иммунитета против различных клостридиозов изучали вначале на лабораторных животных, а затем дополнительно на овцах, которых через равные промежутки времени заражали предварительно подтитрованными культурами контрольных штаммов возбудителей или их токсинами.

Изучение длительности иммунитета экспериментальной вакцины против клостридиозов по компоненту *C. chauvoei* проводили на морских свинках, для чего были сформированы 3 группы по 75 голов в каждой.

Первую группу свинок вакцинировали экспериментальной ассоциированной вакциной двукратно с интервалом 28 дней в объеме 1,0 мл, в котором доза компонента *C. chauvoei* составляла 0,3 мл; вторую группу животных иммунизируют

вали «Вакциной против эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота и овец концентрированной инактивированной», изготовленной одной из биофабрик РФ, в рекомендованной дозе 0,4 мл однократно в соответствии с инструкцией по применению; животных третьей группы не вакцинировали, одновременно с иммунизацией им вводили физиологический раствор в количестве 0,5 мл.

Для заражения из каждой группы отбирали пять морских свинок и отсаживали их в отдельный бокс. Для оценки иммунитета, образующегося после введения препаратов, морских свинок заражали предварительно подтитрованной дозой вирулентного штамма *C. chauvoei* R₁₅ в дозе 20 Ld₅₀. Заражение первой группы животных проводили через 14 дней после повторной вакцинации морских свинок ассоциированной вакциной и через 30 дней после вакцинации моновакциной. Одновременно с опытными проводили заражение 5 контрольных морских свинок. Заражающую культуру вирулентного для морских свинок штамма *C. chauvoei* R₁₅ вводили внутримышечно в объеме 0,1 мл с добавлением 0,2 мл 10 % раствора хлористого кальция. Учет результатов проводили через 5 суток. Результаты опыта представлены в таблице 32.

Таблица 32 - Иммуногенная активность экспериментальной вакцины в сравнении с моно-препаратом по компоненту *C. chauvoei*

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

Как видно из представленных в данных, обе вакцины обеспечивают через 14 дней 100% защиту иммунизированных морских свинок от заражения вирулентным штаммом *C.chauvoei* при 100 % гибели контрольных животных, что позволяет считать обоснованным заложенную в препарат дозу компонента.

Для изучения продолжительности иммунитета вакцинированных и контрольных животных содержали в тех же условиях на протяжении 13 месяцев. С интервалом в 30 дней от каждой группы отбирали по 5 морских свинок и подвер-

гали их заражению по уже использованной схеме, отслеживая таким образом продолжительность иммунитета. Полученные результаты отражены в таблице 33.

Таблица 33 - Продолжительность иммунитета у вакцинированных морских свинок

№	Группа животных	Выживаемость морских свинок при заражении <i>C. 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.	Клостбовак-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

Как видно из представленных в табл. №33 данных, ассоциированная вакцина вызывает у вакцинированных морских свинок напряжённый иммунитет, позволяющий выдерживать заражение вирулентной культурой в дозе 20 Ld₅₀. При этом выживаемость иммунизированных животных на протяжении первых 9 месяцев составляла 100%, затем снизилась до 80%, однако оставалась в пределах требований, регламентированных ГОСТ №32731-2014 «Вакцина против эмфизематозного карбункула крупного рогатого скота и овец», предписывающих, что выживаемость иммунизированных морских свинок после заражения не должна быть ниже 80 %. Через 12 месяцев после проведенной вакцинации напряженность иммунитета стала ослабевать, что выявлялось в гибели практически всех животных в группе. Проведенное параллельно исследование продолжительности иммунитета после однократного введения вакцины показало, что защита продолжается около 6-7 месяцев. После получения через 8 и 9 месяцев отрицательных результатов выживаемости, опыт было решено прекратить.

Полученные результаты позволяют считать обоснованным заложенную в препарат дозу компонента *C. chauvoei* 2,5 млрд. мкр. кл. в 0,3 мл, а также установить продолжительность иммунитета против эмфизематозного карбункула, вызываемого поливалентной вакциной при двукратном введении – 12 мес.

4.8.1 Определение длительности антитоксического иммунитета

Продолжительность иммунитета у лабораторных животных к различным токсоидам, входящим в состав препарата, оценивали по количеству антител, вы-

раженных в международных антитоксических единицах. Для опыта было сформировано две группы кроликов, 10 голов в опытной и 5 кроликов в контрольной группе. Животных первой группы вакцинировали экспериментальной серией вакцины двукратно с интервалом 25 дней в объеме 1,5 мл; вторую группу животных не вакцинировали, одновременно с иммунизацией им вводили физиологический раствор в равном количестве.

Через 14 дней после повторной иммунизации, а затем, через равные промежутки времени в 3, 6, 9 и 12 месяцев, у кроликов брали кровь, получали сыворотки и исследовали их в РН. Для оценки иммунитета, образующегося после введения препаратов, использовали токсины с предварительно установленной активностью относительно стандартных антитоксических сывороток. Одновременно с опытными проверяли наличие титра антител в крови контрольных животных, содержащихся в одинаковых условиях. Результаты реакции учитывали по выживаемости подопытных белых мышей через 24 ч после введения смеси. Результаты опыта представлены в таблице 34.

Таблица 34 - Продолжительность иммунитета у вакцинированных кроликов (титр антитоксических антител в сыворотке крови, МЕ/см³)

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

Как видно из данных таблицы №34, ассоциированная вакцина вызывала у вакцинированных кроликов образование антитоксических антител в высоких титрах. Так до иммунизации в крови у подопытных животных не было выявлено фоновых антител к исследуемым токсинам. Проведенная двукратная вакцинация позволила создать достаточно напряжённый иммунитет. Так через 14 дней после повторной вакцинации в сыворотки крови кроликов титр антитоксических анти-

тел 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, что соответствовало показателям иммунитета, индуцируемого импортными аналогами препарата. В течение первых трех месяцев после иммунизации количество антител в крови сохранялось практически на неизменном уровне, далее начинало постепенно снижаться. Через шесть месяцев титр антител составлял примерно половину от начального уровня, а к 12 месяцам уменьшался в 3-4 раза.

После окончания опыта, через 12 месяцев, все подопытные кролики были заражены вирулентными культурами клостридий, по существующей схеме контроля иммуногенности вакцины против браздзота овец. Опыт показал, что несмотря на значительное уменьшение титров антител к различным компонентам вакцины, у животных сохраняется невосприимчивость к заражению, обеспечивающая 100 % выживаемость вакцинированных кроликов при гибели практически всех животных в контрольных группах.

Полученные результаты позволяют считать длительность иммунитета 12 месяцев, после чего проводят ревакцинацию всего поголовья.

4.9 Иммуногенность вакцины на восприимчивых животных

Обеспечение эпизоотического благополучия местности по клостридиозам с использованием средств специфической профилактики, невозможно без определения продолжительности иммунитета после вакцинации. Длительность иммунитета против различных видов клостридий 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* тип В. Опыты в отношении *C. perfringens* не проводились, так как не удалось установить величину заражающей дозы штаммов, и вызвать гибель интактных животных. Опыты по заражению крупного рогатого скота не проводились в связи с невозможностью содержания столь значительного количества животных в течение 24 месяцев, а также невозможностью экспериментального заражения взрослых животных.

Для овец заражающую дозу каждого из указанных штаммов устанавливали согласно литературным данным и дополнительно проверяли на ограниченном количестве восприимчивых животных. Установлено, что величина Ld_{50} составляет для культуры *C. chauvoei* R_{15} $750 \pm 8,0$ млн. живых спор возбудителя, *C. septicum* $2,5 \pm 0,3$ млрд спор, *C. novyi* $15 \pm 1,6$ млрд спор. Доза столбнячного токсина, используемого для заражения овец, составляла 1000 Dlm для белых мышей. Все заражающие культуры 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. Результаты заражения представлены в таблице 35.

Таблица 35 - 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	2/3	1/3
		Контрольная	0/2	1/2	0/2	0/2
3.	<i>C. novyi</i>	Опытная	3/3	3/3	2/3	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

Длительность опыта по изучению продолжительности иммунитета у овец составляла 18 месяцев. Полученные результаты убедительно подтвердили наличие высокой степени невосприимчивости вакцинированных целевых животных к заражению высокими дозами возбудителя. Дальше опыт не проводили, так как в это время уже были получены данные по длительности иммунитета на морских свинках, из которых стало ясно, что больше 12 мес иммунитет к эмфизематозному карбункулу не сохраняется. Исключением являлась продолжительность иммунитета к столбняку, поскольку все животные на протяжении опыта оставались жи-

выми. Но срок повторной иммунизации устанавливается по компоненту с наименьшей продолжительностью.

Следует отметить, что при заражении овец, проведенном через месяц, а также через шесть месяцев после иммунизации, не было отмечено практически ни каких признаков развития инфекционного процесса. Наблюдалось кратковременное беспокойство подопытных животных, проявляющееся подергиванием конечностью, в которую была введена культура, животные как бы берегли её, старались держать на весу, оглядывались на неё. Однако при пальпации развитие отека, а также повышение местной температуры, отмечено не было. Через 12 часов после заражения подобные признаки больше не наблюдались.

Проведенный опыт показал, что вакцина обеспечивает образование иммунитета на срок не менее 12 мес, что подтверждается как заражением морских свинок, так и восприимчивых животных.

4.10 Специфическая эффективность вакцины на восприимчивых животных

Специфическую эффективность двух опытно-промышленных серий вакцины «Клосбовак-8» проводили в неблагополучных по клостридиозам хозяйствах Московской области, Республики Мордовия, Ставропольского и Краснодарского краев. В опытах было использовано 874 голов КРС различного возраста. Также проведено испытание препарата на 1234 головах мелкого рогатого скота. Во всех экспериментах определяли динамику заболеваемости различными инфекционными болезнями анаэробной этиологии у вакцинированных и контрольных животных, а также показатели гуморального иммунитета, который оценивали в РН по накоплению специфических токсиннейтрализующих антител у подопытных животных.

Учитывая, что препарат предназначен для применения на животных всех возрастных групп, в хозяйства проводили вакцинацию животных, возрастные категории которых были указаны в инструкции по применению. Животных иммунизировали подкожно в области средней трети шеи двукратно с интервалом 21-28 дней в объеме 3 см³. Для создания колострального иммунитета у телят против

анаэробных инфекций проводили двукратную иммунизацию стельных коров с таким расчетом, чтобы вторая вакцинация была за 25-30 дней до отела.

Полученные результаты, с целью подтверждения достоверности, подвергали вариационно-статистической обработке по методу И.П. Ашмарина и А.А. Воробьева [6]. При этом вычисляли среднеарифметические значения титра нейтрализующих антител и процент заболевших вакцинированных и контрольных животных, достоверную разность P по χ^2 между заболевшими животными в вакцинированных и контрольной группах, коэффициент корреляции (r) между средними титрами агглютининов и процентом заболевших животных, квадратичное отклонение (σ) полученных экспериментальных данных.

4.10.1 Специфическая профилактика анаэробной энтеротоксемии

В первом скотоводческом хозяйстве, ООО «Племзавод им. В.И. Чапаева» Динского района Краснодарского края, в течение полутора лет наблюдалась массовая гибель телят первых дней жизни. Уже через 24 – 72 часа после отела у новорожденных телят появлялись признаки инфекционного заболевания, проявляющегося вначале диареей с наличием в фекалиях крови и быстро нарастающей интоксикацией, угнетением и отказом от корма. Даже среди получавших лечение антимикробными и симптоматическими средствами животных наблюдалась высокий процент гибели. Заболеваемость телят составила до 32%, смертность до 76 %. Проведенное комплексное обследование хозяйства с последующим бактериологическим исследованием патологического материала, позволило поставить диагноз на заболевание животных анаэробной энтеротоксемией, вызванной высокотоксигенной культурой *C. perfringens* тип С.

Для эксперимента было сформировано две группы стельных коров. Животных опытной группы в количестве 140 голов иммунизировали вакциной «Клост-бовак-8» подкожно двукратно в дозе 3 мл с соблюдением правил асептики. У животных после первого, а также после повторного введения не было отмечено каких-либо системных и местных нежелательных реакций на введение препарата, в том числе анафилактики и аборт. На месте введения у отдельных животных

наблюдались слабо болезненные отеки размером примерно 5х10 см, которые самостоятельно исчезали через 7 -16 дней после инъекции.

Наблюдение за животными проводили в течение 60 суток после отела. Критерием оценки эффективности проведенной вакцинации считали получение здорового молодняка от подопытных животных, а также его сохранность в течение первых двух месяцев жизни.

Установлено, что в опытной группе 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 заболевших животных в течение 2-4 суток. Проведенное бактериологическое исследование материала от больных телят не выявило наличия в нем возбудителей анаэробной энтеротоксемии, во всех случаях причиной заболевания были культуры токсигенных эшерихий. Заболевания и гибели телят с признаками анаэробной энтеротоксемии, полученных от коров, иммунизированных вакциной «Клостбовак-8», не наблюдали.

Таким образом, опыт наглядно демонстрирует эффективность вакцины, обеспечивающей сохранность молодняка животных в опытной группе 98%, тогда как до вакцинации животных против клостридиозов, в частности анаэробной энтеротоксемии, заболеваемость телят составляла 32%, смертность 76 %.

Во втором хозяйстве, ООО «Болотниковское» Республики Мордовия, 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». Осложнений системного или местного характера после применения вакцины у животных не отмечалось. В качестве контрольной группы было оставлено 16 невакцинированных коров, которым одновременно с иммунизацией вводили физиологический раствор в аналогичном объеме.

После отела у всех животных опытной группы отмечено отсутствие новых случаев заболевания и гибели молодняка, с признаками, характерными для 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 животных. Бактериологическое исследование выявило наличие в патматериале энтеропатогенных культур эшерихий, токсигенные возбудители клостридиозов не обнаружены. Среди телят, полученных от 16 контрольных животных, заболело с признаками анаэробной энтеротоксемии 9, из которых пало 7 голов. Сохранность молодняка в опытной группе составила 100 %, тогда как в контрольной группе лишь 66 %.

4.10.2 Специфическая профилактика злокачественного отека у коров

Определение эффективности вакцины «Клостбовак-8» в отношении возбудителей злокачественного отека и браздзотоподобных инфекций крупного рогатого скота проведено в СПА «Колхоз имени Ворошилова» Новоалександровского района Ставропольского края.

Вакцинация проведена в связи с возникновением на МТФ нескольких случаев гангренозных маститов у новотельных животных. Заболевание начиналось остро, характеризовалось повышением температуры тела до 41,8 °С, нарастающим угнетением. Молокоотдача полностью прекращалась, выделялся экссудат краснокоричневого цвета с ихорозным запахом. В зависимости от локализации одна или несколько долей становились бугристыми, болезненными, значительно увеличенными. Кожа на пораженной доле приобретала темно-красный цвет с синюшным оттенком. По мере развития заболевания наблюдалось полное отслоение слоев кожи и распад глубже лежащих тканей. Местные лимфотические узлы были увеличены и болезненны. Иногда отек с вымени переходил на близлежащие ткани, брюшные мышцы и подкожную клетчатку, область промежности, бедренные мышцы. При надавливании в области отеков отчетливо слышались крепитирующие звуки. Даже в случае своевременно начатого лечения и изоляции животного,

как правило болезнь заканчивалась гибелью, но в большинстве случаев животных подвергали убою при первых признаках заболевания.

Всего из числа отелившихся в течение двух месяцев 56 голов заболело 4 животных. Несмотря на предпринятое комплексное лечение все они погибли. При проведении комплексного бактериологического исследования патологического материала с целью выявления возбудителей злокачественного отека, выделены культуры клостридий *C. septicum* и *C. oedematiens*. Также стоит отметить, что помимо анаэробов в материале обнаруживалось значительное количество сопутствующей микрофлоры, в частности стрептококки, стафилококки, различные виды энтеробактерий.

Для профилактики заболевания все поголовье стельных коров и нетелей в хозяйстве в количестве 58 голов было вакцинировано препаратом «Клостбовак-8» экспериментальной серии. Вакцину применяли согласно инструкции путем подкожного введения в дозе 3 см³ с интервалом 24 – 28 дней. Осложнений системного или местного характера после применения вакцины у животных не отмечено. Наблюдалось образование отеков на месте введения, проходящих в течение 7 -14 дней самопроизвольно. В качестве контрольной группы использовано 60 животных, которых не вакцинировали с целью получения объективной оценки эффективности препарата.

За период наблюдения, составивший 6 месяцев с начала опытов, 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, вызванных *C. septicum* и *C. novyi*.

В ЗАО «Путиловец» Павловского района Краснодарского края в середине 2010 г. сложилась критическая ситуация с заболеваемостью крупного рогатого скота. На фоне кормления некачественным силосом, возрасла заболеваемость но-

вотельных животных, что приводило к вынужденному убою и падежу животных. Через несколько дней после отела у внешне здоровых, с хорошей упитанностью, животных пропадал аппетит, наблюдалось угнетение, быстро прогрессировало исхудание. В последующем в области крупа либо бедренной группы мышц, реже другой лаголизации, начинали образовываться отеки, постепенно опускающиеся по подкожной клетчатке вниз. При надавливании в области поражений отчетливо слышались крепитирующие звуки.

Всего из числа отелившихся в течение двух месяцев 156 голов заболело 92. Несмотря на предпринятое комплексное лечение, восемьдесят коров погибли, либо были вынужденно убиты по причине не совместимых с жизнью поражений опорно-двигательного аппарата. При проведении комплексного бактериологического исследования патологического материала от 5 животных с целью выявления возбудителей болезни, выделены культуры *C. perfringens* тип A, *C. septicum*, *C. Oedematiens* и *C. sordellii*, в отдельных случаях вместе.

Для профилактики заболевания в хозяйстве все поголовье нетелей в количестве 135 голов было вакцинировано препаратом «Клостбовак-8». Вакцину применяли согласно инструкции путем подкожного введения в дозе 3 см³ с интервалом 24 – 28 дней. Осложнений системного или местного характера после применения вакцины у животных не отмечено. Образующиеся на месте введения отеки и уплотнения самостоятельно исчезали в течение 7 -14 дней.

За период наблюдения (60 дней) не было случаев выбраковки животных с признаками поражения мышц и развитием злокачественных отеков. Всего из группы заболело и выбыло 2 коровы, у одной из которых отмечалось травмирование копыт, а у второй - плеввропневмония. Поскольку лечение не вызывало улучшения состояния, молочная продуктивность полностью прекратилось, животные были подвергнуты вынужденному убою. Каких-либо признаков поражения мышечной ткани не наблюдалось, проведенное бактериологическое исследование не выявило наличия в тканях клостридий. Были выделены другие виды бактерий, в частности эшерихии и стрептококки, в связи с чем туши были направлены на промышленную переработку. Случаи гибели животных не отмечено. Таким

образом, сохранность поголовья после вакцинации составила 98,6%, тогда как до вакцинации была 52 %, что свидетельствует о высокой специфической эффективности вакцины «Клостбовак-8» для профилактики клостридиозов, вызванных *C. perfringens* тип А, *C. septicum*, *C. oedematiens*.

Еще одно исследование эффективности препарата проведено в ОАО «Кубань» Новопокровского района Краснодарского края. Основанием для проведения вакцинации послужило увеличение случаев заболевания и падежа коров от болезней клостридиозов. В соответствии с эпизоотологическими данными, клиническими признаками и патологоанатомическими изменениями был поставлен предварительный диагноз - злокачественный отек. За 6 месяцев, предшествующих проведению опыта, было зафиксировано 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*. Всего было вакцинировано 68 стельных коров и нетелей. После отела среди животных опытной группы не выявлено новых случаев заболевания и гибели коров, сопровождающихся злокачественным поражением различных систем и органов: не наблюдались случаи гангренозных метритов, маститов, поражения мышечных тканей. Сохранность вакцинированных животных составила 100%, полученного от них молодняка – 98,1 %.

4.10.3 Профилактика эмфизематозного карбункула

Поскольку в настоящее время вакцинации от эмфизематозного карбункула подлежат все поголовье КРС в возрасте от 3 мес до 4 лет, случаи заболевания являются единичными и связаны в основном с погрешностями при её проведении. Подобрать для эксперимента хозяйство, неблагополучное по эмфизематозному карбункулу, не представлялось возможным.

В связи с этим опыты по оценке профилактической эффективности препарата «Клостбовак-8» в отношении заболевания крупного рогатого скота эмфизематозным карбункулом проводилась в КФХ Пантюшина Старошайговского района Республики Мордовия. Стоит отметить, что ранее, более 30 лет назад, в

хозяйстве выявлялись спорадические случаи гибели крупного рогатого скота от заболевания, схожего по клиническими признакам с эмфизематозным карбункулом. Со слов ветеринарного врача хозяйства вскрытие и отбор проб для дополнительного исследования с целью подтверждения диагноза не проводился, трупы павших животных были уничтожены на месте путем сжигания с целью не допустить распространения инфицирования почвы и других окружающих объектов.

Учитывая, что ранее местность была неблагополучна по данному заболеванию, а также то, что споры возбудителя остаются жизнеспособными на протяжении продолжительного времени, все восприимчивое поголовье крупного рогатого скота в хозяйстве на протяжении более двух десятилетий подвергалось вакцинации коммерческим препаратом «Вакцина против эмфизематозного карбункула концентрированная инактивированная». Однако, учитывая, что в хозяйстве выявлялись также случаи заболевания животных другими болезнями клостридиозной этиологии, применение комплексного восьмивалентного препарата, обеспечивающего иммунитет в том числе к эмкару на срок не менее 12 месяцев, признано более актуальным.

С целью оценки препарата все восприимчивое поголовье крупного рогатого скота в хозяйстве было иммунизировано вакциной «Клостбовак-8». Всего привито 745 голов крупного рогатого скота в возрасте от 3 месяцев до 4 лет. Осложнений системного или местного характера после применения вакцины у животных не отмечалось. После проведенной вакцинации случаев заболевания животных эмфизематозным карбункулом не отмечали. Через 12 месяцев поголовье коров было ревакцинировано.

Учитывая, что с момента проведения исследований в 2009 - 2010 годах прошло значительно время, так же не отмечено случаев заболевания эмфизематозным карбункулом за весь наблюдения.

4.10.4 Профилактика столбняка сельскохозяйственных животных

Для определения эффективности вакцины Клостбовак-8 против столбняка проведена иммунизация вакциной против клостридиозов сельскохозяйственных животных «Клостбовак-8» 214 коров и нетелей, а также 350 телят.

Основанием для проведения вакцинации послужило выявление нескольких случаев заболевания телят 7 до 30 суточного возраста столбняком, при этом в трех случаях у новорожденных с признаками воспаления пупочного канатика и у одного теленка при загрязнении раны на голове после проведенной процедуры обезроживания. Все случаи закончились гибелью животных.

При проведении лабораторных исследований во всех случаях из патологического материала выделены культуры возбудителя *C. tetani*, обладающего высокой степенью токсичности, что подтверждено в опытах на белых мышах.

Вакцину вводили согласно инструкции по применению, при этом осложнений системного или местного характера после инъекций не отмечалось. Наблюдалось образование отеков, проходящих в течение 4 - 6 дней самопроизвольно.

В период наблюдения среди полученного от вакцинированных коров молодняка, а также среди вакцинированных телят не было выявлено ни одного случая столбняка, сохранность животных составила 100%.

Также отмечено, что среди подвергнутого вакцинации против клостридиозов молодняка при пастбище в летне-осенний период не наблюдалось случаев заболевания и гибели животных от различных анаэробных инфекций, спорадические случаи которых отмечались в хозяйстве ежегодно.

Полученные при проведении опытов данные наглядно демонстрируют, что вакцина против клостридиозов крупного рогатого скота поливалентная инактивированная «Клостбовак-8» безвредна для восприимчивых животных различных возрастов, и обладает высокой специфической эффективностью, предотвращая появление среди вакцинированных животных новых случаев болезни. Эффект профилактических мероприятий подтвержден при таких болезнях как анаэробная энтеротоксемия, злокачественный отек, вызванный ассоциацией различных видов, столбняк. Сохранность поголовья животных при проведении специфической профилактики увеличивалась с 20 до 98-100 %. При этом положительное воздействие использования препарата проявлялось не только в уменьшении случаев заболевания и гибели животных от болезней анаэробной этиологии, но так же отме-

чены и косвенные признаки оздоровления стада, например уменьшилось количество случаев заболевания конечностей, увеличиваясь молочная продуктивность.

При двукратной иммунизации у животных отмечен рост титра антител, нейтрализующих токсины *C. perfringens* типов A, B, C, D; *C. novyi (oedematiens)* тип B; *C. tetani*.

Эффективность использования поливалентной вакцины Клоствовак-8 против анаэробных инфекций вызванных различными видами бактерий рода *Clostridium spp.* на неблагополучных по данным инфекциям территориях наглядно подтверждается результатами исследований, что оформлено актами комиссионных испытаний. Доказана безвредность препарата, в том числе для глубокостельных животных, и его эффективность при профилактике клостридиозов у крупного рогатого скота.

Таким образом, в производственных условиях подтверждена безопасность и эффективность разработанной вакцины в качестве иммунопрофилактического препарата заболеваний, вызываемых *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. oedematiens*, *C. perfringens* типов A, B, C и D, *C. tetani*.

4.11 Эффективность применения вакцины «Клоствовак-8» в неблагополучных по клостридиозам овцеводческих хозяйствах

Поскольку полученные данные по изучению этиологической структура клостридиозов крупного рогатого скота подтверждают циркуляцию среди поголовья овец возбудителей тех же болезней, была проведена работа по изучения возможности использования вакцины для профилактики анаэробных болезней овец и оценки её эффективности. Работа выполнялась в стационарно неблагополучных хозяйствах, использующих для профилактики «Вакцину концентрированную против браздота, злокачественного отека, анаэробной энтеротоксемии овец и дизентерии ягнят». Использование данного препарата имеет ряд недостатков, таких как создание срока иммунитета на срок не более 4-6 мес., узкий антигенный состав, в сравнении с новым препаратом (отсутствие компонентов *C. perfringens* тип A, *C. chauvoei* и *C. tetani*), низкая степень очистки, что вызывает образование значи-

тельных отеков на месте введения. Учитывая, что разработанная вакцина Клоствовак-8 отвечает всем перечисленным требованиям, к тому же индуцирует у животных иммунитет продолжительностью не менее 12 мес, были проведены опыты по изучению эффективности овец различных возрастных групп.

Экспериментальные исследования с целью подтверждения эффективности препарата проводили в тех же овцеводческом хозяйстве Краснодарского края на маточном поголовье овец и полученных от них ягнятах. Хозяйство ранее не однократно прознавалось неблагополучным по различным клостридиозам, при этом заболевания у животных регистрировались ежегодно спорадически, что выявлялось как гибелью отдельных животных, так и достаточно многочисленных групп. Как правило, вспышки инфекций анаэробной этиологии возникали в летне-осенний период при выпасе животных на старой подсыхшей траве и после массовых хирургических обработок, особенно кастраций, и окотов.

Проведенный анализ заключений ветеринарных лабораторий показал, что спектр выделяющихся возбудителей достаточно широк: в разные годы от павших животных выделялись возбудители анаэробной энтеротоксемии и дизентерии, бродзота, злокачественного отека, эмфизематозного карбункула, столбняка.

Даже среди получавших лечение антимикробными и симптоматическими средствами животных наблюдалась высокий процент гибели. Так при вспышках бродзота заболеваемость откормочного молодняка достигала 35% при практически 100 % смертности. Следует учитывать, что наилучший эффект лечения животных при начале вспышки любого из перечисленных клостридиозов можно получить от применения специфических гипериммунных лечебных сывороток, которые в настоящее время не выпускаются биологической промышленностью.

Вакцинации против клостридиозов в хозяйстве ранее проводилась спорадически, при этом использовали вакцину против бродзота овец и вакцину против эмфизематозного карбункула животных. Однако после смены руководства предприятия основной упор для сохранности поголовья был сделан на специфическую профилактику болезней, так как помимо прямого ущерба от гибели животных, были косвенные: карантинные мероприятия, запрет на использование пастбищ и

сена, полученного с неблагополучных полей, дополнительные обработки анти-микробными препаратами и т.д.

Иммунизация вакциной «Клостбовак-8» проводилась согласно инструкции: маточное поголовье овец вакцинировали двукратно за 55-60 и 30-35 дней до окота, что предотвращало возникновение гангренозных эндометритов и маститов, а также способствовало формированию колюстрального иммунитета у новорожденного молодняка. Ягнят от иммунизированного маточного поголовья вакцинировали в возрасте 40- 45 дней с последующей однократной ревакцинацией в 6 мес.

Для оценки эффективности проводимых мероприятий были сформированы две группы овцематок, одну из которых вакцинировали, а вторая оставалась контрольной. Обе группы животных содержались в естественных условиях на выпасе с дополнительной подкормкой концентрированными кормами один раз в день.

После прохождения периода окотов вакцинации также были подвергнуты ягнята, полученные от вакцинированного поголовья.

Всего вакцинации препаратом «Клостбовак-8» было подвергнуто 800 голов овцематок, еще 140 голов оставлены в качестве контроля. Оценка эффективности использования вакцины проводили по следующим критериям: отсутствие гангренозных поражений органов у маток в период окотов, сохранность молодняка в неонатальный период, отсутствие выявленных случаев заболевания анаэробной этиологии за период откорма.

Эффективность проведенной вакцинации хорошо просматривается при сравнении с показателями заболеваемости и гибели животных за предыдущие годы, а также с контрольной группой овец, содержащихся по применяемой ранее в хозяйстве схеме без вакцинации против клостридиозов.

Всего от 800 голов вакцинированных овцематок было получено 1746 ягненка, при этом не было случаев выбытия по причине возникновения гангренозных поражений органов репродуктивной системы после окотов. Также за весь период вскармливания (до достижения ягнятами 40-45 дневного возраста) не отмечалось случаев массовой гибели ягнят от инфекционных болезней анаэробной этиологии. Падеж молодняка в количестве 12 голов происходил в виде единичных случаев,

патологоанатомическое исследование показало, что причиной являлись безоарная болезнь, колибактериоз и травмы.

В контрольной группе от 140 голов овец было получено 228 ягнят, при этом у контрольных животных было зафиксировано 3 случая гибели овец после окота с интоксикацией и поражением репродуктивных органов, а также два случая гангренозного мастита. Проведенное вскрытие и бактериологическое исследование подтвердило диагноз – злокачественный отек, при этом были выделены культуры *C. perfringens* и *C. novyi*.

В первые дни жизни наблюдалось появление у значительной части молодняка диспепсических явлений, приводящие к резкому угнетению с признаками интоксикации, поносы, снижение аппетита. Падеж первые 5 – 7 дней жизни составил 38 ягнят, при этом при бактериологическом исследовании выделена культура *C. 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 органов и тканей в контрольной группе у ягнят после проведенной кастрации. Через 4 – 8 дней после операции в стаде стали выявляться животные с признаками угнетения, снижения подвижности, залеживанием. При проведенном клиническом осмотре установлено, что все заболевшие (13 голов) являются валухами, случаев заболевания среди ярок не было. У больных 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 *C. oedematiens* и *C. perfringens* тип А.

Таким образом установлено, что использование вакцины «Клостбовак-8» способствовало стойкому благополучия стада по инфекционным болезням анаэ-

робной этиологии, несмотря на содержание овец в неблагополучной местности. Опыты показали, что вакцина является безопасным и эффективным препаратом.

Во втором овцеводческом хозяйстве, также расположенном в Краснодарском крае, исследования проводились на поголовье мелкого рогатого скота различных возрастных групп. Выбор данного предприятия был основан на том, что на протяжении значительного периода времени среди поголовья наблюдались спорадические случаи браздота, приводящие к гибели значительного количества животных. Хозяйство ранее каких-либо вакцинаций против клостридиозов не проводило. За исключением вакцинации против эмфизематозного карбункула. Вспышки браздота наблюдались практически ежегодно в осенний период года, при выпасе животных. Способствовало развитию болезни нарушение содержания животных, выпас которых проводился в утренние часы на холодной траве и выпивание воды из водоемов.

При последней зафиксированной вспышке заболевания, возникшей в отаре откормочного поголовья валухов, общей численностью 178 голов, заболело и погибло 44 животных, из которых 19 были вынужденно убиты в агональном состоянии. Заболеваемость составила 35,4 % при практически 100 % смертности.

Для предотвращения подобных случаев была проведена вакцинация всего поголовья согласно рекомендованной схеме двукратно за 55-60 и 30-35 дней экспериментальной серией вакцины «Клостбовак-8» №1, изготовленной ООО «Ветбиохим». Ягнят от иммунизированного маточного поголовья вакцинировали в возрасте 40- 45 дней с последующей однократной ревакцинацией в шести месячном возрасте. В общей сложности было иммунизировано 719 голов мелкого рогатого скота. Каких-либо изменений в режим содержания и кормления не вносили, овцы содержали в естественных условиях на выпасе с дополнительной подкормкой концентрированными кормами один раз в день. Наблюдение за животными вели в течение 12 мес до следующей вакцинации.

Оценку эффективности вакцинации проводили по отсутствию случаев браздота, а также заболеванию животных другими клостридиозами: анаэробной дизентерией и энтеротоксемией, злокачественными отеками и др.

Эффективность проведенной вакцинации хорошо просматривается при сравнении с показателями заболеваемости и гибели животных за предыдущие годы. Так в группе вакцинированных животных в количестве 719 голов не было зафиксировано случаев выбытия по причине возникновения каких-либо болезней анаэробной этиологии: браззота, гангренозных поражений органов репродуктивной системы после окотов, маститов. Также за весь период вскармливания (до достижения ягнятами 40-45 дневного возраста) не отмечалось случаев массовой гибели ягнят от анаэробной дизентерии и энтеротоксемии. Падеж молодняка (12 голов) происходил в виде единичных случаев. Патологоанатомическое исследование показало, что причиной являлись безоарная болезнь, колибактериоз и травмы.

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 животных различного возраста, в том числе суягных овцематок и молодняка

5 ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Клостридиозы широко распространены и причиняют значительный ущерб животноводству. Поскольку основным резервуаром возбудителей является почва, где споровые формы клостридий сохраняются десятилетиями, полностью исключить возникновение новых вспышек болезней невозможно. Для борьбы с анаэробными инфекциями используют широкий спектр методов, таких как дезинфекция помещений и мест падежа скота, лечение больных и подозреваемых по заболеванию животных, профилактическая вакцинация. Именно специфическая профилактика является основным способом предотвращения возникновения таких болезней, как злокачественный отек, эмфизематозный карбункул, анаэробная энтеротоксемия, столбняк и некоторых других.

В мире разработано и широко применяется с целью предотвращения вспышек клостридиозов у крупного и мелкого рогатого скота более 20 препаратов (Токсипра Плюс, Ультрачойс 8, Когловакс, Бар Вак® 10, Альфа 7МВ-1, ВанШо-

тУльтра 8, Миллениум, Multiclos, Bravoxin 10, Tribovax 10 Ultrabac 7/Somubac, PILIGUARD® Pinkeye +7, Ultrabac 8, Covexsin-10, Exelle 10, Cobalt 8, Vision® 7 with SPUR®, CAVALRY® 9, Fortress 7, Clostri Shield 7, Fermicon 7/Somnugen, TASVAX® 8, Ultravac 7 и другие. Вакцинации от клостридиозов подвергается весь высокопродуктивный скот как молочных, так и мясных пород. Учитывая столь широкий спектр препаратов, имеющих разнообразный состав антигенов, производители пользуются теми из них, которые наиболее актуальны в конкретной местности.

Учитывая высокую востребованность иммунобиологических средств для профилактики анаэробных инфекций КРС в других странах, вызывает некоторое недоумение отсутствие на протяжении длительного времени интереса отечественных исследователей к этому вопросу. Многие советские исследователи (Я.Р. Коваленко, Ф.И. Каган, А.В. Ляшкин, А.А. Волкова, М.Д. Польшковский и др.), занятые изучением клостридиозов и разработкой средств их профилактики и лечения, практически полностью уделяли внимание только болезням овец. При анализе литературы за практически 80 лет, начиная с 1931 г., когда в СССР стали выпускаться первые препараты против эмфизематозного карбункула и анаэробной дизентерии, встречаются лишь единичные статьи о проведении исследований в области эпизоотологии клостридиозов КРС и разработке вакцин для их профилактики. Единственным широко применяемым препаратом является инактивированная вакцина против эмфизематозного карбункула, разработанная в 1931 г. и с успехом применяемая до настоящего времени, и концентрированный столбнячный анатоксин для профилактики столбняка. Еще упоминается о трех препаратах: вакцина против эмфизематозного карбункула и злокачественного отека (Ф.И. Каган и Колесова, 1952 г.), препарат для профилактики клостридиозов сельскохозяйственных животных В.П. Земляковой и вакцина против анаэробно энтеротоксемии и эшерихиоза телят (автор Спиридонов, Казань). Однако несмотря на наличие патентов на эти препараты, статей, подтверждающих их эффективность ни один из этих препаратов не был внедрен в практику и ни когда не выпускался.

Объяснить отсутствие средств для профилактики анаэробных инфекций крупного рогатого скота в России можно несколькими причинами. Во первых, селекционная работа в России, а ранее и в Советском Союзе, была в большей степени направлена на выведении универсальных мясо-молочных пород, способных выживать в трудных условиях и обладающих высокой устойчивостью к болезням; во вторых, низкой продуктивностью животных, так как еще лет 20 - 25 назад удой 1,5-2,5 тыс литров молока за лактацию считался удовлетворительным показателем, такая продуктивность не подрывала здоровья животных; в третьих, крупный рогатый скот кормили в соответствии с его физиологическими требованиями, то есть основу рациона составляли грубые корма, в основном сено и солома. Это не приводило к нарушениям обмена веществ и развитию патологических состояний, таких как ацидозы, кетозы и т.д. В настоящее время для обеспечения генетически заложенной продуктивности в 8 – 10 тыс. литров молока и больше за лактацию, у животных преобладает концентратный тип кормления, что ведет при минимальных нарушениях к образованию кетоза, осложняющегося различными инфекционными болезнями; также к наиболее вероятным причинам можно отнести и то, что злокачественный отек и другие клостридиозы у крупного рогатого скота не приводили к массовым вспышкам, как у овец, когда за один день можно было потерять половину стада.

В двухтысячных годах Россия стала массово закупать в разных странах живой крупный рогатый скот как молочных, так и мясных пород. По данным РСХН РФ, за десять лет из Германии, Нидерландов, США, Австралии было завезено не менее одного миллиона голов скота. Это делалось для восполнения численности животных, поскольку за время девяностых и нулевых годов поголовье молочного стада в стране резко сократилось (с 1991 по 2005 г. поголовье КРС сократилось на 33 млн. голов), и для замены скота универсальных пород высокопродуктивными животными. Однако такой скот для обеспечения продуктивности требовал особых условий содержания, кормления и использования определенного спектра лекарственных средств. В частности сельхозпроизводители стали запрашивать на предприятиях ассоциированные

препараты для профилактики клостридиозов. К сожалению, таковых на начало 2009 года в РФ не существовало.

Именно возникшая острая потребность в препаратах для профилактики клостридиозов крупного рогатого скота привела к необходимости срочной разработки собственного отечественного препарата для вакцинации крупного рогатого скота от клинически значимых клостридиозов.

Однако создание препарата требовало изучения этиологической структуры клостридиозов для оценки оптимального состава вакцины, поскольку самые современные данные в этом направлении относились к семидесятым годам прошлого века, а также усовершенствования технологии изготовления моно-антигенов и разработка приемлемых методов количественного контроля напряженности иммунитета.

Работы велись параллельно, изучение спектра возбудителей проводили путем проведения бактериологических исследований материала от животных с характерной клиникой анаэробных инфекций. Материал был собран из 32 регионах РФ, в общей сложности исследовано 2913 проб от 1102 животных. В результате было выделено 714 изолятов клостридий различных видов, которые были идентифицированы и изучены с целью возможного использования в качестве производственных для изготовления ассоциированного препарата. Из числа выделенных культур наиболее клинически значимыми являлись виды *C. Septicum*, *C. perfringens mun A*, *C. perfringens mun C*, *C. perfringens mun D*, *C. oedematiens*, *C. sordellii*, *C. tetani*. Также, помимо основных возбудителей клостридиозов, единично выявлялись такие виды как *C. hystolyticus*, *C. innocuum*, *C. sporogenes*, *C. bifermentans* и некоторые другие. Следует отметить, что за время проведения исследований достаточно редко от крупного рогатого скота выявляли культуры возбудителя эмфизематозного карбункула. Связано это, в первую очередь, с тем, что в районах, куда можно было оперативно выехать для проведения исследований, в частности Московская, Рязанская и другие области, не относятся к неблагополучным по данной болезни местностям, а также с низкой толерантностью *C. chauvoei* к кислороду.

На основании полученных данных с целью создания вакцины были отобраны штаммы всех наиболее распространенных клостридий: *C. septicum*, *C. perfringens* типов *A*, *C* и *D*, *C. novyi*, *C. chauvoei*, *C. tetani*. Все отобранные для производства штаммы соответствовали необходимым требованиям, а именно были высоковирулентны, хорошо росли на питательных средах, обеспечивающих высокое и стабильное накопление специфических токсинов.

Однако для получения моноксигенов каждого вида клостридий, требовалось усовершенствовать технологию культивирования, инактивации, концентрирования и очистки антигенов. В первую очередь, требовалась замена питательных сред на более стабильные в плане стимулирования токсинообразования у клостридий. На ветеринарных биофабриках штаммы анаэробов выращивали на мясо-печеночных средах, а столбнячные культуры на мясо-казеиновой среде. Такие среды, во-первых, были нестабильны по биохимическому составу, во вторых, учитывая, что при откорме животных часто используются кормовые антибиотики, действовали на рост культур угнетающе; в третьих, были дороги, так как для изготовления требовалась только высококачественная говядина, полностью очищенная от соединительной ткани. Анализ литературы показал, что для производства препаратов против анаэробных инфекций за рубежом, а также для изготовления анатоксинов в медицинских биологических предприятиях, используются питательные среды на основе гидролизатов казеина. Такая среда с некоторыми модификациями и учетом видовых потребностей возбудителей была изготовлена и апробирована в производстве. Благодаря предварительно проведенной селекции штаммов и замене питательной среды удалось в 2-5 раз увеличить токсинообразование при культивировании анаэробов.

Еще одним не маловажным аспектом технологии являлось проведение процесса инактивации полученных токсинов. Существующая технология предусматривала однократное внесение высоких доз формалина в объеме до 1 % к объему культуральной жидкости. Связано это было с тем, что культивирование останавливали в момент начала споруляции культур, а для обеспечения гибели споровых форм требовалось значительное количество инактиванта и дополнительно прове-

дение процесса при повышенной температуре, как правило, процесс проходил при 37 °С. В дальнейшем, после проверки на остаточную токсичность, культуры осаждали гидроокисью алюминия, либо предварительно удаляли клетки центрифугированием, а анатоксины сорбировали осадителями с последующей декантацией. Такая инактивация приводила к очень высоким потерям антигенной активности анатоксинов, поэтому требовала корректировки процесса.

С целью предотвращения потерь антигенности, нами была отработана технология, состоящая из следующих этапов. Вначале в культуру вносили небольшое количество формальдегида, не более 0,2 - 0,3 % к объему культуры в ферментере и проводили частичную детоксикацию токсинсодержащей жидкости при комнатной температуре. Это позволяло снизить потери антигенной активности, а также провести процесс более мягко, не вызывая грубой денатурации белковых структур целевого продукта. К тому же, частично инактивированный токсин становился не чувствительным к кислороду и не разрушался при дальнейших обработках, в частности центрифугировании, фильтрации и ультрафильтрации культуральной жидкости. Через 48-72 часа инактивации малыми дозами формалина, культуры центрифугировали для удаления бактериальной массы, которую затем утилизировали, а частично инактивированный токсин подвергали вначале стерилизующей фильтрации, а затем ультрафильтрации в процессе которой концентрировали целевой продукт в 6-10 раз. Дополнительно проводили диафильтрацию с целью удаления балластных веществ, содержащихся в питательной среде, и осветления анатоксина. Для окончательной инактивации частично обезвреженного токсина после всех манипуляций к концентрату добавляли еще 0,2 - 0,3 % формалина.

Таким образом нам удалось получить высокоактивные моноанатоксины всех производственных штаммов клостридий, за исключением *C. septicum* и *C. sordelli*. Несмотря на все проводимые манипуляции, не удалось обеспечить необходимого для высокой иммуногенной активности уровня накопления специфического токсина, поэтому в состав препарат компонент *C. septicum* был введен в виде бактериин-токсоида, содержащий не только анатоксин, но и инактивированную массу бактериальных клеток, а *C. sordelli* был исключен совсем.

Изучение иммуногенной активности компонентов позволило определить наиболее оптимальную иммунизирующую дозу каждого из них, что в последствии было использовано при компоновке экспериментальной серии препарата. Каждый компонент вносился в него в количестве, обеспечивающем либо 80-100 % выживаемость после заражения иммунизированных животных, либо высокие титры анитоксических 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. Так совместное использование компонентов *C. perfringens* типов C и D, позволило увеличить титр антител к альфа-токсину *C. perfringens* тип A, а также полностью защитить от гибели животных, зараженных *C. perfringens* тип B.

Разработанная вакцина «Клостбовак-8» предназначена для иммунизации крупного и мелкого рогатого скота с целью создания невосприимчивости к болезням, вызываемым наиболее клинически значимыми клостридиями видов *C. chauvoei*, *C. septicum*, *C. novyi*, *C. perfringens* типов A, C и D, *C. tetani*.

Вакцина вызывает формирование иммунитета у крупного рогатого скота и овец против эмфизематозного карбункула, бродзота, злокачественного отека, некротического гепатита, анаэробной дизентерии ягнят, энтеротоксемии, синдрома «размягченной» почки, столбняка через 3 недели после повторного введения, продолжительностью не менее 12 месяцев. Препарат обеспечивает 80-100 % protectивную защиту вакцинированных животных.

Вакцина содержит сбалансированные в антигенном и иммуногеном отношении бактериальные и анитоксические антигены, которые позволяют создать напряженный иммунитет против наиболее клинически значимых возбудителей болезней, сопровождающихся гангренозным поражением органов животных, и обеспечить сохранность молодняка и взрослых животных, а также стабилизировать продуктивность.

Вакцина стала первым отечественным ассоциированным препаратом широкого спектра действия для профилактики клостридиозов КРС.

Вакцина обладает стабильностью, антигенной и иммуногенной активностью для создания напряженного и длительного иммунитета у иммунизированных животных и новорожденных телят против клостридиозов крупного рогатого скота.

Входящие в состав комбинированной вакцины штаммы клостридий *C. perfringens A, C, D, C. novyi* тип *B, C. tetani, C. chauvoei* являются давно используемыми проверенными производственными штаммами, однако впервые используются в составе вакцинных препаратов в таком составе.

Проведенные клинические и доклинические исследования позволили установить, что вакцина обладает безвредностью в рекомендованной эффективной дозе, предварительно установленной по каждому антигену, для всех видов целевых животных, а также для всех возрастных групп. Опыты проведены в 5 хозяйствах, в том числе на стельных коровах и телятах 40-45 дневного возраста и мелком рогатом скоте аналогичных категорий. При применении препарата не было отмечено случаев возникновения каких-либо серьезных нежелательных реакций как системного (анафилактический шок, аллергия, угнетение, аборт), так и местного характера (абсцессы, болезненные уплотнения, длительно не рассасывающиеся отеки).

Проверка специфической эффективности в пяти скотоводческих и двух овцеводческих хозяйствах позволила получить убедительные данные о высокой иммуногенной активности вакцины. Практически полностью удавалось остановить возникновение новых вспышек болезней анаэробной этиологии, таких как эмфизематозный карбункул, злокачественный отек, бродзот, анаэробная энтеротоксемия.

В итоге была разработана и внедрена в практику первая отечественная вакцина против клостридиозов крупного рогатого скота и овец «Клостбовак-8», создающая при двукратном введении у вакцинированных животных напряженный иммунитет к болезням, вызванным *C. perfringens* типов *A, B, C, D, C. chauvoei, C. tetani, C. oedematiens, C. septicum*, продолжительностью не менее 12 месяцев. Препарат зарегистрирован Россельхознадзором и применяется в ветеринарной практике. За период регистрации было реализовано более 1,5 млн. доз вакцины.

6. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

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

Специфическая профилактика оказывается 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 широкоприменяемым препаратом для профилактики анаэробных инфекций у КРС являлась вакцина против эмфизематозного карбункула.

Интенсивное развитие молочного 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 32 регионов РФ, в результате чего установлено широкое распространение клостридиозов, из числа которых наиболее клинически значимыми являлись *C. Septicum*, *C. perfringens* *munov A*, *C. D*, *C. oedematiens*, *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. oedematiens*, *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 по указанным свойствам культуры возбудителей клостридиозов были лиофилизированы, проверены на выраженность и стабильность свойств и аттестованы как MSB и WSB. Использование таких расплодков позволяет уйти от значительного количества пересевов культур и обеспечивает выпуск препарата стабильно высокого качества серий.

Поскольку для получения качественных препаратов против клостридиозов требуется стабильное накопление высокоактивных специфических токсинов, нами была усовершенствована технология их получения. Для этого 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 отработаны методы щадящей детоксикации антигенов, проходящих 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 полученного анатоксина, поскольку при инаktivации путем однократного внесения формалина в количестве 0,8-1,0% к объему, как это предусматривалось технологией, значительно снижается иммуногенность получаемых анатоксинов за счет грубой денатурации белка.

Наиболее важным изменением технологии изготовления моноантигенов клостридий является использование для концентрирования и очистки анатоксинов ультрафильтрации. Ранее все производимые в РФ для животных вакцины против клостридиозов изготавливались путем адсорбции бактериальных культур и содержащихся в среде анатоксинов добавлением адъювантов, как правило алюмокалиевых квасцов или гидроокиси алюминия. Использование тангенциальной филь-

трации позволило во первых в большей степени концентрировать целевые продукта (до 10-15 раз), тогда как при использовании осадителей концентрирование не превышало трехкратного увеличения концентрации; во вторых это позволило получать антигены с высокой степенью очистки от балластных веществ питательной среды и других метаболитов бактерий, образующихся в среде при культивировании. Это способствовало получению безопасных препаратов, что особенно проявляется в уменьшении местного раздражающего действия на месте введения, а также способствует увеличению напряженности иммунитета и увеличению его продолжительности, поскольку в организм попадают только отвечающие за иммуногенности антигены; в третьих такая 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 необходимого уровня иммунитета. 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* типов *A*, *B*, *C* и *D*.

Разработанная вакцина содержит сбалансированные в антигенном и иммуногеном отношении бактериальные и антитоксические антигены, и создает напряженный иммунитет против наиболее клинически значимых возбудителей клостридиозов, обеспечивая сохранность животных от эмфизематозного карбункула, злокачественного отека, столбняка, анаэробной энтеротоксемии, анаэробной дизентерии, бродзота и бродзотоподобных заболеваний, некротического гепатита, некротического энтерита и других болезней, ассоциируемых с анаэробами.

Вакцина обладает стабильностью, антигенной и иммуногенной активностью для создания напряженного и длительного, не менее 12 мес, иммунитета у вакци-

нированных животных, а также колостральный иммунитет у новорожденных телят, полученных от иммунизированных матерей.

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

В результате проведенной работы разработана и внедрена в практику первая отечественная вакцина против клостридиозов овец и крупного рогатого скота «КЛОСТБОВАК-8», создающий при двукратном введении у вакцинированных животных напряженный иммунитет к болезням, вызванным *C. perfringens* типов *A, B, C, D, C. chauvoei, C. tetani, C. oedematiens, C. septicum*, продолжительностью не менее 12 месяцев. Препарат зарегистрирован Россельхознадзором и применяется в ветеринарной практике. За период регистрации было реализовано более 1 млн. доз вакцины.

7. 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, браздота, 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 - BT, *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 Dlm/см³ α-, β-, ε-токсинов *C. perfringens* и токсина *C. novyi*, и 200 Dlm/см³ токсина *C. tetani*.

8. ПРАКТИЧЕСКОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Результаты, полученные при выполнении исследований, легли в основу разработанных методических указаний «Лабораторная диагностика клостридиозов животных», включающих современные методы диагностики болезней и идентификации возбудителей клостридиозов наиболее этиологически значимых видов возбудителей. МУК утвержденные РАН 28.08.2017 г.

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. Метод включен в нормативно-техническую документацию на методы контроля вакцины «Клостбовак-8» и на методы изготовления и контроля качества производственных штаммов клостридий: СТО на штаммы *C. perfringens*, *C. septicum*, *C. oedematiens*, *C. tetani*, *C. chauvoei*.

Разработана и утверждена нормативно-техническая документация на методы изготовления и контроля качества производственных штаммов клостридий: СТО на штаммы *C. perfringens* типов A, C и D, *C. septicum*, *C. oedematiens* тип B, *C. tetani*, *C. chauvoei*.

Разработана и утверждена нормативно-техническая документация на методы изготовления и контроля качества вакцины поливалентной «Клостбовак-8»: инструкция по применению, СТО организации, ТР.

9. РЕКОМЕНДАЦИИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Ветеринарным специалистам, курирующим животноводческие предприятия и индивидуальные крестьянско-фермерские хозяйства России, для специфической профилактики анаэробных инфекций крупного и мелкого рогатого скота в неблагополучных и угрожаемых по клостридиозам зонах, рекомендуется использовать лекарственный иммунобиологический препарат «Вакцина поливалентная против клостридиозов овец и крупного рогатого скота инактивированную».

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

Проводить депонирование в признанных коллекциях микроорганизмов штаммы возбудителей клостридиозов животных, обладающие полезными с технологической точки зрения свойствами: высокой токсигенностью, стабильностью образования токсинов, устойчивостью к диссоциации, с целью возможного использования в производстве новых 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 C №3, *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 крупного рогатого скота и овец, что позволит обеспечить высокое качество и стабильность выпускаемой продукции.

10. СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.

1. Алешкевич, В.Н. Совершенствование специфической профилактики анаэробной энтеротоксемии телят // автореф. дис. канд. вет. наук / В.Н. Алешкевич - Витебск. - 1992.
2. Андросик, Н.Н. Этиологическая роль энтеротоксигенных штаммов *Clostridium perfringens* типа А в заболевании телят энтеротоксемией / Н.Н. Андросик, К.В. Москалев // Известия Академии аграрных наук Республики Беларусь - №2 - 1999. С. 73-76.
3. Анисимов, В.С. Совершенствование методов изготовления средств активной и пассивной иммунизации овец против инфекционной энтеротоксемии / В.С. Анисимов, Н.И. Стаценко // В кн. «Инфекционные болезни овец» - Фрунзе. - 1976. - С.79-84.
4. Артаменко, В.Д. Использование экспериментально-аналитического метода для балансировки жидких питательных сред для роста и токсинообразования *C. perfringens* типа А / В.Д. Артаменко, Л.Г. Иванова, В.П. Ненашев и др. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 1985. – №11. – С. 37-41.
5. Ашенбреннер, А.И. Клинико-патоморфологические аспекты ассоциативного течения некробактериоза, актиномикоза и инфекционной анаэробной энтеротоксемии у маралов // Дисс. ... канд.вет.наук / А.И. Ашенбреннер А.И. – Барнаул, 2009. С.132.
6. Ашмарин, И.П. Статистические методы в микробиологических исследованиях / И.П. Ашмарин, А.А. Воробьев // Л.: Медгиз. – 1962. – С.180.
7. Бирюкова, С.В. Получение токсинов-анатоксинов эдематигенс в казеиновых питательных средах // Дисс. ... канд.мед.наук. / С.В. Бирюкова - Харьков, 1969.
8. Благовещенский, В.А. Концентрация и очистка анатоксина *C. septicum* / В.А. Благовещенский, И.П. Майорова // Материалы по обмену опытом. – М. – 1960. – С.76-80.
9. Благовещенский, В.А. Метод концентрации и очистки анатоксина *C. perfringens*, приготовленных на казеиновых средах. Сообщение 1. Концентрация анатоксина осаждением в изoeлектрической точке и изучение условий адсорбции и элюции концентратов / В.А. Благовещенский, Л.Я. Мармалевская, А.П. Кузьмина // Материалы по обмену опытом. – М. – 1960. – С.68-75.
10. Брок, Т. Мембранная фильтрация / Т. Брот // М. Мир. – 1987. – С.462.
11. Бургасов, П.Н. Эволюция клостридиозов / П.Н. Бургасов, С.Н. Румянцев // М.: Медицина. – 1974. – С.247.
12. Бурико, Б.Ю. Этиологическое значение клостридий при инфекционных заболеваниях крупного рогатого скота / Б.Ю. Бурико, А.В. Капустин // Тезисы доклады международной научной конференции. - Москва – 2011. - С. 47-48.
13. Виноградова, И.Н. Использование казеиново-растительных сред для получения токсинов возбудителей анаэробных инфекций / И.Н. Виноградова, В.А. Петренко, Н.А. Палкина и др. // Анаэробные инфекции: Труды межинститутской конференции. – М. – 1960. – Т 9. – С.101-103.
14. Волкова, А.А. Браздот овец и меры борьбы с ним / А.А. Волкова // Фрунзе. - 1953. - С.6-14.

15. Воробьев, А.А. Аппаратурно-технологическая схема изготовления анатоксинов анаэробных возбудителей // А.А. Воробьев, В.А. Зыбин, В.С. Корнеев. / Тезисы докладов межинститутской конференции по вопросам спец. профилактики инфекционных заболеваний. -Москва. - 1962. - С. 29-31.
16. Глотова, Т.И. Возбудители и возрастная восприимчивость крупного рогатого скота к клостридиозам / Т.И. Глотова, Т.Е. Терентьева, А.Г. Глотов // Сибирский вестник с.-х.науки. - 2017. - Т.47. - №1. - С.90-96.
17. Голшмид, В.К. Применение отечественных трубчатых мембран для очистки столбнячных антигенов / В.К. Голшмид, Г.В. Урум // В кн. «Материалы Всес. симп.». – Тбилиси. – 1984. – С.447-449.
18. Горелов, Ю.М. Иммуногенные свойства сухой ассоциированной вакцины против сибирской язвы и инфекционной энтеротоксемии овец. // Дисс. ... канд. вет. наук. /Ю.М. Горелов – Алма-Ата. – 1984. – С.188.
19. Горелов, Ю.М. Среда для культивирования клостридиозов / Ю.М. Горелов, А.С. Орешкин // Ветеринария. –№10. – 1980. – С.29-30.
20. ГОСТ 26503-85 Методы лабораторной диагностики клостридиозов // Москва. – 1985. - С.16.
21. Грязнова, Д.В. Разработка комплексных препаратов для профилактики и диагностики газовой гангрены // Дисс.... канд.биол. наук. / Д.В. Грязнова – Пермь. -1999. - С.120.
22. Егорова, Г.К. Идентификация *C.sordellii* на основе изучения свойств этого микроорганизма.// Дисс.... канд. мед. наук. / Г.К. Егорова - Москва –1978. – С. 196.
23. Езепчук, Ю.В. Патогенность бактерий / Ю.В. Езепчук // М.: Медицина. – 1985. – С.238.
24. Елизаровский, Г.И. Концентрированный столбнячный анатоксин / Дисс. ... доктора ветеринарных наук // Г.И. Елизаровский. – Архангельск. – 1964. – С.225.
25. Енгашев, С.В. 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. // Патент на изобретение RUS 2611351 27.01.2016.
26. Ефимова, М.Г. Токсинообразование в культурах клостридий септикум на питательных средах разного азотистого состава / М.Г. Ефимова // Тезисы докладов итоговой научной конференции. – Пермь. – 1985. – С.11-12.
27. Ефимова, Н.П. Разработка и экспериментальное обоснование производства препаратов против анаэробных инфекций // Дисс.... докт. мед. наук. / Н.П. Ефимова – Пермь. – 1971. – С.464.
28. Жуманалиев, А.Т. Клостридионосительство, факторы передачи возбудителей и усовершенствование мер борьбы с анаэробной гастротоксемией ягнят // Дисс. ...канд. вет. наук / А.Т. Жуманалиев – Фрунзе. – 1984. – С.193.
29. Зелевинская, С.А. Активная иммунизация против газовой гангрены // С.А. Зелевинская, З.И. Волкова, Н.С. Кашинцева и др. / Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – №9. – 1960.– С.10-15.

30. Землякова, В.П. Авторское свидетельство - Вакцинный препарат В.П. Земляковой против клостридиозов животных и птиц // Авт. св. № 6276, бюл. №5 - 1980.
31. Иванов, Ю.И. Статистическая обработка результатов медико-биологических исследований на микрокалькуляторах по программам / Ю.И. Иванов, О.Н.Погорелюк. // М. Медицина. – 1990. – С.219.
32. Исполатовская, М.В. Структура и функции токсина *C. perfringens*. / М.В. Исполатовская // Биохимия. – 1970. – Т.35. – №3. – С.434-439.
33. Каган, Ф.И. Производственное испытание концентрат- вакцины против эмфизематозного карбункула, злокачественного отека и пастереллеза крупного рогатого скота // Ф.И. Каган, Н.М. Никифорова, А.И. Колесова / Труды ГНКИ – 1964. – С. 245-248.
34. Каган, Ф.И. Получение бета-токсина Кл. перфрингенс на казеиново-панкреатической среде // Ф.И. Каган, Л.В. Кириллов, К.Р. Ургуев, И.Д. Панфилов, А.С. Плеских, З.А. Пашаева / Труды ВГНКИ. - Москва. - 1974. - Т.20. - С.194-198.
35. Каган, Ф.И. Специфическая профилактика и терапия анаэробных инфекций // Дисс. доктора вет.наук. / Москва. – 1964.- С.326.
36. Каган, Ф.И. Испытания поливалентной концентрированной вакцины против браздота, энтеротоксемии, злокачественного отека овец и дизентерии ягнят //Ф.И. Каган, А.И. Колесова, Л.Д. Панкратов / Труды ГНКИ. – Т. 12. – 1964. – С. 245-248.
37. Каган, Ф.И. Ассоциированная иммунизация животных // Ф.И. Каган / Сельскохозяйственная биология. – 1966. – Т.1. – С.491-496.
38. Каган, Ф.И. Опыт одновременной вакцинации против эмфизематозного карбункула и сибирской язвы // Ф.И. Каган, Я.Р. Коваленко / Советская ветеринария. – 193223-24. – С.17-20.
39. Каган, Ф.И. Производственное испытание концентрат- вакцины против эмфизематозного карбункула, злокачественного отека и пастереллеза крупного рогатого скота // Ф.И. Каган, Н.М. Никифорова, А.И. Колесова / Труды ГНКИ. – №13. – 1966. – С.18-22.
40. Каган, Ф.И. Специфическая профилактика клостридиозов животных // Ф.И. Каган, Л.В. Кириллов / Москва. – 1976. – С.152.
41. Калиниченко, Н.Ф. Иммунологическая эффективность тетранатоксина (*C. perfringens*, *C. oedematiens*, *C. tetani*, *C. septicum*) в эксперименте // Н.Ф. Калиниченко / Вопросы производства вакцин и сывороток. - Киев. - 1968. - С.56-58.
42. Каменева, М.А. Некоторые аспекты получения высокоактивных токсинов *C. oedematiens* типа А на казеиновых средах // Автореф. дисс. ... канд. биол. наук / М.А. Каменева. - Пермь. – 1974. – С.23
43. Каплунова, О.П. Клостридиозы и их диагностика // О.П. Каплунова, Д.С. Курдина / В сб.: Стандарты, штаммы и методы контроля бактериальных и вирусных препаратов. – Москва. - 1981. - С.149-152.
44. Каплунова, О.П. Экспресс-диагностика клостридиозов, вызываемых Кл. перфрингенс //Автореф. дис. ... канд. мед. наук / О.П. Каплунова. – Москва, 1983 - С.21.

45. Капустин, А.В. Эпизоотология и профилактика клостридиозов крупного рогатого скота // А.В. Капустин, Т.И. Алипер / Единый мир – единое здоровье. Материалы межд. вет. конгресса. - 2017. - С. 106-108.
46. 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), - 2017.- С. 352-248.
47. 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.
48. 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, - 2017. - С. 170-175.
49. 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.
50. 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.
51. Капустин, А.В., Определение концентрации и кратности введения компонента *S.chauvoei* при разработке ассоциированных вакцин.// Капустин А.В., Глушкова Ю.А. / Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов АПК, материалы научно-практической конференции, посвященной 95-летию Армавирской биофабрики - 2016. - С.229-234.
52. Капустин, А.В. Изучение иммуногенной активности столбнячного компонента в составе ассоциированной вакцины против клостридиозов крупного рогатого скота. // Капустин А.В., Лаишевцев А.И., Гулюкин А.И., Шемельков Е.В., Скляр О.Д. / Ветеринария Кубани. - №4. - 2016. – С. 15-17.
53. 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.
54. 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(60) - 2016. - С. 241-248.

55. 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.

56. 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.

57. 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.

58. 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 докладов международной научной конференции, посвященной 80-летию организации ВГНКИ - 2011. - С. 53-54.

59. Капустин, А.В. Столбняк сельскохозяйственных животных / Капустин А.В. // Ветеринария и кормление. №6 – 2009. - С. 55-56.

60. Кириллов, Л.В. Инфекционная анаэробная энтеротоксемия животных / Л.В. Кириллов, З.Х. Межиева // Российский ветеринарный журнал. 2007 - №3. - С. 4-9.

61. Кириллов, Л.В. Стандартизация вакцин, анатоксинов и антитоксических сывороток, применяемых для специфической профилактики клостридиозов // Дисс. ... докт. ветеринарных наук / Л.В. Кирилов. – Москва. – 1984. – С.305.

62. Коваленко, Я.Р. Анаэробные инфекции сельскохозяйственных животных // Я.Р. Коваленко / Москва. – 1954. – С.338.

63. Козлов, М.П. Использование мембранной технологии разделения компонентов жидких смесей // М.П. Козлов, В.П. Дубяга / Пластмассы. - 1982. - №9. – С.49.

64. 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 of Agricultural and Socio-Economic Sciences.- 3(63), - 2017.- С. 188-194.

65. 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.

66. Комиссаров, А.В. Применение ультрафильтрации для концентрирования и очистки антигенов // А.В. Комиссаров, Ю.А. Алешина, О.Г.Громова, А.К. Ники-

- форов, С.А. Еремин и др. / Проблемы особо опасных инфекций, вып. 1 – Саратов - 2015. - С.79-84.
67. Комкова, О.А. Ускоренная диагностика возбудителей газовой гангрены новыми методами // О.А. Комкова / Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунологии. - №5. - 1958. - С.40-44.
68. Кремлев, Т.И. Качество анаэробных анатоксинов и пути их совершенствования // Т.И. Кремлев, Т.А. Миронова, М.А. Соловьева / Актуальные вопросы иммунопрофилактики вирусных и бактериальных инфекций: Мат. Всес. научн. конф. – Томск. - 1981. - С.164-169.
69. Кружнов, Н.Н. Лабораторная модель для контроля иммуногенной активности анатоксинов *Clostridium perfringens* и *Clostridium oedematiens* // Н.Н. Кружнов, / Дис. ... канд. вет. наук, - Москва, - 1991. С.168
70. Курлович, Д.В. Разработка и апробация вакцины ассоциированной против колибактериоза и анаэробной энтеротоксемии телят / Д.В. Курлович, В.К. Карпович, Н.В. Москалева // Ветеринарная наука - Минск -2001. - Вып. 35 - С. 108-113.
71. Кэтти, Д. Антитела. Методы / Д. Кэтти, Ч. Райкундалия, Дж. Браун, Н.Р. Линг // М.: Мир. - 1991. - Т.1. - С. 287.
72. Лабораторная диагностика клостридиозов // Методические рекомендации – Харьков. - 1979. - С.20.
73. Лаишевцев, А.И. Технологическая селекция иммуногенных изолятов *Staphylococcus hyicus*, перспективных для конструирования вакцинных препаратов. / Лаишевцев А.И., Капустин А.В., Верховский О.А., Пименов Н.В. // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. № 5. - 2017.- С. 120-126.
74. 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. Т. 57. - № 9. - 2016. - С. 97-104.
75. Липский, Л.И. Анаэробная клостридиальная инфекция операционных ран // Л.И. Липский, В.В. Дроздов, В.В. Хомяков и др. / Хирургия. - №5. - 1985. - С.110-112.
76. Ляушкин, А.В. Методы профилактики и борьбы с браздотом и браздотоподобными заболеваниями // Автореф. дис... канд.вет.наук/ А.В. Ляушкин. Москва. - 1957. - С.12.
77. Ляушкин, А.В. Бивалентная формолвакцина против инфекционной энтеротоксемии и браздота овец // А.В. Ляушкин / Труды ГНКИ. - 1952. - Т.3. - С.188-194.
78. Маничев, А.А. Препараты для специфической профилактики, лечения и диагностики сибирской язвы сельскохозяйственных животных // Дис.... доктора вет. наук / А.А. Маничев. - Москва, 1996. - С.274.
79. Маянский, А.Н. Микробиология для врачей // А.Н. Маянский / Клостридии. – Нижний Новгород. - 1999. - С.139-152.
80. Мельников, В.Н. Анаэробная инфекция // В.Н.Мельников, Н.И. Мельников / Москва. - Медицина. - 1973. - С.288.

81. Мельников, Н.И. Ферменты патогенности и токсины бактерий // Н.И. Мельников, В.Н. Мельников, М.Г. Гимранов / Москва. – Медицина. – 1969.- С.252.
82. Методические рекомендации по балансированию микробиологических питательных сред // Москва. - 1987. - С.40.
83. Методическое руководство по лабораторной оценке качества бактериальных и вирусных препаратов (ГНКИ им. Л.А.Тарасевича) // Москва. – 1972.- С.247-286.
84. Методические указания по лабораторной диагностике инфекционной энтеротоксемии и анаэробной дизентерии ягнят / Утверждены ГУВ МСХ СССР – Москва. - 1984. - С. 4.
85. Ненашев, В.П. Перспективы повышения эффективности производства гангренозных анатоксинов // В.П. Ненашев, В.Д. Артеменко, И.И. Кузнецова и др. // Вопр. прикладной иммунологии. - Уфа. - 1980. - С.30.
86. Ненашев, В.П. Получение очищенных анатоксинов *C. oedematiens* из концентрированных токсинов с использованием казеиновых питательных сред // В.П. Ненашев, В.Д. Артеменко / Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1971. - №1. - С.87-90.
87. Нестеров, И.А. Эмерджентные преобразования перфрингеоза животных на Северном Кавказе / И.А. Нестеров // Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных. Москва. - 2006. - С. 103-107.
88. Никитин, В.М. Методы экспресс-диагностики раневой инфекции // В.М. Никитин / В сб.: Эпидемиология и микробиология раневых инфекций. - 1986. - С.47-49.
89. Николаева, А.М. Экспериментальное обоснование и разработка промышленного способа получения очищенного сорбированного стафилококкового анатоксина из очищенного токсина // Автореф. дисс. ... канд. биол. наук / А.М. Николаева. - Алма-Ата. -1981. - С.16.
90. Новоселова, Г.Н. Экспериментальные материалы к разработке реакторного метода получения токсинов *C. perfringens muna A* // Дисс. ... канд. биол. наук / Г.Н. Новоселова – Пермь. – 1972.- С. 218.
91. Панин, А.Н. Основные требования к производственным и контрольным штаммам микроорганизмов / А.Н. Панин, Н.Т. Татаринцев // Ветеринария. - 1993. - №4. - С. 28-29.
92. Патент РФ № 2462263. Применение бактерий *Clostridium perfringens muna C* для производства вакцины // М.Х. Витвлит, Й.Ф. Смутс, К. Редхед -2012.
93. Патент РФ №2428202. Вакцина ассоциированная против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят / Г.Н. Спиридонов, А.А. Иванов, Х.Н. Макаев, М.Т. Хурамшина, А.Г. Спиридонов, Э.Р. Галиуллина // 2011. - Бюл. №25.
94. Патент РФ №2311197. Способ получения протективной белоксодержащей фракции бактерий // М.В. Киселевский, Ф.Т. Доненко, К.Е. Воюшин, А.В. Тришин и др. / 2007.
95. Патент СССР №2816459/28-13. Способ получения токсинов клостридий // Н.Ф. Калиниченко, С.В.Бирюкова, З.Г.Старобинец / SU 986100 А. - 1979.

96. Первова, Л.М. Разработка и испытание ассоциированной вакцины против эмфизематозного карбункула и лептоспироза крупного рогатого скота // Дисс. ...канд. ветеринарных наук / Л.М. Первова. - Москва. - 1988. - С.135.
97. Перепечкина Н.П. Некоторые особенности ультрафильтрации иммунобиологических препаратов // Н.П. Перепечкина, А.Н. Мац, Г.Ю. Келлер и др. / Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1986. - №6. - С.48-50.
98. Перепечкина, Н.П. Мембранное разделение в совершенствовании вакцинных препаратов. Иллюзии и реальность // Н.П. Перепечкина, А.В. Сиротинский, Л.А. Сиротинская / Современная вакцинология: Тезисы докладов. Пермь. 1998. С.77-78.
99. Петров, В.Ф. О многоэтапном метрологическом подходе к проблеме оценки результатов количественного иммуноферментного определения антитоксических антител // В.Ф. Петров, А.М. Николаева, В.А. Иванова и др. / Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1998. - №2. - С.43-46.
100. Пинчук, Л.М. Неспецифические эффекты в твердофазных иммуноферментных методах // Л.М. Пинчук / Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1987. - №5. - С.110-117.
101. Плеских, С.А. Разработка и испытание живой ассоциированной вакцины против сибирской язвы и эмфизематозного карбункула крупного рогаотого скота // Дисс. ... канд. вет. наук / С.А. Плеских - Москва - 1992. - С. 131.
102. Польшковский, М.Д. Анаэробная дизентерия ягнят // Дисс. ...докт. вет. наук. / М.Д. Польшковский, Москва. - 1948. - С. 364.
103. Постникова, Т.М. Совершенствование методов определения *in vitro* а-токсина и а-антитоксина *Clostridium perfringens muna A* // Автореф. дисс. ... канд. биол. наук / Т.М. Постникова. - Москва. - 1988.- С.124.
104. Пушкарев, А.А. Сорбированный анатоксин клостридиум септикум и его иммунологические свойства // Актуальные вопросы иммунопрофилактики вирусных и бактериальных инфекций //А.А. Пушкарев / Томск. - 1981. - С.177-179.
105. Радионова, К.П. Клостридиозы сельскохозяйственных животных / К.П. Радионова, О.В. Карабанова // Ветеринария сельскохозяйственных животных. - 2010. - №9. - С. 12-14.
106. Раскин, Б.М. Зависимость токсинообразования *C. tetani* от состава питательной среды // Б.М. Раскин, В.К. Голшмид / Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1973. - №11. - С.145-146.
107. у/Ратгауз Г.Л. К вопросу об оптимизации процессов приготовления анатоксинов // Г.Л. Ратгауз, А.К. Акатов, А.М. Поверенный и др. // Вопр. прикладной иммунологии. - Уфа. - 1980. - С.54-56.
108. Редкозубова, Л.И. Контроль клостридий - систематическая вакцинация /Л.И. Редкозубова // Ветеринария. - 2016. - т. №1.- С. 9-12.
109. Самуйленко, А.Я. Биотехнология, 2-ое переработанное издание. // А.Я. Самуйленко, Ф.И. Василевич, Е.С. Воронин, И.В. Тихонов, С.А. Гринь, В.А. Гаврилов, Т.Н. Грязнева и др. - Москва. - 2013. - С. 746.

110. Свищева, Н.Д. Биологические и серологические свойства возбудителя газовой гангрены // автореф. дисс. ... канд. биол. наук / Н.Д. Свищева. Москва. - 1964. - С.340.
111. Семенова, В.Д. Концентрирование токсина *C. perfringens* методом ультрафильтрации // В.Д. Семенова, А.М. Николаева / Актуальные проблемы прикладной иммунологии, биотехнологии и производства бактериальных препаратов. – Пермь. – 1968. – С.41-42.
112. Семенова, В.Д. Применение полых волокон для концентрации токсина перфрингенс // В.Д. Семенова / Тез. докладов научн. конф. - Пермь. - 1984. - С.11-12.
113. Семенова, В.Д. Экспериментальная и технологическая разработка способа получения очищенного анатоксина перфрингенс с использованием мембранных методов разделения // автореф. дисс. ... канд.биол. наук / В.Д. Семенова. - Москва. - 1990.- С. 144.
114. Сергеева, Т.И. Экспериментальное обоснование методов экстренной иммунопрофилактики газовой гангрены // Т.И. Сергеева, Е.В. Чирикова, В.А. Бабайцева / Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. - 1995. - №5. - С.9-13.
115. Сергеева, Т.И. Возбудитель столбняка *Clostridium tetani* // Т.И. Сергеева. Ю.Ф. Белый / Руководство по медицинской микробиологии под редакцией А.С. Лабинской. – Москва. - 2012. - С. 294-310 .
116. Сергеева, Т.И. Клостридии – возбудители газовой гангрены. // Т.И. Сергеева. Ю.Ф. Белый / Руководство по медицинской микробиологии под редакцией А.С. Лабинской. - Москва. - 2012. - С. 310-329.
117. Сергеева, Т.П. Методологические основы системы активной иммунопрофилактики газовой гангрены // Т.П. Сергеева, Г.И. Кремлев, Е.В. Чирикова / Материалы VII съезда Всероссийского об-ва эпидемиол., микробиол. и паразитол. – Москва. - 1997. - С.140-142.
118. Скляров, О.Д. Изучение безопасности применения ассоциированной вакцины против клостридиозов крс для животных различных возрастных и физиологических групп. / Скляров О.Д., Капустин А.В., Лаишевцев А.И. // Труды Кубанского государственного аграрного университета. 2017.- №65. - С 124-130.
119. Скляров, О.Д. Интерференция компонентов в поливалентной вакцине против клостридиозов крупного и мелкого рогатого скота / Скляров О.Д., Капустин А.В. // Российский ветеринарный журнал. 2017. -№ 1.- С. 20-23.
120. Соловьев, Л.Б. Изучение сухой споровой культуры *Clostridium chauvoei* для проверки иммуногенной активности вакцин против эмфизематозного карбункула // Дисс....канд. вет. наук / Л.Б. Соловьев – Москва. - 1970. - С.173.
121. Спиридонов, А.Г. Разработка и оценка эффективности вакцины ассоциированной против анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят // Дисс.канд. биол. наук / А.Г. Спиридонов - Казань. - 2013. - С.162.
122. Сторожев, Л.И. Сравнительное изучение живых и убитых вакцин против эмфизематозного карбункула // Дисс....канд.вет.наук / Л.И. Сторожев - 1977. - С.168.

123. Стремовский, Л.Л. Методы интенсификации процессов мембранного разделения суспензионных полидисперсных систем в биотехнологических производствах // Л.Л. Стремовский / Антибиотики и мед. биотехнология. - 1986. - №6. - С.472-475.
124. 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 научно-практической конференции, посвященной 95-летию Армавирской биофабрики. - 2016. - С.348-355.
125. Сухина, М.А. Характеристика анаэробных бактерий при гнойно-воспалительных и желудочно-кишечных заболеваниях. // Диссканд. биол. наук. / М.А. Сухина – Ставрополь. – 2005. – С.155.
126. Сычева, Л.П. Некоторые методы концентрации и очистки анатоксинов Кл. эдематинс и Кл. перфрингенс // Л.П. Сычева, Л.И. Матвеева, М.Н. Ретник / Биологические препараты, иммунология, реактивность организма. - Томск. - 1973 - Вып.4. - С.55-56.
127. Терентьева, Т.Е. Видовой спектр бактерий рода *Clostridium*, выделенных от крупного рогатого скота на молочных комплексах / Т.Е. Терентьева, Глотов А.Г., Глотова Т.И., Котенева С.В. // Российский вет. журнал. - Вып. 1.- 2016. – С.5-9.
128. Торбан, М.А. Азотистые продукты в бульонах Глузмана и токсинообразование столбнячной палочки // М.А. Торбан, И.И. Брысова, Н.П. Панина / Сб. научн. трудов Ставропольского НИИВС. -1958. - С.139-150.
129. Торбан, М.А. О механизме обезвреживания токсинов формалином // М.А. Торбан / Биохимия. – 1960. – Т.25. – №1. – С.28-33.
130. Урбан, В.П. Анаэробная энтеротоксемия поросят и телят на крупных фермах // В.П. Урбан, В.И. Шнур, О.Е. Воробьев / Вестник с.х. нуки.- №2 - 1981. - С. 100-106.
131. Ургуев, К.Р. Энтеротоксемия крупного рогатого скота // К.Р. Ургуев / Ветеринария. - 1965. - № 4. - С.34-36.
132. Ургуев, К.Р. Клостридиозы животных // К.Р. Ургуев / Россельхозиздат. - Москва. - 1987. - С.183.
133. Ургуев, К.Р. Инфекционная энтеротоксемия овец на зимних пастбищах Дагестанской АССР // Дисс. ...канд. вет. наук / К.Р. Ургуев - Москва. - 1966. - С.169.
134. Хазанова, В.В. К вопросу об изучении токсикоинфекционных свойств *C. perfringens* // В.В. Хазанова / Лаборное дело. - 1969. - №3. - С.164-167.
135. Хангажинов, А.А. Распространение патогенных анаэробов в различных типах почв Республики Бурятия и эпизоотологический мониторинг вызываемых ими клостридиозов // Дисс. ... канд.вет.наук / А.А. Хангажинов - Улан-Удэ. - 2012. - С.148.
136. Хоулт, Дж. Определитель бактерий Берджи / Дж. Хоулт, Н. Криг, П. Снит, Д.Ж. Стейли, С. Уильямс // Москва. – Мир. - 1997. – Т.1. – С. 432.

137. Черноусов, Н.М. Роль токсигенного и микробного компонентов Кл. перфрингенс в иммунитете при инфекционной энтеротоксемии овец. // Дисс. ...канд. вет. наук. / Н.М. Черноусов - Алма-Ата. - 1969. - С. 186.
138. Шандренко, В.Д. Выделение и очистка комплекса противогангренозных антител методом поливалентной иммунсорбции, очистки // Дисс. ... канд. мед. наук / В.Д. Шандренко - Пермь. - 1997. - С.99.
139. Шапиро, Н.И. К обоснованию общей теории детоксикации экзотоксинов // Н.И. Шапиро, И.В. Москвичева / Вакцины и сыворотки. - Вып.16. - 1973. - С.1732.
140. Шатиго, П.Д. Роль слепней как переносчиков эмфизематозного карбункула КРС./ П.Д. Шатиго. – ж. Ветеринария - №7 – 1952.- С. 76-79.
141. Шелли, Ш.И. Почвенные анаэробные бактерии рода *Clostridium*, географическое распространение и азотфиксирующая активность // Дисс. ... канд. биол. наук / Ш.И. Шелли - Москва. - 1985. - С.167.
142. Широчина, Т.П. Использование ультрафильтрации при производстве белковых гидролизатов // Т.П. Широчина, Э.М. Трефилов, Э.М. Ляная и др. // Биотехнология. - 1985. - №5. - С.32-33.
143. Al-Mashat, R.R. Production of diarrhoea and enteric lesions in calves by the oral inoculation of pure cultures of *Clostridium sordellii* // R.R. Al-Mashat, D.J. Taylor / Vet. Rec. - 1983. - 112. - P.141–146.
144. Awad, MM. Synergistic effects of alpha-toxin and perfringolysin O in *Clostridium perfringens*-mediated gas gangrene // MM. Awad, DM. Ellenor, RL. Bod, JJ. Emmins, JI Rood / Infection and Immunity. - 2001. - 69. - P. 7904.
145. Bacciarini, LN. Immunohistochemical localization of *Clostridium perfringens* beta2-toxin in the gastrointestinal tract of horses // LN. Bacciarini, P. Boerlin, R. Straub, J. Frey, A. Grone / Veterinary Pathology. - 2003.- P. 376-381.
146. Ballard, J. Activation and mechanism of *Clostridium septicum* alpha toxin // J. Ballard, Y. Sokolov, W.L. Yuan, B.L. Kagan, R.K. Tweten / Mol. Microbiol. -1993. - 10. - P.627-634.
147. Beiz, J. Die endogene *Clostridium septicum* - infektion // J. Beiz, Th. Mansfeld, H. von Kroge / Chir. Prax. - 1994. - Vol. 48. - N1. - P.59-61.
148. Benjaminson, M.A. Rapid purification of fluorescent enzymes by ultrafiltration // M.A. Benjaminson, T. Satyanarayana / Biochem. - 1983. - Vol.13. - N1. - P.41-44.
149. Billington, S.J. *Clostridium perfringens* type E animal enteritis isolates with highly conserved, silent enterotoxin gene sequences // S.J. Billington, E. Wieckowski, M. Sarker, D. Bueschel, J.G. Songer, B.A. McClane / Infection and Immunity. - 1998. - 66. - P.4531-4536.
150. Blood, DC. Veterinary medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, goats and horses // DC. Blood, OM. Radostits, JA. Henderson / 6th ed. London: Bailliere Tindall. – 1983.- P.1520-1563.
151. Bohnert, S. Uptake and transport of clostridium neurotoxins // J.E. Alouf, M.R. Popoff / The Comprehensive Sourcebook of Comprehensive Bacterial Protein Toxins, 3rd edition. – 2006. - P.390–408.

152. Brahan Robert, B. Clostridium septicum as a cause of pericarditis and mycotic aneurysm // B. Brahan Robert, C. Kahler Ralph / Clin. Microbiol. - 1990. - Vol.28. - N10. - P. 2377-2378.
153. Brüggemann, H. The genome sequence of *C. tetani*, the causative agent of tetanus disease // H. Brüggemann / Proc. Natl Acad. Sci. (USA). - 2003. – P.1316–1321.
154. Bueschel, D. Enterotoxigenic *C. perfringens* type A necrotic enteritis in a foal // D. Bueschel, R. Walker, L. Woods / Journal of the American Veterinary Medical Association - 1998. – 213. - P. 1305-1307.
155. Campbell, J.I. Microbiologic characterization and antimicrobial susceptibility of Clostridium tetani isolated from wounds of patients with clinically diagnosed anus // J.I. Campbell / Trop. Med. Hyg. - 2009. - P. 80:827–831.
156. Ceci, L. Haemorrhagic bowel syndrome in dairy cattle: possible role of Clostridium perfringens type A in the disease complex // L. Ceci, P. Paradies, M. Sasanelli et al. / J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. – 2006. – №53. – P. 518-23.
157. Chakravorty, A. The pore-forming alpha-toxin from Clostridium septicum activates the MAPK pathway in a Ras-c-Raf-dependent and independent manner //A. Chakravorty / Toxins (Basel). – №7. – 2015. – P. 516–534.
158. Chen, C. Gangliosides as high affinity receptors for tetanus neurotoxin //C. Chen / J. Biol. Chem. – 2009. – 284. – P. 26569–26577.
159. Chen, C. Molecular basis for tetanus toxin coreceptor interactions // C. Chen / Biochemistry. – 2008. – №47. – P.7179–7186.
160. Choi, YK. Clostridium perfringens type A myonecrosis in a horse in Korea // YK. Choi, MS. Kang, HS. Yoo et al. / J Vet Med Sci. - 2003. - 65. - P. 1245-7.
161. Deinhardt, K. Tetanus toxin is internalized by a sequential clathrin-dependent mechanism initiated within lipid microdomains and independent of epsin1 // K. Deinhardt / J. Cell Biol. - 2006. - 174. - P. 459-471.
162. Dennison, AC. Comparison of the odds of isolation, genotypes, and in vivo production of major toxins by Clostridium perfringens obtained from the gastrointestinal tract of dairy cows with hemorrhagic bowel syndrome or left-displaced abomasum // AC. Dennison, DC. Van Metre, PS. Morley et al. / Journal of the American Veterinary Medical Association. - 2005. - P. 227 - 132.
163. Dorca-Arevalo, J. Binding of epsilon-toxin from Clostridium perfringens in the nervous system // J. Dorca-Arevalo, A. Soler-Jover, M. Gibert et al. / Veterinary Microbiology. - 2008. - 131. - P. 14-25.
164. Dray, T. Clostridium perfringens type A and beta2 toxin associated with enterotoxemia in a 5-week-old goat // T. Dray / Canadian Veterinary Journal. - 2004. - 45. - P.251-253.
165. Ellis, T.M. Acute abomasitis due to Clostridium septicum infection in experimental sheep// T.M. Ellis, J.B. Rowe / Australian Veterinary Journal.-1983.- 60.- P.308-309.
166. Embury-Hyatt, CK. Investigation of a syndrome of sudden death, splenomegaly, and small intestinal hemorrhage in farmed deer // CK. Embury-Hyatt, G. Wobeser, E. Simko, MR. Woodbury / Canadian Veterinary Journal. - 2005. - 46.- P. 702-708.

167. Eustis, S.L. Suppurative abomasitis associated with *C. septicum* infection // S.L. Eustis, M.E. Bergeland / Journal of the American Veterinary Medical Association. - 1981. - 178. - P.732-734.
168. Facury Filho, EJ. Clinicopathological features of experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia in cattle // EJ. Facury Filho, AU. Carvalho, RA. Assis / Veterinary Pathology. - 2009.- P.303-314.
169. Fane, A.U. Ultrafiltration lactivated sludge system development of a productive voll // Ultrafiltration, membran and application // A.U. Fane, C.J. Fell, T. Norm // Plenum Press. - New York. - 1980. - P.631-658.
170. Fang, Z. Practical study on detection and identification by gas chromatography // Z. Fang / Microbiology. - 1989. - P.343-347.
171. Fernandez Miyakawa, ME. Both epsilontoxin and beta-toxin are important for the lethal properties of *Clostridium perfringens* type B isolates in the mouse intravenous injection model // ME. Fernandez Miyakawa, D.J. Fisher, R. Poon et al / Infection and Immunity. – 2007. - 75. - P. 1443-1452.
172. Fernandez Miyakawa, ME. Morphological and physiological changes induced by *Clostridium perfringens* type A toxin in the intestine of sheep // MME. Fernandez, FA. Uzal / American Journal of Veterinary Research. - 2005. - 66. - P. 251-255.
173. Fernandez-Miyakawa, ME. Lethal effects of *Clostridium perfringens* epsilon toxin are potentiated by alpha and perfringolysin-O toxins in a mouse model // ME. Fernandez-Miyakawa, BH. Jost, SJ. Billington / Veterinary Microbiology. - 2008. - 127. - P.379-385.
174. Ferrarezi, M.C. Genotyping of *Clostridium perfringens* isolated from calves with neonatal diarrhea // M.C. Ferrarezi, T. Cardoso / Anaerobe. – 2008. – 4 – P. 328-331.
175. Finegold, S.M. Anaerobic infections of lungs and pleura // S.M. Finegold / In: Pulmonary diseases and disorders – N.Y., St. Louis. – 1980. – Vol.2. – P.1152-1163.
176. Finnie, JW. Histopathological changes in the brain of mice given *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin. // JW. Finnie / Journal of Comparative Pathology.– 1984. – 94.- P. 363-70.
177. Finnie, JW. Pathogenesis of brain damage produced in sheep by *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin: a review // J.Finnie / AustralianVeterinary Journal. - 2003. - 81. - P. 219-221.
178. Finnie, JW. Ultrastructural changes in the brain of mice given *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin // JW. Finnie / Journal of Comparative Pathology. – 1984. – 94:445-52.
179. Fisher, DJ. Dissecting the contributions of *Clostridium perfringens* type C toxins to lethality in the mouse intravenous injection model // DJ. Fisher, ME. Fernandez-Miyakawa, S. Sayeed / Infection and Immunity. - 2006. - 74. - P. 5200-5210.
180. Flaschel, E. Ultrafiltration for the separation of bio- catalysts // E. Flaschel, M. Wandreu ch. Hula / Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology. - 1983. - N 26. - P.173-182.
181. Flores-Diaz, M. Role of *Clostridium perfringens* phospholipase C in the pathogenesis of gas gangrene // M. Flores-Diaz, A. Alape-Giron / Toxicon. - 2003. - 42. - P. 979-986.

182. Francoise, M. Solid phase enzyme immunoassays of pertussis toxin using peroxidase or biotin labeled antibodies // M. Francoise / J. Immunoassay. – 1987. – Vol. 8. – N1. – P.43-51.
183. Frey, J. Cytotoxin CctA, a major virulence factor of *Clostridium chauvoei* conferring protective immunity against myonecrosis // J. Frey / Vaccine. – 2012. – 30. – P.5500–5505.
184. Genth, H. Haemorrhagic toxin and lethal toxin from *Clostridium sordellii* strain VPI9048: Molecular characterization and comparative analysis of substrate specificity of the large clostridial glucosylating toxins // H. Genth // Cell Microbiol. - 2014. – P.1706–1721.
185. Gibert, M. Beta2 toxin, a novel toxin produced by *Clostridium perfringens* // M. Gibert, C. Jolivet-Reynaud, MR. Popoff / Gene. - 1997. - P. 65-73.
186. Gibert, M. *Clostridium perfringens* iota-toxin requires activation of both binding and enzymatic components for cytopathic activity // M. Gibert, L. Petit, S. Raffestin, A. Okabe, M.R. Popoff / Infection and Immunity. - 2000. - 68. P.- 3848-3853.
187. Gorbach, S.L. Rapid diagnosis of anaerobic infection by direct gas-liquid chromatography of clinical specimens // S.L. Gorbach, J. Mayhew, J.G. Bartlett / J. Clin. Invest. - 1976. - Vol.57. - N2. - P.478-484.
188. Gordon, V.M. *Clostridium septicum* alpha-toxin is proteolytically activated by furin // V.M. Gordon, R. Benz, K. Fujii, S.H. Leppla, R.K. Tweten / Infection and Immunity. -1997. - 65. - P.4130-4134.
189. Greco, G. Enterotoxemia associated with beta2 toxin-producing *Clostridium perfringens* type A in two Asiatic black bears (*Selenarctos thibetanus*) // G.Greco, A. Madio, V.Martella / Journal of veterinary diagnostic investigation. - 2005. - 17.- P. - 186-189.
190. Griesemer, RA. Enterotoxemia in beef calves-30 years observation // R.A. Griesemer, WR. Krill / J Am Vet Med Assoc. –1962. – 140: 154-8.
191. Griner, LA. *Clostridium perfringens* type D (ETX) enterotoxemia in brown swiss dairy calves // LA. Griner, WW. Aichelman, GD. Brown / J Am Vet Med Assoc. – 1956. – 129: 375-6.
192. Guesdon, J.L. Solid phase immunoassays // J.L. Guesdon, S. / Appl. Biochem. Bioeng. – 1981. – Vol. 3. – P.207-232.
193. Guttenberg, G. Inositol hexakisphosphate-dependent processing of *Clostridium sordellii* lethal toxin and *Clostridium novyi* alpha-toxin // G. Guttenberg / J. Biol. Chem. – 2011. – 286: 14779–14786.
194. Haun, M. Biotinylated antibodies bound to streptavidin beads: a versatile solid matrix for immunoassays // M. Haun / Analyt. Biochem. – 1990. – Vol. 191. – P.337-342.
195. Herholz, C. Prevalence of beta2- toxigenic *Clostridium perfringens* in horses with intestinal disorders // C. Herholz, R. Miserez, J. Nicolet / J Clin Microbiol. – 1999. – 37. –P.358-361.
196. Heuck, A.P. The cholesterol-dependent cytolysin family of gram-positive bacterial toxins // A.P. Heuck / Subcellular Biochemistry. - 51. - P. 551–577.

197. Hickey, MJ. Molecular and cellular basis of microvascular perfusion deficits induced by *Clostridium perfringens* and *Clostridium septicum* // MJ. Hickey, RY. Kwan, MM. Awad et al. / Pathog. - 2008. - 4. - P.319-324.
198. Holdsworth, R.J. Development of an ELISA assay for *Clostridium perfringens* phospholipase (Alpha toxin) // R.J. Holdsworth, D. Parraff // Immunoassay. - 1994. - Vol.15. - N3. - P.293-304.
199. Holliday M.G. Rapid identification of *Clostridium perfringens* by counter-immunoelectrophoresis // M.G. Holliday / Medical Laboratory Sciences. - 1985. - Vol.42. - N 4. - P.322-325.
200. Honda, T. Differential detection of cholera enterotoxin and *E.coli* heat-labile enterotoxin by enzyme-linked immunosorbent assays with antibodies specific to the two toxins // T. Honda, M. Sato, T. Miwatani / Journal of Clinical Microbiology. - 1984. - Vol.20. - N4. - P.664-667.
201. Huang, IH. Disruption of the gene encoding sporulation transcription factor blocks endospore formation and enterotoxin production in enterotoxigenic *Clostridium perfringens* type // IH. Huang, M. Waters, RR. Grau, MR. Sarker / FEMS Microbiol Lett. - 2004. - P.233.
202. Hughes, ML. Epsilon-toxin plasmids of *Clostridium perfringens* type D are conjugative // ML. Hughes, R. Poon, V. Adams et al / J Bacteriol. - 2007. - 189. - 7531-8.
203. Jackson, S.G. A double antibody sandwich enzyme-immunoassay for *Clostridium perfringens* // S.G. Jackson, D.A. Yip-Chuck, M.H. Brodsku / J.Immunol. Meth. - 1985. - Vol.83. - N1. - P.141-150.
204. Jores, J. Occurrence and prevalence of *Clostridium perfringens* in polar bears from Svalbard, Norway // J. Jores, AE. Derocher, C. Staubach, A. Aschfalk / Wild Dis. - 2008. - 44. - 155-8.
205. Jost, H. Atypical *cpb2* genes, encoding beta2-toxin in *Clostridium perfringens* isolates of nonporcine origin // BH. Jost, SJ. Billington, HT. Trinh, DM. Bueschel, JG. Songer / Infection and Immunity. - 2005. - 73. - 652-6.
206. Keast, J.C. A case of bovine enterotoxemia // JC. Keast, E.J. McBarron / Australian Veterinary Journal. - 1954. - 56. - P.305-6.
207. Kennedy, C.L. Pore-forming activity of alpha-toxin is essential for *Clostridium septicum*-mediated myonecrosis // C.L. Kennedy / Infection and Immunity. - 2009. - 77. - P. 943-951.
208. Kennedy, C.L. Programmed cellular necrosis mediated by the pore-forming alphatoxin from *Clostridium septicum* // C. Kennedy, DJ. Smith, D. Lyras, A. Chakravorty, J.L. Rood / PLoS Pathog. - 2009. - 5. - P.1516.
209. Kuhnert, P. Identification of *Clostridium chauvoei* in cultures and clinical material from blackleg using PCR // P. Kuhnert, M. Krampe, S.E. Capaul, J. Frey, J. Nicolet / Vet. Microbiol. - 1997. - 57:291-298.
210. Giraudo Conesa, L.C. Detection of *Clostridium chauvoei* in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues of sheep by the peroxidase-antiperoxidase (PAP) technique // L.C. Giraudo Conesa, S.A. Vannelli F.A. Uzal / Veterinary Record. - 1995. - 19. - P.451- 456.
211. Le, M.S. Membranes in downstream processing // M.S. Le, P.J. Billigheimer / Chem. Eng. - 1985. - N416. - P.48-53.

212. Lebrun, M. The expression of *Clostridium perfringens* consensus beta2 toxin is associated with bovine enterotoxaemia syndrome // M. Lebrun, P. Filee, B. Mousset / *Vet Microbiol.* - 2007. - 120.- P. 151-157.
213. Manteca, C.A Role for the *Clostridium perfringens* beta2 toxin in bovine enterotoxaemia // C. Manteca, G. Daube, T. Jauniaux / *Veterinary Microbiology.* - 2002. - 86.- P. 191-202.
214. Manteca, G. Bacterial intestinal flora associated with enterotoxaemia in Belgian Blue calves // G. Manteca, V. Daube, B. Pirson et al. / *Veterinary Microbiology.* – 2001. – P. 21-32.
215. McClane, B.A. The enterotoxigenic clostridia. The Prokaryotes // B.A. McClane, F.A. Uzal, M. Fernandez-Miyakawa, D. Lyster, T.D. Wilkins, S.F.M. Dworkin, E. Rosenberg, K.F. Schleifer, E. Stackebrandt / *New York.*, – 2004. – P.698-752.
216. Mukamoto, M. Analysis of tryptophan-rich region in *Clostridium septicum* alpha-toxin involved with binding to glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins // M. Mukamoto / *Microbiol. Immunol.* –2013. – 57:163–169.
217. Multer, T. *Clostridium septicum* gangrene complicating a closed femoral fracture // T. Multer, M. Morgan M, G. Fabry / *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica.* – 1993. – Vol. 59. – N4. – P.416-419.
218. Nagahama, M. *Clostridium perfringens* beta-toxin is sensitive to thiol-group modification but does not require a thiol group for lethal activity // M. Nagahama. A. Kihara, T. Miyawaki / *Biochim Biophys Acta.* – 1999. – 1454:97-105.
219. Nagahama, M. Enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of toxins from *Clostridium perfringens* // M. Nagahama, K. Kobayashi, S. Ochi, J. Sakurai / *FEMS Microbiol Lett. Can*– 1991. – 68:41-4.
220. Nakano, P.K. Peroxidase-labelled antibody. A new method of conjugation // P.K. Nakano, A.J. Kawaoi / *Histochem, Cytochem.* – 1974. – Vol.22. – N12. – P.1084-1091.
221. Niilo, L. Bovine enterotoxemia. II. Experimental reproduction of the disease // L. Niilo, R.E. Moffatt, R.J. Avery / *Canadian Veterinary Journal.* - 1963. - 4. - P.- 288- 297.
222. Niilo, L. *Clostridium perfringens* in animal disease: a review of current knowledge // L. Niilo / *Canadian Veterinary Journal.* - 1980. - 21.- P.141-148.
223. Niilo, L. Experimental production of hemorrhagic enterotoxemia by *Clostridium perfringens* type C in maturing lambs // L. Niilo / *Canadian Veterinary Journal.* – 1986. – 50. –P. 32-35.
224. Nowalowska, M. Zastosoosowame testu elisa do wykrywania toksyn *Clostridium perfringens* typu A. // M. Nowalowska, M. Jadwiga, M. Bartocze / *Med. dosw. mikrobiology.* – 1988. – Vol.40. – N3. – P.149-154.
225. Oakley, C.L. The toxins of *Cl. Welchii* // C.L. Oakley / *Bull. Hygiene.* – 1943. – Vol. 18. – N10. –P.781-805.
226. O'Brien, DK. Effects of *Clostridium perfringens* alpha-toxin (PLC) and perfringolysin O (PFO) on cytotoxicity to macrophages, on escape from the phagosomes of macrophages, and on persistence of *C. perfringens* in host tissues // DK. O'Brien, SB. Melville / *Infection and Immunity.* – 2004. - 72. - P. 5204-15.

227. Oda, M. The relationship between the metabolism of sphingomyelin species and the hemolysis of sheep erythrocytes induced by *Clostridium perfringens* alpha-toxin // M. Oda, T. Matsuno, R. Shiihara / *J Lipid Res.* – 2008. – 49:1039-47
228. Phillips, K.D. Rapid diagnosis of anaerobic infection by gas-liquid chromatography of clinical material // K.D. Phillips, P.V. Tearle, A.T. Willis / *J. Clin. Path.* – 1976. – Vol.29. – N5. – P.428-432.
229. Popoff, M. Overview of *Clostridium* identification. In: *Diagnosis, epidemiology and antibiotic resistance of the genus Clostridium* // M. Popoff, C. Duchesnes, J. Mainil, S. Pelkonen, M.G. Menozzi / *Presses Fac. Méd. Vét. ULg, Liège, Belgium.* – P.15-21.
230. Popoff, M.R. Clostridial pore-forming toxins: Powerful virulence factors // M.R. Popoff / *Anaerobe.* – 2014. – P. 30:220–238.
231. Popoff, M.R. Genetic characteristics of toxigenic *Clostridia* and toxin gene evolution // M.R. Popoff / *Toxicon.* - 2013. - 75:63–89.
232. Prescott, J.F. Clostridial infections // J.F. Prescott, D.S. McVey / *Veterinary Microbiology*, 3rd edition. - P.245.
233. QaDan, M. pH-Enhanced Cytopathic Effects of *Clostridium sordellii* Lethal Toxin // M. QaDan / *Infection and Immunity.* - 2001. - 69. - P. 5487–5493.
234. Radostits, O.M. Enterotoxemia caused by *Clostridium perfringens* types B, C and E // O.M. Radostits, C.C. Gay, D.C. Blood, K.W. Hinchcliff / In: *Veterinary Medicine: a textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses.* – 2000. - 9. - P.770.
235. Rethy, L. Human lethal dose of tetanus toxin // L. Rethy / *Lancet.* - 1997. – P. 1518.
236. Riccio, J.A. *Clostridium septicum* sepsis and celebris: A rare complication of the hemolytic-uremic syndrome // J.A. Riccio, O.R. Oberkircher / *Pediat. Infec. Disease J.* –1988. – P.342-345/
237. Robinson, A. Mastitis in a heifer caused by *Clostridium perfringens* welchii, type A // A. Robinson, R.A. Manser / *Veterinary Record.* - 1977. – 101. P. 37-38.
238. Roeder, BL. Experimental induction of abdominal tympany, abomasitis, and abomasal ulceration by intraruminal inoculation of *Clostridium perfringens* type A in neonatal calves // BL. Roeder, MM. Chengappa, TG. Nagataja, TB. Avery, GA. Kennedy / *American Journal of Veterinary Research.* - 1988. - 49. - P. 201-207.
239. Rossetto, O. Tetanus and botulinum neurotoxins: Turning bad guys into good by research // O. Rossetto / *Toxicon.* - 2001. – 39. – P. 27–41.
240. Rubinstein, K.E. "Homogeneous" enzyme immunoassay. A new immunochemical technique // K.E. Rubinstein, R.S. Schneider, E.F. Ullman / *Biochemical and Biophysical Research Communications.* – 1972. – Vol.47. –P.846-851.
241. Sakurai, J. *Clostridium perfringens* alphatoxin: characterization and mode of action // J. Sakurai, M. Nagahama, M. Oda / *J Biochem* 2004. – 136:569-74.
242. Sakurai, J. Purification of beta-toxin from *Clostridium perfringens* type C // J. Sakurai, C. Duncan / *Infection and Immunity.* - 1977. - 18: P. 741-745.
243. Sakurai, J. Toxins of *Clostridium perfringens* // J. Sakurai / *Reviews in Medical Microbiology.* - 1995. - 6. - P.-175-85.

244. Sayeed, S. Beta toxin is essential for the intestinal virulence of *Clostridium perfringens* type C disease isolate CN3685 in a rabbit ileal loop model // S. Sayeed, FA. Uzal, DJ. Fisher /. *Molecular Microbiology* – 2008. – 67:15-30.
245. Sayeed, S. Improved understanding of the action and genetics of *Clostridium perfringens* enterotoxin suggests potential application for cancer therapy and drug delivery. *Clostridia: Molecular Biology in the post-genomic era* // S. Sayeed, SL. Robertson, JA. Caserta, BA. McClane, H. Bruggemann, G. Gottschalk / G, Eds. Norfolk: Caister academic press. – 2009. – P.29-46.
246. Schotte, U. Significance of beta 2-toxigenic *Clostridium perfringens* infections in animals and their predisposing factors--a review // U. Schotte, U. Truyen, H. Neubauer/ *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*. – 2004. – 51: 423-6.
247. Smedley, JG. The enteric toxins of *Clostridium perfringens* // JG. Smedley, DJ. Fisher, S. Sayeed, G. Chakrabarti, BA. McClane / *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. - 2004. - 152. - P. 183-204.
248. Smith, L.D. *Clostridium tetani* // L.D.S. Smith / *The Pathogenic Anaerobic Bacteria*, 3rd edition. -1992. - P.1867–1880.
249. Soler-Jover, A. Distribution of *Clostridium perfringens* epsilon toxin in the brains of acutely intoxicated mice and its effect upon glial cells // A. Soler-Jover, J. Dorca, MR. Popoff / *Toxicon*. - 2007. – 50.-P. 530-540.
250. Songer, J.G. Molecular and immunological methods for the diagnosis of clostridial diseases. In: *The clostridia: molecular biology and pathogenesis* // J.G. Songer, J.L. Rood, B.A. McClane R.W. Titball / Academic Press, Inc. USA. - 1997. - P.491-503.
251. Songer, JG. Clostridial abomasitis in calves: case report and review of the literature // JG. Songer, DW. Miskimins / *Anaerobe*. – 2005. – 11.-P. 290-294.
252. Songer, JG. Clostridial diseases of small ruminants // JG. Songer / *American Journal of Veterinary Research*. – 1998. – 29. –P. 219-232.
253. Songer, JG. Clostridial enteric diseases of domestic animals // JG. Songer / *Clinical Microbiology and Infection*. - 1996. - 9. - P. 216-234.
254. Stiles, B. *Clostridium perfringens* iota toxin: binding studies and characterization of cell surface receptor by fluorescence-activated cytometry // B. Stiles, ML. Hale, JC. Marvaud, MR. Popoff / *Infection and Immunity*. 2000. – 68. P. 3475-3484.
255. Stiles, B.G. *Clostridium* and *Bacillus* binary toxins: Bad for the bowels and eukaryotic being // B.G. Stiles / *Toxins*. - 2014. - P. 2626.
256. Strauch, S. Nachweis von *Clostridium perfringens* mit der Impedanz-Methode // S. Strauch, B. Meyer, J. Baungart / *Fleisch Wirtschaft*. - 1994. - Vol.74. - N10. - P.1107-1108.
257. Tamai, E. Accumulation of *Clostridium perfringens* epsilon-toxin in the mouse kidney and its possible biological significance // E. Tamai, T. Ishida, S. Miyata et al. / *Infection and Immunity*. - 2003. - 71. - P. 5371-5.
258. Thiele, T.L. Detection of *Clostridium sordellii* strains expressing hemorrhagic toxin (TcsH) and implications for diagnostics and regulation of veterinary vaccines // T.L. Thiele / *Vaccine*. - 31. - P. 5082–5087.
259. Thomson, R.O. Experimental Clostridial oil emulsion vaccines // R.O. Thomson, I. Batty / *Bull. Off. int. Epiz*. – 1969. – 67. – P.411-422.

260. Tijssen, P. Practice and theory of enzyme immunoassays // P. Tijssen / Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. – Amsterdam: Elsevier. – 1985. – Vol. 15. – P.239-279.
261. Timoney, JF. Antibody responses of mares to prepartum vaccination with *Clostridium perfringens* bacterin and beta-2 toxin // JF. Timoney, M. Hartmann, L. Fallon, E. Fallon, J. Walker / Veterinary Record. - 2005. - 157. - P. 810-2.
262. Titball, R. Protein toxins of the genus *Clostridium* and vaccination. // R. Titball, J. Mainil, C. Duchesnes, M. Popoff / Presses Fac. Méd. Vét., Belgium. – 2003 - P.89-99.
263. Titball, RW. The *Clostridium perfringens* – toxin // RW. Titball, CE. Naylor, AE. Basak / Anaerobe. - 1999. – 5. – P. 51-64.
264. Uzal, FA. Caprine enterotoxemia associated with cerebral microangiopathy // FA. Uzal, JR. Glastonbury, WR. Kelly, R. Thomas / Veterinary Record – 1997. – 141. – P. 224-226.
265. Uzal, FA. Development and application of new mouse models to study the pathogenesis of *Clostridium perfringens* type C enterotoxemias // FA. Uzal, J. Saputo, S. Sayeed / Infection and Immunity. - 2009. - 77(12) - P.5291-9.
266. Uzal, FA. Diagnosis of *Clostridium perfringens* intestinal infections in sheep and goats // FA. Uzal, JG. Songer / Journal of veterinary diagnostic investigation. - 2008. - 20. - P. 253-65.
267. Uzal, FA. Effects of intravenous injection of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in calves // FA. Uzal, WR. Kelly, WE. Morris, RA. Assis / Journal of Comparative Pathology. - 2002. – 126.- P. 71-75.
268. Uzal, FA. Resistance of ovine, caprine and bovine endothelial cells to *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin in vitro // FA. Uzal, BE. Rolfe, NJ. Smith, AC. Thoma, WR. Kelly / Veterinary Research Communications. - 1999. - 23.- P 275-284.
269. Uzal, FA. The effects of intravenous administration of *Clostridium perfringens* type D epsilon toxin on young goats and lambs // FA. Uzal, WR. Kelly / Journal of Comparative Pathology. – 1997. - 116. - P.63-71.
270. Uzal, FA. The pathology of experimental *Clostridium perfringens* type D enterotoxemia in sheep // FA. Uzal, WR. Kelly, WE. Morris, J. Bermudez, M. Baisón / Journal of veterinary diagnostic investigation. - 2004. - 16. - P. 403-11
271. Uzal, FA. Ulcerative enterocolitis in two goats associated with enterotoxin- and beta2 toxin-positive *Clostridium perfringens* type D // FA. Uzal, DJ. Fisher, J. Saputo / Journal of veterinary diagnostic investigation - 2008. -20. - P. 668- 672.
272. Vidal, JE. Effects of *Clostridium perfringens* beta-toxin on the rabbit small intestine and colon // JE. Vidal, BA. McClane, J. Saputo, J. Parker, FA. Uzal / Infection and Immunity. – 2008. – 76. - P. 4396-4404.
273. Vidor, C. Antibiotic resistance, virulence factors and genetics of *Clostridium sorrellii* // Journal Research in Microbiology - 2015. - 166. - P. 368–374.
274. Washington, D.C. Microbiology of tetanus // D. Washington, B. Bytchenko / In: Veronesi, R. (ed.) Tetanus: Important new concepts. - 1981. - P.28–39.
275. Watson, PJ. *Clostridium perfringens* type D epsilon intoxication in one-day-old calves // PJ. Watson, SF. Scholes / Veterinary Record. - 2009. - 164. - P. 816-818.

276. Weese, JS. Diarrhea associated with enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in a red-footed tortoise (*Geochelone carbonaria*) // J.S. Weese, HR. Staempfli / *Journal Zoo Wild Med* - 2000. - 31. P. 265-266.
277. Wellhöner, H.H. Clostridial toxins and the central nervous system: Studies on in situ tissues // H.H. Wellhöner / *Botulinum Neurotoxin and Tetanus Toxin*. – 1989. – P.231-253.
278. Wiegel, J. Family I. Clostridiaceae. In: De Vos, P. et al. (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* // Journal Wiegel / Springer Science, New York. - P.736.
279. Zhu, C. *Clostridium perfringens* prototoxin-induced alteration of endothelial barrier antigen (EBA) immunoreactivity at the blood brain barrier (BBB) // C. Zhu, MN. Ghabriel, PC. Blumbergs / *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*. - 2001. – 169. - P. 72-82.

11. ПРИЛОЖЕНИЯ

К диссертационной работе прилагаются следующие копии документов:

№	Название документа	Стр.
1.	Сертификат соответствия на «КЛОСТБОВАК-8» - вакцина против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентная инактивированная	252
2.	Регистрационное удостоверение на Вакцину против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентную инактивированную - «КЛОСТБОВАК-8»	253
3.	Промышленные технологические регламенты на производство и контроль качества вакцины против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентной инактивированной «КЛОСТБОВАК-8»	254
4.	Инструкция по применению вакцины против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентной инактивированной «КЛОСТБОВАК-8»	256
5.	Стандарт организации «Вакцина против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентная инактивированная «КЛОСТБОВАК-8»	258
6.	Макет первичной (потребительской) упаковки на лекарственный препарат Вакцина против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентная инактивированная «КЛОСТБОВАК-8»	260
7.	Результаты мониторинга безопасности лекарственного препарата для ветеринарного применения в целях подтверждения его государственной регистрации	261
8.	Методические указания «Лабораторная диагностика клостридиозов животных»	271
9.	Стандарт организации: Производственные и контрольные штаммы <i>Clostridium chauvoei</i> (метод изготовления и контроля посевных материалов)	272
10.	Стандарт организации: Производственные и контрольные штаммы <i>Clostridium septicum</i> (метод изготовления и контроля посевных материалов)	274
11.	Стандарт организации: Производственные и контрольные штаммы <i>Clostridium perfringens</i> (метод изготовления и контроля посевных материалов)	276
12.	Стандарт организации: Производственные и контрольные штаммы <i>Clostridium tetani</i> (метод изготовления и контроля посевных материалов)	278
13.	Стандарт организации: Производственные и контрольные штаммы <i>Clostridium oedematiens</i> (novyi) (метод изготовления и контроля посевных материалов)	280
14.	Акт клинических испытаний вакцины «КЛОСТБОВАК-8» в ЗАО «Племрепродуктор Васильевское»	282
15.	Акт клинических испытаний вакцины «КЛОСТБОВАК-8» в СПК «Колхоз имени Ворошилова»	283
16.	Акт клинических испытаний вакцины «КЛОСТБОВАК-8» в ООО «Болотниковское»	284
17.	Акт клинических испытаний вакцины «КЛОСТБОВАК-8» в ЗАО «Путиловец Юг»	285
18.	Акт клинических испытаний вакцины «КЛОСТБОВАК-8» в ООО «Кубань»	286
19.	Акт клинических испытаний вакцины «КЛОСТБОВАК-8» в ООО «Племзавод им. В.И. Чапаева»	287
20.	Акт клинических испытаний вакцины «КЛОСТБОВАК-8» в ЗАО фирма «Агро-комплекс»	288

Приложение 1.

Сертификат соответствия на «КЛОСТБОВАК-8» - вакцина против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентная инактивированная

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ	
СЕРТИФИКАТ СООТВЕТСТВИЯ	
на продукцию, включенную в единый перечень продукции, подлежащей обязательной сертификации	
№ РОСС RU.АБ32.В28260	
Срок действия с	21.12.2016 г. по 20.04.2018 г.
ОРГАН ПО СЕРТИФИКАЦИИ	№ 0026977
РА.RU.11АБ32 Орган по сертификации (Федеральное государственное бюджетное учреждение «Всероссийский государственный Центр качества и стандартизации лекарственных средств для животных и кормов» - ФГБУ «ВГНКИ») 123022, Москва, Звенигородское шоссе, д. 5, телефон: 8 (499) 253-14-91; e-mail:sertif@vgnki.ru	
ЗАЯВИТЕЛЬ ООО «Ветбиохим», 105120, Москва, 3-ий Сыромятничекский пер., д. 3/9, стр. 2 ИНН 7709594639; ОКПО 76418883; КПП 770901001 Тел./факс: (495) 916-17-11/739-42-16; e-mail:info@vetbio.ru	
ИЗГОТОВИТЕЛЬ ООО «Ветбиохим», 123098, г. Москва, ул. Гамалей, д. 16	
ПРОДУКЦИЯ	код ОК 005 (ОКП): 9 3 8 4 2 0 код ТН ВЭД России: -
«КЛОСТБОВАК-8» - вакцина против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентная инактивированная – лекарственный препарат в форме суспензии для инъекций По СТО 76418883-1031-2015 Серийный выпуск	
СООТВЕТСТВУЕТ ТРЕБОВАНИЯМ НОРМАТИВНЫХ ДОКУМЕНТОВ	
НД № 13-5-2/1062 «Ветеринарные препараты. Показатели качества. Требования и нормы»; СТО 76418883-1031-2015	
СЕРТИФИКАТ ВЫДАН НА ОСНОВАНИИ	
Протоколов испытаний №№ 1095-Б-15-305-С(572/с)/1 от 07.08.2015 г.; 1095-Б-15-305-С(572/с)/2 от 11.08.2015 г. ИЦ ФГБУ «ВГНКИ» (РОСС RU.0001.21ФВ02); РУ 77-1-15.16-3484.№ПВР-1-25.11/02779 от 29.11.2016 г.; Лицензии № 00-16-1-002648 от 13.01.2016 г. на осуществление ООО «Ветбиохим» производства лекарственных средств для ветеринарного применения.	
ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ	
Выпускается, расфасованной по 90 мл (30 доз) в стеклянные или пластиковые флаконы объемом 100 мл. Хранится и транспортируется в сухом темном месте при температуре от 2°С до 8°С. Продукция подлежит маркированию знаком соответствия по ГОСТ Р 50460. Под знаком соответствия проставляется код АБ32. Схема сертификации № 3.	
Руководитель (заместитель руководителя) органа по сертификации	А.И. Алиева инициал, фамилия
Эксперт (эксперты)	И.А. Бганцева инициал, фамилия
3АО «Опцион», Москва, 2015. «Б», лицензия № 05-05-09/003 ФНС РФ, ТЗ № 580, тел.: (495) 726-47-42, www.opcion.ru	

Приложение 2.

Регистрационное удостоверение на Вакцину против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентную инактивированную - «КЛОСТБОВАК-8»



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВETERИНАРНОМУ И ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ

**Регистрационное удостоверение
лекарственного препарата для ветеринарного применения**

№ 000547

Номер регистрационного удостоверения:
77-1-25.11-0501 №ПВР-1-25.11/02779

Дата государственной регистрации « 28 » ноября 20 11

Наименование и адрес юридического лица-разработчика лекарственного препарата:
АНО "НИИ ДПБ" / ООО "НПО НАРВАК", г. Москва

Торговое наименование лекарственного препарата: "КЛОСТБОВАК-8"

Международное непатентованное наименование или химическое наименование
лекарственного препарата: Вакцина против клостридиозов овец и крупного рогатого скота
поливалентная инактивированная "КЛОСТБОВАК-8"

Лекарственная форма: суспензия для инъекций

Дозировка: по 90 мл (30 доз) во флаконах
для профилактической иммунизации овец, крупного рогатого скота против клостридиозов

Применение:

Регистрационное удостоверение выдано бессрочно, со сроком действия 5 лет
(нужное подчеркнуть)

Заместитель Руководителя
(должность)


(подпись)

Е.А. Непоклонов
(Ф.И.О.)

М. П.



Приложение 3.

Промышленный технологический регламент на производство и контроль качества вакцины против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентной инактивированной «КЛОСТБОВАК-8»

ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ
"ВЕТБИОХИМ"

УТВЕРЖДАЮ:

Генеральный директор

ООО "Ветбиохим"

Кривонос А.В.



21 марта 2012 г.

ПРОМЫШЛЕННЫЙ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ РЕГЛАМЕНТ

НА ПРОИЗВОДСТВО И КОНТРОЛЬ КАЧЕСТВА
ВАКЦИНЫ ПРОТИВ КЛОСТРИДИОЗОВ ОВЕЦ И КРУПНОГО
РОГАТОГО СКОТА ПОЛИВАЛЕНТНОЙ ИНАКТИВИРОВАННОЙ
«КЛОСТБОВАК-8»

Москва – 2012 г.

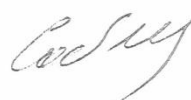
ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ РЕГЛАМЕНТ ПОДГОТОВИЛИ:

Научный руководитель
и ответственный исполнитель
разработки



Т.И. Алипер

Руководитель отдела
контроля качества



Г.Л. Соболева

Начальник производства



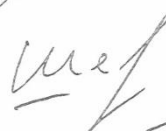
М.М. Демкина

Главный технолог



В.И. Кис

Вет. врач ОКК



Е.В. Шемельков

Биотехнолог ОКК



Г.О. Шемелькова

Микробиолог ОКК



Н.Н. Концевая

Зав. лабораторией качества и стандартизации
бактерийных лекарственных средств для
ветеринарного применения ФГУБ «ВГНКИ»



А.В. Капустин

Приложение 4.

Инструкция по применению вакцины против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентной инактивированной «КЛОСТБОВАК-8»

СОГЛАСОВАНО

Заместитель Руководителя

Россельхознадзора

А.А. ЕФИМОВ

27 НОЯ 2015

ИНСТРУКЦИЯ

по применению вакцины против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентной инактивированной «КЛОСТБОВАК-8»

(организация-разработчик – ООО «Ветбиохим», 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 16)

И. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Торговое наименование – КЛОСТБОВАК-8

Международное непатентованное наименование – Вакцина против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентная инактивированная.

2. Лекарственная форма – суспензия для инъекций. Вакцина изготовлена из инактивированных культур штаммов *Clostridium chauvoei* и *Cl. septicum* (в количестве, обеспечивающим 100 % защиту иммунизированных животных), анатоксинов *Cl. novyi* (*oedematiens*) тип В ($\geq 2,0$ ME), *Cl. perfringens* тип А ($\geq 0,5$ ME), тип С (≥ 10 ME), тип D ($\geq 2,5$ ME), *Cl. tetani* ($\geq 1,0$ ME), инактивированных раствором формалина (0,7%), с добавлением адъюванта - гидрата окиси алюминия (15 % от объема).

3. По внешнему виду вакцина представляет собой суспензию желто-серого цвета, при хранении которой образуется рыхлый серовато-белый осадок, легко гомогенизирующийся при взбалтывании. Срок годности вакцины 18 месяцев от даты выпуска при соблюдении условий хранения и транспортирования. По истечении срока годности вакцина к применению не пригодна. Вакцину необходимо использовать в течение 6 часов после вскрытия флакона.

4. Вакцина расфасована по 90 мл (30 доз) в стеклянные или пластиковые флаконы объемом 100 мл, укупоренные резиновыми пробками, укрепленными алюминиевыми колпачками. Флаконы с вакциной упакованы в картонные или пенопластовые коробки с разделительными перегородками. В каждую коробку с вакциной вложена инструкция по ее применению.

5. Вакцину хранят и транспортируют в сухом темном месте при температуре от 2°C до 8°C .

6. Вакцину следует хранить в местах, недоступных для детей.

7. Вакцину во флаконах без маркировки, с нарушением целостности и/или герметичности укупорки, с измененным внешним видом, подвергнушуюся замораживанию, с истекшим сроком годности, не использованную в течение 6 часов после вскрытия флакона, бракуют, обеззараживают кипячением или 2% раствором щелочи, или 5% раствором хлорамина (1:1) в течение 30 минут и утилизируют. Утилизация обезвреженной вакцины не требует соблюдения специальных мер предосторожности.

8. Вакцина отпускается без рецепта.

II. БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА

9. КЛОСТБОВАК-8 – иммунобиологический лекарственный препарат.

10. Вакцина вызывает формирование иммунитета у крупного рогатого скота и овец против эмфизематозного карбункула, бродзота, злокачественного отека, некротического гепатита, анаэробной дизентерии ягнят, энтеротоксемии, синдрома «размягченной» почки, столбняка через 3 недели после повторного введения, продолжительностью не менее 12 месяцев. Вакцина безвредна, лечебными свойствами не обладает.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

11. Вакцина предназначена для профилактики клостридиозов овец и крупного рогатого скота, вызванных *Cl. chauvoei*, *Cl. septicum*, *Cl. novyi* (*oedematiens*) тип В, *Cl. perfringens* типов А, В, С и D, *Cl. tetani*.

12. Запрещено вакцинировать клинически больных и/или ослабленных животных.

13. Вакцинации подлежит крупный рогатый скот и овцы в возрасте от 45 дней.

Вакцину вводят подкожно: овцам в бесперстный участок под локтевым суставом, крупному рогатому скоту в заднюю треть шеи двукратно с интервалом 21-28 дней в объеме 3 мл.

Для создания колострального иммунитета суягных овцематок и стельных коров вакцинируют за 30-35 дней до окота (отела).

Ревакцинируют животных всех видов ежегодно однократно по аналогичной схеме. Телят и ягнят дополнительно однократно вакцинируют в возрасте 6 месяцев.

Перед применением флакон с вакциной встряхивают до образования гомогенной суспензии. Вакцину вводят с соблюдением правил асептики и антисептики. В случае угрозы заражения возбудителями указанных болезней допускается ревакцинация животных через 6 месяцев.

14. Симптомов проявления болезней клостридиозной этиологии или других патологических признаков при передозировке вакцины не выявлено.

15. Особенности поствакцинальной реакции при первичном и последующих введениях вакцины не установлено.

16. Порядок применения вакцины суягным овцематкам и стельным коровам изложен в п. 13.

17. Следует избегать нарушений схемы вакцинации, поскольку это может привести к снижению эффективности иммунопрофилактики клостридиозов. В случае пропуска очередного введения вакцины необходимо провести иммунизацию как можно скорее.

18. При применении вакцины в соответствии с настоящей инструкцией побочных явлений и осложнений, как правило, не отмечается. У отдельных животных в месте введения вакцины может образоваться припухлость, самостоятельно исчезающая в течение месяца.

В случае проявления у животных аллергических реакций на введение вакцины, необходимо применять антигистаминные препараты.

19. Запрещается применение вакцины одновременно или в течение 1 месяца до и после применения гипериммунных сывороток или иммунодепрессантов.

20. Продукты убоя вакцинированных животных реализуют не ранее, чем через 21 сутки после введения вакцины, молоко используют без ограничений независимо от сроков вакцинации.

IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

21. При проведении вакцинации необходимо соблюдать общие правила гигиены и техники безопасности, предусмотренные при работе с лекарственными препаратами ветеринарного назначения.

22. Все лица, участвующие в проведении вакцинации должны быть одеты в спецодежду (халат, брюки, головной убор, резиновые перчатки). В местах работы должна быть аптечка первой доврачебной помощи.

23. При попадании вакцины на кожу и/или слизистые оболочки их рекомендуется промыть большим количеством водопроводной воды. В случае разлива вакцины зараженный участок пола заливают 5%-ным раствором хлорамина или едкого натрия. При случайном введении препарата человеку место введения необходимо обработать 70%-ным раствором этилового спирта, обратиться в медицинское учреждение и сообщить об этом врачу.

Наименование и адрес производственной площадки производителя Вакцины против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентной инактивированной «КЛОСТБОВАК-8»: ООО «Ветбиохим», 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 16.

Наименование, адрес организации, уполномоченной держателем или владельцем регистрационного удостоверения лекарственного препарата на принятие претензий от потребителя: ООО «Ветбиохим», 123098, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 16.

С утверждением настоящей инструкции утрачивает силу инструкция по применению Вакцины против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентной инактивированной «КЛОСТБОВАК-8», утвержденная Россельхознадзором 28 ноября 2011 г.

Рекомендовано к регистрации в Российской Федерации ФГБУ «ВГНКИ».

Номер регистрационного удостоверения 77-1-15.16-3484№ПВР-1-25.11/02779

Приложение 5.

Стандарт организации «Вакцина против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентная инактивированная «КЛОСТБОВАК-8»

СОГЛАСОВАНО
Заместитель Руководителя
Россельхознадзора



УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «Ветбиохим»



А.В. Кривонос

«20» октября 2015 г.

СТАНДАРТ ООО «Ветбиохим»

Вакцина против клостридиозов овец и крупного рогатого скота
поливалентная инактивированная
« КЛОСТБОВАК-8»

Технические условия

СТО 76418883-1031-2015

СОГЛАСОВАНО
Директор ФГБУ «Всероссийский
государственный Центр качества
и стандартизации лекарственных
средств для животных и кормов»,

И.В. Крамаренко
«06.11» ноября 2015 г.

Ключевые слова: вакцина, клостридиозы, Clostridium chauvoei, Clostridium septicum, Cl. novyi (oedematiens), Cl. perfringens типов A, B, C, D, Cl. tetani, безвредность, иммуногенная активность, токсины, стерильность.

Руководитель разработки:

Доктор биологических наук,
«21» октября 2015 г.



Т.И. Алипер

Исполнители:

Кандидат ветеринарных наук,
ведущий научный сотрудник
«21» октября 2015 г.



А.В. Капустин

Доктор биологических наук,
«21» октября 2015 г.
21 октября 2015 г.

Г.Л. Соболева

Кандидат ветеринарных наук,
«21» октября 2015 г.



Е.В. Шемельков

Приложение 6.

Макет первичной (потребительской) упаковки на лекарственный препарат «Вакцина против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентная инактивированная «КЛОСТБОВАК-8»

СОГЛАСОВАНО
Заместитель Руководителя
Федеральной службы по ветеринарному
и фитосанитарному надзору

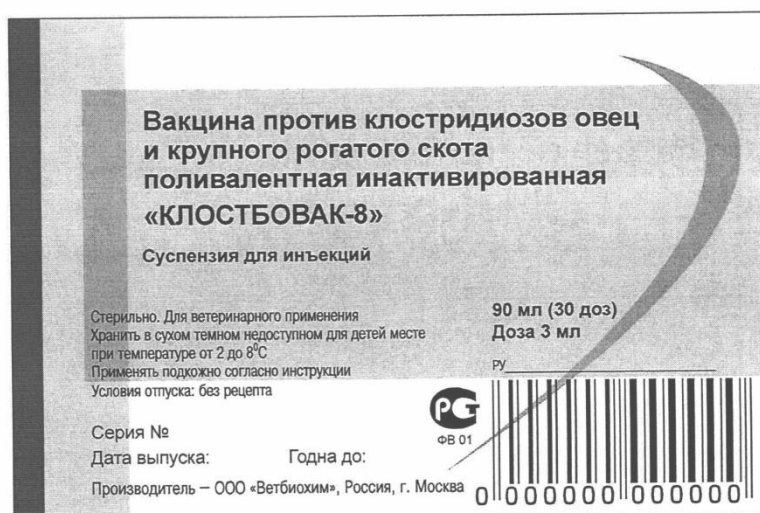
ИПОКЛОНОВ
23 НОЯ 2015

УТВЕРЖДАЮ
Генеральный директор
ООО «Ветбиохим»

А.В.Кривонос
20 ноября 2015 г.

МАКЕТ ЭТИКЕТКИ ПЕРВИЧНОЙ (ПОТРЕБИТЕЛЬСКОЙ) УПАКОВКИ
на лекарственный препарат

**Вакцина против клостридиозов овец и крупного рогатого скота
поливалентная инактивированная
«КЛОСТБОВАК-8»**



размер 73 x 49 мм
Масштаб 1 : 1,5



Результаты мониторинга безопасности лекарственного препарата для ветеринарного применения в целях подтверждения его государственной регистрации

РЕЗУЛЬТАТЫ

мониторинга безопасности лекарственного препарата для ветеринарного применения в целях подтверждения его государственной регистрации

I. Общие положения

1.1. Наименование и адрес юридического лица – разработчика лекарственного препарата для ветеринарного применения (далее – лекарственный препарат) ООО «Ветбиохим», 105120, г. Москва, 3-й Сыромятнинский пер., 3/9, стр. 2

1.2. Торговое наименование лекарственного препарата: «КЛОСТЬОВАК-8»

1.3. Международное непатентованное (и/или химическое) наименование: Вакцина против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентная инактивированная

1.4. Номер регистрационного удостоверения лекарственного препарата или реквизиты свидетельства о государственной регистрации (учетная серия и номер): 77-1-25.11-0501 №ПВР-1-25.11/02779

1.5. Дата регистрации лекарственного препарата: 28.11.2011

Период мониторинга безопасности лекарственного препарата с « 28 » ноября 2011 г. по «01» августа 2016 г.

1.6. Дата предоставления результатов мониторинга безопасности лекарственного препарата «01» августа 2016 г.

1.7. Результаты мониторинга безопасности лекарственного препарата представлены: генеральным директором ООО «Ветбиохим»

А.В. Кривоносом

Генеральный директор



А.В.Кривонос

II. Регистрационный статус

2.1. Информация о странах, в которых разрешено применение лекарственного препарата

Страна	Торговое наименование лекарственного препарата	Дата регистрации лекарственного препарата	Дата последнего подтверждения регистрации лекарственного препарата	Отличия, содержащиеся в инструкции по применению лекарственного препарата в зарубежных странах (показания, противопоказания, режим дозирования), для сельскохозяйственных животных и животных, указанных в инструкции по применению лекарственного препарата, находящегося в обращении на территории Российской Федерации
1	2	3	4	5
Россия	КЛОСТЬОВАК-8	28.11.2011	-	-

2.2. Информация об отказах в регистрации лекарственного препарата по причине не подтверждения его качества и (или) эффективности, либо если риск причинения вреда здоровью животного вследствие приема лекарственного препарата превысил эффективность его применения

Страна	Торговое наименование лекарственного препарата	Дата отказа в регистрации лекарственного препарата	Основания, послужившие отказом в регистрации лекарственного препарата
1	2	3	4
Нет	КЛОСТЬОВАК-8	Нет	Нет

2.3. Информация о приостановлении применения лекарственного препарата по причинам, связанным с безопасностью данного лекарственного препарата

Страна	Торговое наименование лекарственного препарата	Дата приостановления применения лекарственного препарата	Причина приостановления применения лекарственного препарата	Основания для возобновления разрешения применения лекарственного препарата	Комментарии
1	2	3	4	5	6
Нет	КЛОСТЬОВАК-8	Нет	Нет	Нет	Нет

2.4. Информация о принятых решениях о внесении изменений в инструкцию по применению лекарственного препарата и изменения нормативного документа с момента регистрации лекарственного препарата

Внесение изменений в инструкцию по применению лекарственного препарата и изменения нормативного документа в период действия регистрации лекарственного препарата не проводились.

Страна	Дата внесения изменений в инструкцию по применению лекарственного препарата и нормативный документ	Изменения, которые внесены в инструкцию по применению лекарственного препарата и нормативный документ	Основание для внесения изменения в инструкцию по применению лекарственного препарата и нормативный документ
1	2	3	4
Россия	20.11.2015 г.	Требования ФЗ №61	ФЗ №61

2.5. Информация о количестве лекарственного препарата, поступившего в обращение на территории Российской Федерации и на территории других стран с момента регистрации лекарственного препарата в Российской Федерации

Страна	Первичная (потребительская) упаковка с указанием количества лекарственного препарата	Количество лекарственного препарата, поступившего в обращение, фл.	Наименование субъекта Российской Федерации, на территории которого осуществляется реализация лекарственного препарата
1	2	3	4
Россия	Флакон 30 доз	с 28.11.11 по 28.11.12 – 642 в т. ч.	
		10	Воронежская обл
		32	Курская обл
		191	Москва г
		60	Московская обл
		74	Новосибирская обл
		80	Пензенская обл
		68	Рязанская обл
		19	Удмуртская Респ
		108	Ярославская обл
		с 28.11.12 по 28.11.13 – 1915 в т. ч.	
		50	Владимирская обл
		142	Краснодарский край
		198	Курская обл
		920	Москва г
		189	Московская обл
		143	Нижегородская обл
		44	Пензенская обл
		172	Пермская обл
		28	Тюменская обл
		8	Удмуртская Респ
		21	Ярославская обл
		с 28.11.13 по 28.11.14 – 2832 в т. ч.	
		27	Владимирская обл
		306	Краснодарский край
		418	Курская обл
		1852	Москва г
		96	Московская обл
		50	Самарская обл
		6	Санкт-Петербург г
		77	Татарстан Респ
		с 28.11.14 по 28.11.15 – 5376 в т. ч.	

		334 2 409 132 3834 182 100 4 1 187 24 167	Белгородская обл Краснодарский край Курская обл Липецкая обл Москва г Московская обл Новосибирская обл Пензенская обл Самарская обл Саратовская обл Татарстан Респ Тульская обл
		с 28.11.15 по 28.07.16 – 3228 в т. ч.	
		114 4 110 138 2319 74 50 284 34 101	Белгородская обл Краснодарский край Курская обл Липецкая обл Москва г Московская обл Нижегородская обл Новосибирская обл Татарстан Респ Ярославская обл
		ИТОГО: 13993	
Беларусь	Флакон 30 доз	с 28.11.15 по 28.07.16 – 1011	
		ИТОГО: 1011	

III. Информация о серьезных нежелательных реакциях (СНР), непредвиденных нежелательных реакциях (ННР) и побочном действии (ПД), выявленных с момента регистрации лекарственного препарата.

3.1. Количество всех СНР, ННР и ПД, сообщения о которых поступили за отчетный период

Критерии по НР	Количество сообщений, полученных от ветеринарных специалистов	Количество сообщений, полученных по данным собственных исследований	Количество сообщений, полученных от уполномоченных государственных органов	Количество сообщений, полученных от потребителей	Количество сообщений описанных в научных журналах
1	2	3	4	5	7
СНР	-	-	-	-	-
ПД	-	-	-	-	-
ННР	-	-	-	-	-
Всего	-	-	-	-	-

3.2. Информация о влиянии СНР, ННР и ПД на различные системы организма животного

Системы организма, в которых отмечалось проявление СНР, ННР и ПД	Кол-во СНР	% от общего кол-ва СНР	Количество ННР	% от общего кол-ва ННР	Кол-во ПД	% от общего кол-ва ПД	Описание СНР, ННР, ПД	Информация о действиях ветеринарных специалистов при выявлении СНР, ННР и ПД
Центральная нервная и периферическая нервная системы, включая органы чувств	0	0	0	0	0	0	0	0
Сердечно-сосудистая система	0	0	0	0	0	0	0	0
Выделительная система	0	0	0	0	0	0	0	0
Дыхательная система	0	0	0	0	0	0	0	0
Пищеварительная система	0	0	0	0	0	0	0	0
Репродуктивная система и	0	0	0	0	0	0	0	0

молочные железы, включая тератогенное и эмбриотоксическое действие								
Опорно-двигательная система	0	0	0	0	0	0	0	0
Иммунная система	0	0	0	0	0	0	0	0
Нарушение со стороны опорно-двигательного аппарата	0	0	0	0	0	0	0	0
Врожденные наследственные и генетические нарушения	0	0	0	0	0	0	0	0
Прочие системы	0	0	0	0	0	0	0	0
Всего	0	0	0	0	0	0	0	0

3.3. Информация о серьезных нежелательных реакциях (СНР), выявленных за период проведения мониторинга лекарственного препарата, за исключением случаев, приведших к гибели животных

Информация о серьезных нежелательных реакциях, выявленных за период проведения мониторинга лекарственного препарата, за исключением случаев, приведших к гибели животных, не поступала.

3.4. Информация о СНР, приведших к гибели животных

Информация о СНР, приведших к гибели животных, не поступала.

IV. Информация о результатах исследований в области безопасности лекарственных препаратов

4.1. Информация о проводимых доклинических и клинических исследованиях безопасности лекарственного препарата в период проведения мониторинга лекарственного препарата

Страна	Цель проведения исследований	Этап проведения исследования или информация о завершении исследований	Количество животных, участвующих в исследовании		Количество случаев возникновения побочного действия в период исследований	Количество случаев возникновения нежелательных реакций в период исследований	Результаты проведенных исследований
			лабораторных	клинических			
1	2	3	4		5	6	7
Россия	-	-	-	-	-	-	-

4.2. Иная информация

Проведены сертификационные испытания вакцины, подтвердившие её качественные показатели, в том числе включающие показатель «безвредность». Препарат сертифицируется регулярно 1 раз в 2 года. Кроме того, 1 раз в год Орган по сертификации ФГБУ «ВГНКИ» проводит инспекционный контроль, подтверждающий качественные характеристики выпускаемой продукции, в т. ч. по показателю «безвредность».

4.2.1. Информация, касающаяся случаев применения лекарственного препарата по несодержащимся в инструкции по применению показаниям, эффектов при применении, превышающем курс лечения, указанный в инструкции по применению лекарственного препарата, обнаружения остаточных количеств лекарственного средства в продукции животноводства, при соблюдении требований инструкции по применению лекарственного препарата, выявления случаев неблагоприятного воздействия лекарственного препарата на окружающую среду и/или человека отсутствует.

4.2.2. Информация о количестве случаев и причинах неэффективности лекарственного препарата.

Информация о количестве случаев и причинах неэффективности лекарственного препарата отсутствует.

4.2.3. Дополнительные данные о лекарственном препарате, полученные в период мониторинга и изложенные в историях болезни, актах из животноводческих хозяйств (клинических случаях).

Дополнительные данные о лекарственном препарате, полученные в период мониторинга и изложенные в историях болезни, актах из хозяйств (клинических случаях) отсутствуют.

V. Анализ эффективности лекарственного препарата и риска причинения вреда здоровью животного и человека, полученный в период мониторинга, с обоснованием необходимости внесения изменений в инструкцию по применению или нормативный документ.

Таким образом, Вакцина против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентная инактивированная «КЛОСТБОВАК-8» является высокоэффективным препаратом для профилактики клостридиозов овец и крупного рогатого скота.

Побочные явления при применении препарата не установлены.

Случаев неблагоприятного воздействия препарата на окружающую среду и человека не выявлено.

Вакцина против клостридиозов овец и крупного рогатого скота поливалентная инактивированная «КЛОСТБОВАК-8» отвечает заявленным параметрам безопасности.

РОССИЙСКАЯ АКАДЕМИЯ НАУК
ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ
ФГБНУ ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВЕТЕРИНАРИИ
имени Я.Р.КОВАЛЕНКО

«УТВЕРЖДАЮ»

Руководитель Секции
зоотехния и ветеринария
отделения сельскохозяйственных наук РАН
академик РАН
В.В. Калашников

«*18*» *сентября* 2017 г.



МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ
ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА КЛОСТРИДИОЗОВ ЖИВОТНЫХ

Москва, 2017

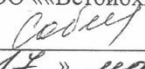
Приложение 9.

Стандарт организации: Производственные и контрольные штаммы *Clostridium chauvoei* (метод изготовления и контроля посевных материалов)

СТАНДАРТ ООО «ВЕТБИОХИМ»

СОГЛАСОВАНО

Зам. генеральный директора
по качеству
ООО «Ветбиохим»

 Г.И. Соболева
«17» марта 2010 г.

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Ветбиохим»

 А.В. Кривонос
«17» марта 2010 г.

ПРОИЗВОДСТВЕННЫЕ И КОНТРОЛЬНЫЕ ШТАММЫ

CLOSTRIDIUM CHAUVOEI

(метод изготовления и контроля посевных материалов)

СТО 76418883-0021-2010

МОСКВА 2010

более чем в 2 раза от исходного уровня процедуру изготовления и контроля MSB и WSD повторяют.

Ответственность за хранение и контроль жизнеспособности посевных материалов возлагается на начальника ОКК.

13. Указания по применению

Штамм *Clostridium chauvoei* используют для производства и контроля иммуногенной активности моно-, би-, поливалентных и ассоциированных вакцин, содержащих производственный штамм возбудителя клостридиоза, а также антитоксических гипериммунных сывороток против клостридиозов животных в соответствии с действующими НД.

14. Гарантии изготовителя

14.1. ООО «Ветбиохим» гарантирует соответствие качества штаммов *Clostridium chauvoei* производственных и контрольных требованиям настоящего СТО при соблюдении соответствующих условий хранения, транспортирования и применения.

14.2. Датой изготовления считают день окончания лиофильной сушки штамма. Срок годности MSB штамма *Clostridium chauvoei* не ограничен, проверку качества штаммов проводят каждые два года с целью определения сохранности свойств и жизнеспособности.

ОКС 11.220

ОКП

Ключевые слова: эмфизематозный карбункул, *Clostridium chauvoei*, главный посевной материал (Master seed, MSB), рабочий посевной материал (Working seed, WSB), рабочая расплодка (Production seed, PSB), вирулентность посевных расплодок, иммуногенность, контаминация

Руководитель разработки:

Генеральный Директор ООО «НПО НАРВАК»



Т.И. Алипер

Разработчики:

Заместитель ген. директора по качеству



Г.Л. Соболева

Начальник производства



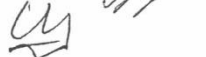
М.М. Демкина

Главный технолог



В.И. Кис

Начальник ОКК



Е.В. Шемельков

Зав. бактериальным отделом



А.В. Капустин

Приложение 10.

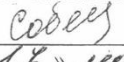
Стандарт организации: Производственные и контрольные штаммы *Clostridium septicum* (метод изготовления и контроля посевных материалов)

СТАНДАРТ ООО «ВЕТБИОХИМ»

СОГЛАСОВАНО

Зам. генеральный директора
по качеству

ООО «Ветбиохим»

 Г.Л. Соболева
« 17 » марта 2010 г.

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Ветбиохим»

 А.В. Кривонос
« 17 » марта 2010 г.

ПРОИЗВОДСТВЕННЫЕ И КОНТРОЛЬНЫЕ ШТАММЫ
CLOSTRIDIUM SEPTICUM
(метод изготовления и контроля посевных материалов)

СТО 76418883-0025-2010

МОСКВА 2010

ственный штамм возбудителя клостридиоза, а также антитоксических гипериммунных сывороток против клостридиозов животных в соответствии с действующими НД.

14. Гарантии изготовителя

14.1 ООО «Ветбиохим» гарантирует соответствие качества штамма *Clostridium septicum* производственным и контрольным требованиям настоящего СТО при соблюдении соответствующих условий хранения, транспортирования и применения.

14.2 Датой изготовления считают день окончания лиофильной сушки штамма. Срок годности MSB штамма *Clostridium septicum* не ограничен, проверку качества штаммов проводят каждые два года с целью определения сохранности свойств и жизнеспособности.

ОКС 11.220

ОКП

Ключевые слова: газовая гангрена, *Clostridium septicum*, главный посевной материал (Master seed, MSB), рабочий посевной материал (Working seed, WSB), рабочая раскладка (Production seed, PSB), вирулентность посевных раскладок, иммуногенность, контаминация

Руководитель разработки:

Генеральный Директор ООО «НПО НАРВАК»



Т.И. Алипер

Разработчики:

Заместитель ген. директора по качеству



Г.Л. Соболева

Начальник производства



М.М. Демкина

Главный технолог



В.И. Кис

Начальник ОКК



Е.В. Шемельков

Зав. бактериальным отделом



А.В. Капустин

Приложение 11.

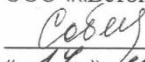
Стандарт организации: Производственные и контрольные штаммы *Clostridium perfringens* (метод изготовления и контроля посевных материалов)

СТАНДАРТ ООО «ВЕТБИОХИМ»

СОГЛАСОВАНО

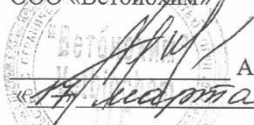
Зам. генеральный директора
по качеству

ООО «Ветбиохим»

 Г.Л. Соболева
« 14 » марта 2010 г.

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Ветбиохим»

 А.В. Кривонос
« 14 » марта 2010 г.

ПРОИЗВОДСТВЕННЫЕ И КОНТРОЛЬНЫЕ ШТАММЫ

CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

(метод изготовления и контроля посевных материалов)

СТО 76418883-0024-2010

МОСКВА 2010

контейнерах, с установленным сроком годности в два года, по истечению которых необходимо осуществить контроль жизнеспособности штаммов.

Температурный режим хранения каждого материала должен поддерживаться автоматически и регистрироваться в специальных журналах.

Необходимо документировать расход посевных материалов для производственных и контрольных целей.

Проверку жизнеспособности главного посевного материала (MSB) штамма необходимо проводить один раз в два года. При снижении активности материала более чем в 2 раза от исходного уровня процедуру изготовления и контроля MSB и WSD повторяют.

Ответственность за хранение и контроль жизнеспособности посевных материалов возлагается на начальника ОКК.

13. Указания по применению

Штаммы *Clostridium perfringens* используют для производства и контроля иммуногенной активности моно-, би-, поливалентных и ассоциированных вакцин, содержащих производственный штамм возбудителя клостридиоза, а также антитоксических гипериммунных сывороток против клостридиозов животных и диагностических препаратов в соответствии с действующими НД.

14. Гарантии изготовителя

14.1. ООО «Ветбиохим» гарантирует соответствие качества штаммов *Clostridium perfringens* производственных и контрольных требованиям настоящего СТО при соблюдении соответствующих условий хранения, транспортирования и применения.

14.2. Датой изготовления считают день окончания лиофильной сушки штамма. Срок годности MSB штамма *Clostridium perfringens* не ограничен, проверку качества штаммов проводят каждые два года с целью определения сохранности свойств и жизнеспособности.

ОКС 11.220

ОКП

Ключевые слова: газовая гангрена, токсикоинфекция, *Clostridium perfringens*, тип А, В, С, D, главный посевной материал (Master seed, MSB), рабочий посевной материал (Working seed, WSB), рабочая раскладка (Production seed, PSB), вирулентность посевных раскладок, иммуногенность, контаминация

Руководитель разработки:

Генеральный Директор ООО «НПО НАРВАК»



Т.И. Алипер

Разработчики:

Заместитель ген. директора по качеству



Г.Л. Соболева

Начальник производства



М.М. Демкина

Главный технолог



В.И. Кис

Начальник ОКК



Е.В. Шемельков

Зав. бактериальным отделом



А.В. Капустин

Приложение 12.

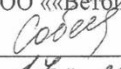
Стандарт организации: Производственные и контрольные штаммы *Clostridium tetani* (метод изготовления и контроля посевных материалов)

СТАНДАРТ ООО «ВЕТБИОХИМ»

СОГЛАСОВАНО

Зам. генеральный директора
по качеству

ООО «Ветбиохим»

 Г.Л. Соболева
« 17 » сентября 2010 г.

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Ветбиохим»

 А.В. Кривонос
« 17 » сентября 2010 г.

ПРОИЗВОДСТВЕННЫЕ И КОНТРОЛЬНЫЕ ШТАММЫ

CLOSTRIDIUM TETANI

(метод изготовления и контроля посевных материалов)

СТО 76418883-0023-2010

МОСКВА 2010

Ключевые слова: эмфизематозный карбункул, *Clostridium tetani*, главный посевной материал (Master seed, MSB), рабочий посевной материал (Working seed, WSB), рабочая расплодка (Production seed, PSB), токсичность, вирулентность посевных расплодок, иммуногенность, контаминация

Руководитель разработки:

Генеральный Директор ООО «НПО НАРВАК»



Т.И. Алипер

Разработчики:

Заместитель ген. директора по качеству



Г.Л. Соболева

Начальник производства



М.М. Демкина

Главный технолог



В.И. Кис

Начальник ОКК



Е.В. Шемельков

Зав. бактериальным отделом



А.В. Капустин

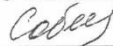
Приложение 13.

Стандарт организации: Производственные и контрольные штаммы *Clostridium oedematiens* (novyi) (метод изготовления и контроля посевных материалов)

СТАНДАРТ ООО «ВЕТБИОХИМ»

СОГЛАСОВАНО

Зам. генеральный директора
по качеству
ООО «Ветбиохим»

 Г.Л. Соболева
«17» марта 2010 г.

УТВЕРЖДАЮ

Генеральный директор
ООО «Ветбиохим»

 А.В. Кривонос
«17» марта 2010 г.

ПРОИЗВОДСТВЕННЫЕ И КОНТРОЛЬНЫЕ ШТАММЫ
CLOSTRIDIUM OEDEMATIENS (NOVYI)
(метод изготовления и контроля посевных материалов)

СТО 76418883-0022-2010

МОСКВА 2010

Ответственность за хранение и контроль жизнеспособности посевных материалов возлагается на начальника ОКК.

13. Указания по применению

Штамм *Clostridium oedematiens* используют для производства и контроля иммуногенной активности моно-, би-, поливалентных и ассоциированных вакцин, содержащих производственный штамм возбудителя клостридиоза, а также антитоксических гипериммунных сывороток против клостридиозов животных в соответствии с действующими НД.

14. Гарантии изготовителя

14.1 ООО «Ветбиохим» гарантирует соответствие качества штамма *Clostridium oedematiens* производственным и контрольным требованиям настоящего СТО при соблюдении соответствующих условий хранения, транспортирования и применения.

14.2 Датой изготовления считают день окончания лиофильной сушки штамма. Срок годности MSB штамма *Clostridium oedematiens* не ограничен, проверку качества штаммов проводят каждые два года с целью определения сохранности свойств и жизнеспособности.

ОКС 11.220

ОКП

Ключевые слова: газовая гангрена, *Clostridium oedematiens*, главный посевной материал (Master seed, MSB), рабочий посевной материал (Working seed, WSB), рабочая раскладка (Production seed, PSB), вирулентность посевных раскладок, иммуногенность, контаминация

Руководитель разработки:

Генеральный Директор ООО «НПО НАРВАК»



Т.И. Алипер

Разработчики:

Заместитель ген. директора по качеству



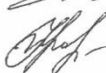
Г.Л. Соболева

Начальник производства



М.М. Демкина

Главный технолог



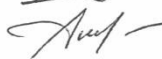
В.И. Кис

Начальник ОКК



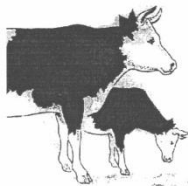
Е.В. Шемельков

Зав. бактериальным отделом



А.В. Капустин

Акт клинических испытаний вакцины «КЛОСТБОВАК-8» в ЗАО «Племрепродуктор Васильевское»



Закрытое акционерное общество

«Племрепродуктор «ВАСИЛЬЕВСКОЕ»

141355, Московская область, Сергиево-Посадский район, с. Васильевское

ИНН/КПП 5042011162/504201001

р/с 40702810204800640385

БИК 044525181

к/с 30101810900000000181

Банк «Возрождение» (ОАО) г. Москва

тел: 8-496-54-83-134; e-mail: pr-vasil@bk.ru

АКТ

Комиссия в составе: директора ЗАО «ПР» «Васильевское» Сергиево-Посадского района Московской области Горячева С.М., главного ветеринарного врача Гаврюшенко И.В., ветврача Рябуха А.В., в.н.с. лаборатории качества и стандартизации лек. средств против бактериальных болезней животных ФГУ «ВГНКИ» Капустина А.В. - провела анализ эффективности применения лекарственного препарата «Вакцина против клостридиозов овец и крс инактивированная ассоциированная Клоствовак-8», экспериментальная серия №1, изготовленная ООО «Ветбиохим» г. Москва.

Основанием для проведения вакцинации послужила сложившаяся на молочно-товарной ферме «Алферьево» ситуация с значительным увеличением случаев гангренозных метритов у новотельных коров и нетелей. Так в период 07.2009 – 07.2010 г.г. было отмечено 19 случаев заболевания коров после отела (общее количество отелов за этот период составило 156). Несмотря на предпринятое лечение все 19 заболевших животных погибли.

При проведении лабораторных исследований, проведенных в ООО «Ветбиохим», установлено, что возбудителем заболевания являются Clostridium perfringens тип А, Clostridium septicum и Clostridium oedematiens.

Для профилактики заболевания была сформирована группа стельных коров и нетелей в количестве 76 голов, которые были вакцинированы согласно инструкции по применению препарата. Осложнений системного или местного характера после применения вакцины у животных не отмечалось.

После отела всех животных опытной группы, отмечено отсутствие новых случаев заболевания и гибели коров, характеризующихся гангренозным поражением репродуктивных органов. Сохранность животных составила 100%, тогда как в контрольной группе коров (138 животных) вновь было выявлено 3 случая гибели животных).

Заключение.

Комиссия считает, что инактивированная вакцина против клостридиозов овец и крс (экспериментальная серия №1, производства ООО «Ветбиохим», г. Москва), использованная ЗАО «ПР» «Васильевское», является безвредным и эффективным иммунобиологическим препаратом, позволяющим профилактировать болезни крс, вызванные возбудителями анаэробных болезней животных, и может быть рекомендована для использования в ветеринарной практике.

Директор ЗАО «ПР» «Васильевское»

Горячев С.М.

Главный ветврач ЗАО «ПР» «Васильевское»

Гаврюшенко И.В.

Ветврач отделения Алферьево

Рябуха А.В.

В.н.с. ЛКиСЛСПББЖ ФГБУ «ВГНКИ»

Капустин А.В.



Утверждаю
Председатель СПА
«Колхоз имени Ворошилова»
О.В. Шатохин

АКТ

Комиссия в составе: главного врача СПА «Колхоз имени Ворошилова» А.А. Кордукова, ветврача МТФ - Момотов В.А., в.н.с. лаборатории качества и стандартизации лек. средств против бактериальных болезней животных ФГУ «ВГНКИ» Капустина А.В. - составила настоящий акт о результатах проведения работы по изучению эффективности «Вакцины против клостридиозов овец и крс инактивированной «Клостбовак-8», экспериментальная серия №1, изготовленной ООО «Ветбиохим» г. Москва.

Основанием для проведения опыта явилось возникновение в хозяйстве случаев заболевания коров гангренозными маститами, которые заканчивались гибелью животных. При проведении бактериологического исследования патологического материала, проведенного в ФГУ ВГНКИ, выявлены культуры *Cl. septicum* и *Cl. oedematiens*.

Для проведения опыта было сформировано две группы коров. Животных первой подопытной группы иммунизировали двукратно подкожно в дозе 3 мл с интервалом 24-28 дней в соответствии с требованиями инструкции по применению. Вакцинацию проводили в период 15.11.2009 по 20.01.2010 г., всего вакцинации было подвергнуто 58 коров. Животных второй (контрольной) группы в количестве 60 голов не вакцинировали. Содержались животные вместе в общем стаде. Наблюдение за животными проводили в течение 6 месяцев. Осложнений системного или местного характера после применения вакцины у животных не отмечалось.

Установлено, что в течение всего срока наблюдения (6 мес) в подопытной группе животных не было выявлено случаев заболевания гангренозными маститами, тогда как в контрольной группе заболело и было подвергнуто вынужденному убою 2 коровы с поражением вымени и три с гангренозными поражениями органов репродуктивной системы после отела. Бактериологическим исследованием подтверждено выявление в материале клостридий, выше перечисленных видов.

Сохранность животных в опытной группе составила 100%, в контрольной группе коров 91,3%.

Заключение.

Вакцина против клостридиозов овец и крс инактивированная Клостбовак-8 (серия №1, изготовлена 03.2009 г. ООО «Ветбиохим», г. Москва), является безвредным и эффективным иммунобиологическим препаратом, позволяющим профилактировать болезни крс, вызванные такими возбудителями анаэробных болезней животных как *Cl. septicum* и *Cl. oedematiens*, и может быть рекомендована для использования в ветеринарной практике.

Главный ветврач
СПА «Колхоз имени Ворошилова» А.А. Кордуков

Ветврач МТФ В.А. Момотов

В.н.с. ЛКИ СПББЖ ФГБУ «ВГНКИ» Капустин А.В.

Приложение 16.

Акт клинических испытаний вакцины «КЛОСТБОВАК-8» в ООО «Болотниковское»

Утверждаю:

Директор ООО «Болотниковское»

В.А. Потяйкин



с. Болотниково, Лямбирского
Республики Мордовия

АКТ

Комиссия в составе: главного ветеринарного врача Пантюшина С.А., ветврача МТФ Сергеева А.И., в.н.с. лаборатории качества и стандартизации лек. средств против бактериальных болезней животных ФГБУ «ВГНКИ» Капустина А.В., провела исследование безвредности и эффективности «Вакцины против клостридиозов овец и крс инактивированной поливалентной «Клостбовак-8», экспериментальная серия №2, изготовленная ООО «Ветбиохим», г. Москва.

Вакцинация проведена в связи с появлением среди новорожденных телят случаев заболевания, проявляющегося диареей, отказом от корма, быстрым нарастанием угнетения с токсическими явлениями. Даже среди получавших лечение антимикробными и симптоматическими средствами животных наблюдался высокий процент гибели. Так в период с 05.01. по 01.03.2010 г. родилось 37 телят, заболело 29, из которых 14 пали.

При бактериологическом исследовании выделен возбудитель анаэробной энтеротоксемии - высокотоксигенная культура *Clostridium perfringens* тип С.

Для оценки эффективности вакцины было создано две группы стельных коров, из них первую – 27 животных, привили вакциной «Клостбовак-8» согласно инструкции - подкожно, двукратно в дозе 3 мл. Первая вакцинация проведена 05.03.2010 г., вторая 29.03.2010 г. Каких либо системных и местных осложнений, в том числе аборт, аллергических реакций, абсцессов, после первого и после повторного введения не отмечено. Вторую группу коров из 16 голов оставили в качестве контрольной и не вакцинировали против клостридиозов.

Отелы животных проходили в период с 15.04. по 15.05.2010 г.

В группе вакцинированных от 27 коров получено 27 жизнеспособных телят, из которых до 30 дневного возраста заболело 8, при этом отмечались диспепсия, легкое угнетение, снижение аппетита. Проведенное лечение приводило к выздоровлению в течение 3-4 суток. Гибели телят, полученных от вакцинированных коров, не наблюдали. От 16 коров контрольной группы получено 16 телят, из которых в первые 1 – 5 дней жизни заболело с признаками анаэробной энтеротоксемии 9, из них поли 7 голов.

Сохранность молодняка животных в опытной группе составила 100%, тогда как в контрольной группе - 66 %.

Заключение.

Комиссия считает, что «Вакцина против клостридиозов овец и крс инактивированная поливалентная «Клостбовак-8», является безвредным, в том числе для глубокостельных животных, и эффективным иммунобиологическим препаратом, позволяющим создать напряженный колостральный иммунитет у новорожденных животных против анаэробной энтеротоксемии, вызванной *Cl.perfringens* тип С, и может быть рекомендована для использования в ветеринарной практике.

Главный ветврач ООО «Болотниковское» _____ С.А. Пантюшин

Ветврач МТФ _____ А.И. Сергеев

В.н.с. ЛКиСЛСПБЖ ФГБУ «ВГНКИ» _____ Капустин А.В.

Акт клинических испытаний вакцины «КЛОСТБОВАК-8» в ЗАО «Путиловец Юг»

FROM :

FAX NO. : 88613865485

Dec. 29 2010 01:43AM P1



352040, Россия, Краснодарский край, Павловский район
ст. Павловская, ул. Горького, 292
ИНН 2346013053 / КПП 234601001 / БИК 040349536
р/с 40702810103140000047 / к/с 30101810700000000536
в ОАО "Россельхозбанк", Краснодарский региональный филиал

Исх. 626 «28» - 10 2010 г.

На _____ « _____ » _____ 200__ г.

АКТ

Комиссия в составе: главного ветврача ГУ КК «Ветуправление Павловского района» Н.П. Васильевой, заместителя директора по животноводству ЗАО «Путиловец Юг» Н.А. Мандрыкиной, старшего ветврача ЖК ЗАО «Путиловец Юг» П.В. Крамарь провела анализ эффективности использования вакцины инактивированной против клостридиозов овец и крупного рогатого скота (опытной партии) производства ООО «Ветбиохим» г. Москва, примененной в ЗАО «Путиловец Юг» в порядке производственных испытаний для вакцинации сухостойного поголовья.

В июле – августе 2010 года на животноводческом комплексе ЗАО «Путиловец Юг» возросла заболеваемость взрослого стада, увеличился падеж и вынужденный убой. Всего заболело 92 головы животных на 1-ой фазе лактации (с 0 до 60 день после лактации), из них выбыло 80 голов. По комплексу анамнестических данных, результатов клинических и патологоанатомических исследований было принято решение о необходимости применения вакцины против клостридиозов животных.

В хозяйство из ГУ КК «Кропоткинская краевая ветлаборатория» поступило 300 доз инактивированной вакцины против клостридиозов овец и крупного рогатого скота (ООО «Ветбиохим» г. Москва). Всего подвергнуто вакцинации 135 коров и нетелей – две партии сухостойных животных в период с 31.08.2010г. по 20.10.2010г. Вакцина вводилась в соответствии с наставлением, осложнений после ее применения не наблюдалось.

Выбытия вакцинированных животных в сухостойный и новотельный период не регистрировалось. По состоянию на 28.12.2010г. все животные отелились, сохранность молодняка 98,5%. Значительно по сравнению с предыдущим месяцем отела, возросла продуктивность новотельного поголовья (с 24 до 35 кг в сутки). По данным партиям снизился уровень заболеваемости субклиническими и клиническими маститами.

По результатам комиссионного исследования опытной партии прибором «Соматос» получены результаты, свидетельствующие о снижении количества соматических клеток в молоке.

Заключение.

Комиссия считает, что инактивированная вакцина против клостридиозов овец и крупного рогатого скота (ООО «Ветбиохим» г. Москва), использованная в ЗАО «Путиловец Юг», обеспечила формирование иммунитета у вакцинированного крупного рогатого скота против клостридиозов и может быть рекомендована для использования при показаниях

Главный ветврач ГУ КК
«Ветуправление Павловского района»

Зам. директора по животноводству
ЗАО «Путиловец Юг»

Старший ветврач ЗАО «Путиловец Юг»



Н.П. Васильева

Н.А. Мандрыкина

П.В. Крамарь

Акт клинических испытаний вакцины «КЛОСТБОВАК-8» в ООО «Кубань»

FROM :

FAX NO. : 88613865485

May. 27 2011 03:51AM P.

ОТКРЫТОЕ АКЦИОНЕРНОЕ ОБЩЕСТВО
«КУБАНЬ»
Почтовая ул., 32, ст. Новопокровская,
Краснодарский край, 353020
ОГРН 1062344001708
ИНН 2344014083 КПП 234401001
29.12.2010 № 723
на № _____ от _____

АКТ

Комиссия в составе: главного ветврача ГУ КК «Управление ветеринарии Новопокровского района» В.В. Стрекаловский, директора ГУ КК «Новопокровская райветлаборатория» А.В. Чевкин, директора ОАО «Кубань» С.И. Сыроватко, и.о. главного ветврача ОАО «Кубань» Ю.П. Котова - провела анализ эффективности использования вакцины инактивированной против клостридиозов овец и крупного рогатого скота (опытной партии) производства ООО «Ветбиохим» г. Москва, применённой в ОАО «Кубань» Новопокровского района Краснодарского края в порядке производственных испытаний для вакцинации сухостойного поголовья.

В июне-августе 2010 года на молочно-товарной ферме ОАО «Кубань» возросла заболеваемость крупного рогатого скота взрослого стада, увеличился падеж и вынужденный убой. Всего заболело 51 голова животных на 1-ой фазе лактации (с 0 до 60 день после лактации), из них выбыло из стада 37 голов. По комплексу анамнестических данных, результатов клинических, патологоанатомических и лабораторных исследований было принято решение о необходимости применения вакцины против клостридиозов животных.

В хозяйство из ГУ КК «Кропоткинская краевая ветлаборатория» поступило 150 доз инактивированной вакцины против клостридиоза овец и крупного рогатого скота (ООО «Ветбиохим» г. Москва). Всего подвергнуто вакцинации 68 коров и нетелей – две партии сухостойных животных в период с 05.09.2010г. по 17.10.2010г. Вакцина вводилась в соответствии с наставлением, осложнений после её применения не наблюдалось.

После применения вакцины выбытия вакцинированных животных в сухостойный и новотельный период не регистрировалось. По состоянию на 29.12.2010г. все животные отелились, сохранность молодняка составила 98,1%. По сравнению с предыдущими месяцами отёла, возросла продуктивность новотельного поголовья коров с 18 до 23 кг. в сутки. У вакцинированного маточного поголовья снизился уровень заболеваемости субклиническими и клиническими маститами.

По результатам комиссионного исследования опытной партии прибором «Соматос» получены результаты, свидетельствующие о снижении количества соматических клеток в молоке.

Заключение.

Комиссия считает, что инактивированная вакцина против клостридиозов овец и крупного рогатого скота (ООО «Ветбиохим» г. Москва), использованная в ОАО «Кубань», обеспечила формирование иммунитета у вакцинированного крупного рогатого скота против клостридиозов и может быть рекомендована для использования при показаниях.

главный ветврача ГУ КК «Управление ветеринарии Новопокровского района»

В.В. Стрекаловский

директор ГУ КК «Новопокровская райветлаборатория»

А.В. Чевкин

директора ОАО «Кубань»

С.И. Сыроватко

и.о. главного ветврача ОАО «Кубань»

Ю.П. Котова



Акт клинических испытаний вакцины «КЛОСТБОВАК-8» в ООО «Племзавод им. В.И. Чапаева»

АКТ

Комиссия в составе: Генерального директора ОАО «Племзавод им. В.И. Чапаева» Динского района Краснодарского края, главного ветврача Маркова А.Н., заведующего МТФ №4 Грибанова А.С. в.н.с. лаборатории качества и стандартизации лек. средств против бактериальных болезней животных ФГБУ «ВГНКИ» Капустина А.В. - провела анализ эффективности применения лекарственного препарата «Вакцина против клостридиозов овец и крс инактивированная ассоциированная», экспериментальная серия №1, изготовленная ООО «Ветбиохим» г. Москва.

Вакцину использовали для иммунизации овец для профилактики болезней анаэробной этиологии (злокачественного отека, брадзота, эмкара, энтеротоксемии).

«Вакцина против клостридиозов овец и крс инактивированная ассоциированная», экспериментальная серия №1, изготовленная ООО «Ветбиохим» г. Москва, использовалась для иммунизации маточного стада для создания колострального иммунитета у новорожденных ягнят, а затем проводили вакцинацию молодняка согласно инструкции по применению препарата. Всего иммунизировано 800 голов овцематок и 1746 голов ягнят, полученных от вакцинированных животных.

Осложнений системного или местного характера после применения вакцины у животных не отмечалось.

После применения препарата выбытия животных по причине заболевания животных болезнями анаэробной этиологии не отмечалось. Сохранность молодняка животных составила 96,4 %. Случаев гибели ягнят от клостридиозов, не отмечалось. По сравнению с контрольной группой животных (814 ягнят, полученных от невакцинированных овцематок, возросла продуктивность животных: в среднем убойная масса вакцинированных ягнят составила на 2,1 кг больше, чем животных контрольной группы).

Заключение.

Комиссия считает, что инактивированная вакцина против клостридиозов овец и крс (экспериментальная серия №1, производства ООО «Ветбиохим», г. Москва), использованная ОАО «Племзавод им. В.И. Чапаева», является безвредным и эффективным иммунобиологическим препаратом, позволяющим профилактировать болезни овец, вызванные возбудителями анаэробных болезней животных, и может быть рекомендована для использования в ветеринарной практике.

Генеральный директор
ОАО «Племзавод им. В.И. Чапаева» _____ Овчинник Г.П.

Главный ветврач
_____ Марков А.Н.

Заведующего МТФ №4 _____ Грибанов А.С.

В.н.с. ЛКиСЛСПБЖ ФГБУ «ВГНКИ» _____ Капустина А.В.



АКТ

Комиссия в составе: начальника ГУ КК «Управление ветеринарии Выселковского района» Сопруна Николая Ивановича, главного ветврача предприятия «Газырское» ЗАО фирма «Агрокомплекс» Сыроева Александра Владимировича, ветврача МТФ № 1 Сиренко Екатерины Александровны, в.н.с. лаборатории качества и стандартизации лек. средств против бактериальных болезней животных ФГБУ «ВГНКИ» Капустина А.В. - провела анализ эффективности применения лекарственного препарата «Вакцина против клостридиозов овец и крс инактивированная ассоциированная Клоствовак-8», экспериментальная серия №1, изготовленная ООО «Ветбиохим» г. Москва.

Вакцинация проведена для профилактики столбняка животных. Так в период с 10.05.2010 г. по 01.10.2010 года было диагностировано четыре случая столбняка у телят, получивших незначительные повреждения конечностей и один случай заболевания у новорожденного теленка с воспалением пупочного канатика. Все случаи закончились гибелью животных.

При проведении лабораторных исследований установлено, что возбудитель – высокотоксигенная культура *Clostridium tetani*.

Для профилактики заболевания было вакцинировано 350 телят в возрасте от 1 до 12 месяцев, а также 214 коров и нетелей для создания колострального иммунитета у новорожденных животных.

Вакцину применяли согласно инструкции по применению препарата. Осложнений системного или местного характера после применения вакцины у животных не отмечалось. Наблюдалось образование отеков, проходящих в течение 12 -14 дней самопроизвольно.

В период наблюдения (с 01.10.2010 г. по 01.10.2011 года) среди вакцинированного поголовья не было выявлено случаев столбняка, сохранность животных составила 100%.

Заключение.

Комиссия считает, что «Вакцина против клостридиозов овец и крс инактивированная ассоциированная Клоствовак-8», экспериментальная серия №1, изготовленная ООО «Ветбиохим», является безвредным и эффективным иммунобиологическим препаратом, позволяющим профилактировать столбняк и может быть рекомендована для использования в ветеринарной практике.

Начальник ГУ КК

«Управление ветеринарии Выселковского района»

Главный ветврач предприятия «Газырское»

ЗАО фирма «Агрокомплекс»

Ветврач МТФ № 1

В.н.с. ЛКиСЛСПБЖ ФГБУ «ВГНКИ»

Сопрун Н.И.

Сыроев А.В.

Сиренко Е.А.

Капустин А.В.

