DOI <https://doi.org/10.18551/rjoas.2016-12.30>

**ИЗУЧЕНИЕ ИММУНОГЕННОЙ АКТИВНОСТИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ
АНАЭРОБНОЙ ИНФЕКЦИИ, ВЫЗВАННОЙ У КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА
CLOSTRIDIUM SORDELLII**

**THE STUDY OF IMMUNOGENIC ACTIVITY OF ANAEROBIC INFECTION'S
EXPERIMENTAL VACCINE CAUSED BY CLOSTRIDIUM SORDELLII OF CATTLE**

Капустин А.В., научный сотрудник

Kapustin A.V., Researcher

**ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной
ветеринарии имени Я.Р. Коваленко», Москва, Россия**

All-Russian Research Institute of Experimental Veterinary Medicine

named after Y.R. Kovalenko, Moscow, Russia

E-mail: kapustin_andrei@mail.ru

АННОТАЦИЯ

В статье представлены основные результаты изучения иммуногенной активности вакцины для профилактики болезней, вызываемых *Clostridium sordellii*. Получены перспективные данные, которые позволят в будущем эффективно решать вопросы специфической профилактики заболеваний животных.

ABSTRACT

The article presents main results of study of the immunogenic activity of a vaccine for prevention of disease caused by *Clostridium sordellii*. Obtained promising data that will help in the future to effectively address the specific prevention of animal diseases.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Clostridium sordellii, характеристика возбудителя, болезни крупного рогатого скота, комплексная вакцина, клинические проявления, иммуногенность.

KEY WORDS

Clostridium sordellii, pathogen characteristics, disease of cattle, complex vaccine, clinical manifestations, immunogenicity.

Клостридиозы широко распространены и наносят значительный экономический ущерб сельскому хозяйству. По частоте выделения из патологического материала от животных с признаками анаэробных инфекций преобладают *Clostridium septicum*, *Cl. novyi*, *Cl. chauvoei*, часто в ассоциациях. Несколько реже выделяется *Cl. perfringens* типа А и *Cl. sordellii* (Бевеидж WIB, 1983). Специфическая профилактика является основным и часто единственным надежным способом профилактики этих болезней. В РФ широко применяется вакцинация овец и крупного рогатого скота от эмфизематозного карбункула, бродзота, столбняка, анаэробной энтеротоксемии, злокачественного отека, однако при этом отсутствуют иммунобиологические лекарственные средства, позволяющие профилактировать случаи, вызываемые *Cl. sordellii*.

В настоящее время производителями сельскохозяйственной продукции востребованы для профилактики клостридиозов комплексные вакцины широкого спектра действия. Однако ни в одну из ранее разработанных и выпускаемых в РФ вакцин против анаэробных болезней животных не входит компонент *Cl. sordellii*.

Поэтому была поставлена задача разработать ассоциированную вакцину против наиболее актуальных клостридиозов крупного рогатого скота и овец, включив в ее состав в том числе и компонент *Cl. sordellii*.

Целью работы было изучение распространенности *Cl. sordellii* при заболеваниях крупного рогатого скота анаэробной этиологии, и в случае подтверждения значимости,

разработка препарата для профилактики заболевания.

Cl.sordellii представляет собой грамположительные крупные спорообразующие палочки с закруглёнными концами, располагающиеся изолированно, парно или в виде цепочек, имеющие многочисленные жгутики (перетрихи).

Cl.sordellii не является строгим анаэробом. На поверхности плотных 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, окружённые узкой зоной бета-гемолиза. При культивировании на жидких питательных средах происходит интенсивный рост *Cl.sordellii* в течении 24 часов, сопровождающийся равномерным помутнением среды с образованием вязкого, мукоидного осадка (Willis, 1969) и характерного острого гнилостного запаха (Smith, 1955), в старых бульонных культурах наблюдается образование осадка в виде мелких скоплений белых кристаллов тирозина (Hall et.al. 1921).

Большинство штаммов *Cl.sordellii* ферментирует с образованием кислоты и газа глюкозу и фруктозу, не действует на сахарозу, инсулин, декстрин, гликоген, крахмал, дульцит, лактозу. Лакмусовое молоко под действием *Cl.sordellii* сбивается с выделением небольшого количества газа без образования кислоты. Как правило, *Cl.sordellii* разжижает свернутый яичный белок, свернутую лошадиную сыворотку, желатин, переваривает кусочки мяса и казеина, вырабатывает сероводород и индол, не восстанавливает нитраты в нитриты. Важным свойством культур *Cl.sordellii* является способность продуцировать высокоактивные токсины.

Таким образом, приведенные данные указывают на то, что *Cl.sordellii* нередко обнаруживают в ранах, чаще в ассоциации с другими анаэробными и аэробными микроорганизмами. Вирулентность выделенных штаммов *Cl.sordellii* для лабораторных животных, по-видимому, обусловлена В-токсином, обладающей высокой биологической активностью и специфичностью.

Токсин *Cl.sordellii* впервые был получен Сорделли в 1922 году из культуральной жидкости штамма, выращенного на мясном бульоне с добавлением пентонов при pH 8,0. При введении морским свинкам в дозе 0,01 мл токсин вызывал гибель животных через сутки и не нейтрализовался сыворотками других возбудителей газовой гангрены (*Cl.perfringens*, *Cl.oedematiens*, *Cl.septicum*, *Cl.histolyticum*). В последующем многие ученые приготавливали токсин высокой активности (3000-10000 Dlm/мл), достаточные количества которого накапливалось в культуральной жидкости в течении 24 часов на бульоне с кусочками варёного мяса. Оптимальной средой для накопления таксона питательной бульон из кислотного гидролизата казеина, содержащей 140-160 мг аминокислотного азота с добавлением 0,5% глюкозы.

Cl.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. Характерным признаком присутствия возбудителя при злокачественном отеке является поражение мышечной ткани и подкожной клетчатки, с сильно выраженным студенистым отеком, имеющим желто-коричневую окраску, а также острая токсикоинфекция.

При экспериментальной инфекции *Cl.sordellii* у морских 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 *Cl.sordellii* в тканях появляется газ в больших количествах с резким запахом. Мышечная ткань становится тусклой и рыхлой с обширными кровоизлияниями. Во внутренних органах наблюдается интенсивная гиперемия и кровоизлияния в надпочечниках, почках, кишечнике.

Авторами отмечен ряд особенностей, характерных для экспериментальной газовой гангрены, обусловленной токсином *Cl.sordellii*, включающих: (1) резко выраженный, быстро нарастающий студенистый отек клетчатки и мышц; (2) обширные межмышечные и эндоневральные кровоизлияния, выраженные дегенеративные

изменения в периферических нервных стволах и нервных окончаниях; (3) слабая клеточная реакция в очаге поражения и полное её подавление с нарастанием интоксикации; (4) слабая декомпозиция липопroteидов в некротизирующейся мышечной ткани и стенках сосудов; (5) отсутствие газообразования; (6) кровоизлияния и очаговые дегенеративные изменения в надпочечниках, сердце, почках.

Таким образом, все дегенеративные изменения в тканях и внутренних органах, наблюдаемые при газовой гангрене, вызванной *Cl.sordellii* свидетельствует о глубоких нарушениях процессов метаболизма и тяжелом токсикозе, приводящем к смерти.

Диагностика. Диагноз ставится на основании лабораторных бактериологических исследований патологического материала с учетом комплекса эпизоотических, клинических и патологоанатомических данных болезни. Особое значение при подтверждении диагноза имеет постановка биопробы на морских свинках, которые должны погибнуть в течение 24- 72 часов после введения материала с характерными клиническими признаками (серозно-геморрагический выпот на коже в месте введения, мышцы влажные, темно-красного цвета, увеличен желчный пузырь, при этом кишечник без изменений). Лабораторная диагностика складывается из бактериологического исследования биологического материала. Идентификация и дифференциации происходит путем изучения культуральных, морфологических и биохимических особенностей. В настоящее время идентификация в значительной мере облегчена использованием диагностических тест-систем и ПЦР-диагностики.

Профилактика болезни. Для профилактики болезней, вызванных *Cl.sordellii* в Российской Федерации используют несколько вакцин импортного производства, отечественные аналоги отсутствуют. Однако в настоящее время в связи с развитием интенсивного скотоводства становится актуальным разработка комплексных вакцин широкого спектра действия. Поэтому при разработке ассоциированной вакцины против наиболее актуальных клостридиозов крупного рогатого скота и овец возникла необходимость изготовления антигена из *Cl.sordellii*.

Материалы и методы. В процессе выполнения работы были использованы экспериментальные моновакцины из пяти штаммов *Cl.sordellii*, морские свинки массой 300-350 г, пробирки микробиологические, чашки Петри, анаэроостат, газогенераторные пакеты для анаэробов, питательные среды Китта-Тароцци, Шедлера, Сабуро, МПА, МПБ, шприцы.

Бактериологическое исследования патологического материала от крупного рогатого скота проводили согласно методикам, описанным ГОСТ 26503-85 «Животные сельскохозяйственные. Методы лабораторной диагностики клостридиозов».

Выделенные изоляты клостридий после получения чистых культур и идентификации использовали для изготовления моновакцин. Культивирование изолятов *Cl.sordellii* проводили в питательных средах на основе кислотного гидролизата казеина, рекомендованных для получения максимального количества токсинов.

Инактивация культур осуществлялась путем добавления формалина в концентрации 0,3%. После проверки на остаточную токсичность, культуры адсорбировали на геле гидроокиси алюминия с последующей декантацией 70% надосадочной жидкости. Полученные моноантигены после проверки на стерильность и безвредность, исследовали в опытах на морских свинках с целью определения иммуногенной активности.

Для опыта было сформировано 7 групп морских свинок-аналогов по десять голов в каждой. Животные в шести группах были двукратно вакцинированы моновакцинами с интервалом 28 дней. Вакцины вводили подкожно в области холки с соблюдением правил асептики в объеме 1,0 см³. Животные седьмой группы оставались интактными и использовались в качестве контрольных. Через 14 дней после повторного введения препарата все животные были заражены вирулентной активно растущей культурой музейного штамма *Cl.sordellii* №3 в дозе 10 Ld₅₀, предварительно подтитрованной на аналогичных морских свинках.

Результаты исследования. При проведении микробиологического исследования патологического материала от крупного рогатого скота было выделено 4 изолята

Cl.sordellii, что составляет 6,5% от общего количества выделенных возбудителей клостридиозов.

Для изучения иммуногенности изолятов *Cl.sordellii* из них, а также из имеющихся в нашем распоряжении музейных штаммов *Cl.sordellii* №3 и №44, были приготовлены экспериментальной моновакцины, которые представляли собой инаktivированные формалином концентрированные анатоксины, освобожденные от бактериальных клеток и адсорбированные на геле гидроокиси алюминия.

Каждую из шести групп морских свинок вакцинировали одним из приготовленных антигенов двукратно с интервалом 28 дней в объеме 1,0 мл, контрольным животным седьмой группы одновременно вводили стерильный физиологический раствор в том же объеме.

Через 14 дней после повторной вакцинации всех морских свинок заражали предварительно подтитрованной культурой вирулентного штамма *Cl.sordellii* в дозе 10 Ld₅₀. Учет результатов проводили через 10 суток. Результаты опыта представлены в табл. 1

Таблица 1 – Результаты контроля иммуногенной активности моновакцин из штаммов *Cl.sordellii*

№	Номер/ наименование штамма, из которого изготовлены моновакцины	Доза моновакцины при двукратном 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	50
7	Контрольные	-	10	10	0	0

Как видно из представленных в таблице данных, изготовленные моновакцины из изолятов и музейных штаммов не обеспечивали достаточного уровня иммунитета к заражению вирулентной культурой *Cl.sordellii*. При 100% гибели контрольных животных, наилучшую сохранность подопытных свинок обеспечивала вакцинация антигеном из штамма *Cl.sordellii* №3, при этом она не превышала 60%. Вакцинированных моновакцинами из изолятов «Рязань» и «Липецк», показатели выживаемости животных 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.

В настоящее время работа по подбору высокотоксигенных штаммов *Cl.sordellii* по совершенствованию технологии культивирования микроорганизма и концентрированию анатоксина методом ультрафильтрации, что позволит получать высокоактивный компонент вакцины.

Заключение. Проведенные опыты по изучению иммуногенной активности моновакцин из шести штаммов *Cl.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 *Cl.sordellii*, антигены из обобраных культур возможно добиться необходимой эффективности путем совершенствования технологии приготовления питательных сред, методики и времени культивирования штаммов, а также концентрирования полученных анатоксинов методом ультрафильтрации белков.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Kolesnikova Yu. N. The etiology of anaerobic infections of cattle and comparative characteristics of the isolated strains of clostridium//Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016. Vol. 56. №8. Pp. 39-48.
2. Букова Н. К. Видовой состав клостридий крупного рогатого скота//Вестник ветеринарии. 2013. №1 (64). С. 71-73.
3. Kolesnikova Yu. Etiology and clinico-morphological manifestation of anaerobic enterotoxaemia of young cattle//International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy. 2016. Vol. 7. №S2. Pp. 228-231.
4. Kovaleva E. N. Ecosystems' monitoring with purpose for phage detection of pathogen microorganisms as part of agricultural foresight//Advances in Environmental Biology. 2016. Vol. 10. №3. Pp. 1-3.
5. Kovaleva E. Phage detection of pathogen microorganisms in agricultural ecosystems monitoring as part of sectoral foresight//International Journal of Research in Ayurveda and Pharmacy. 2016. Т. 7. №S2. С. 247-249.
6. Скляр О.Д. Эффективность применения вакцины «кlostбoвaк-8» против клостридиозов крупного рогатого скота, вызванных различными видами Clostridium spp.// Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2016. №9. С. 6-11.
7. Куриленко А. Н., Крупальник В. Л., Пименов Н. В. Бактериальные и вирусные болезни молодняка сельскохозяйственных животных: учебное пособие. М., 2005.
8. Моторыгин А.В. Видовой состав клостридий крупного рогатого скота. //Вестник ветеринарии, №1(64), 2013 г. Стр. 71-73
9. Скородумов Д.И. Микробиологическая диагностика бактериальных болезней животных. //Справочник, Москва, 2005 г. Стр. 344-346
10. Berghaus, R.D. Risk factors associated with hemorrhagic bowel syndrome in dairy cattle / R.D. Berghaus, B.J. McCluskey, R.J. Callan // J. of the Amer. Vet. Med. Assoc. - 2005. - Vol. 226. - P. 1700–1706.
11. Dahms, C. Epidemiology and zoonotic potential of multiresistant bacteria and Clostridium difficile in livestock and food / C. Dahms, N.O. Hubner et al. // GMS Hyg. Infect. Control. - 2014. - Vol. 9(3). – P. 1–16.
12. Glinushkin A. Fundamental principles of pulsed light technique in food preservation: mini review.// Entomology and Applied Science Letters. 2016. Т. 3. №3. С. 47-49.
13. Hathewey, C.L. Toxigenic clostridii / C.L. Hathewey // Clinical Microbiology Reviews. - 1990. - Vol. 3. - P. 66–98.
14. Hickey, M.H. Molecular and cellular basis of microvascular perfusion deficits induced by Clostridium perfringens and Clostridium septicum / M.H. Hickey, R.Y.Q. Kwan, M.M. Awad et al. // PLoS Pathog. - 2008. - Vol. 4. - P. 1000–1045.
15. Kennedy, C.L. The alphatoxin of Clostridium septicum is essential for virulence / C.L. Kennedy, E.O. Krejany, L.F. Young et al. // Mol. Microbiol. - 2005. - Vol. 57. - P. 1357–1366.
16. Laishvets A.I. Pasteurellosis of cattle caused by Mannheimia haemolytica. // Russian Journal of Agricultural and Socio-Economic Sciences. 2016. Т. 52. №4. С. 3-12.
17. Капустин А.В. Изучение эффективности применения поливалентной вакцины «кlostбoвaк-8» на неблагополучном по злокачественному отёку, браздоту и анаэробной энтеротоксемии поголовье мелкого рогатого скота // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. 2016. №11. С. 33-40.
18. Капустин А.В. Питательная среда, обеспечивающая стабильное накопление токсинов при культивировании некоторых штаммов клостридий // В сборнике: Лекарственные препараты для животных (разработка, производство, эффективность и качество): Тезисы докладов международной научной конференции, посвященной 80-летию организации ВГНКИ. 2011. С. 54-56.
19. Капустин А.В. Этиологическое значение клостридий при инфекционных заболеваниях крупного рогатого скота // В сборнике: Лекарственные препараты для животных (разработка, производство, эффективность и качество): Тезисы докладов

- международной научной конференции, посвященной 80-летию организации ВГНКИ. 2011. С. 53-54.
20. Скляр О.Д. Изучение иммуногенной активности столбнячного компонента в составе ассоциированной вакцины против клостридиозов крупного рогатого скота // Ветеринария Кубани. 2016. №4. С. 15-17.
 21. Основные факторы эффективности производства и использования кормов в молочном скотоводстве / Векленко В.И., Жмакина Н.Д. // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. 2015. №8. С. 73-75.
 22. Формирование стада высокопродуктивных коров / Ужик О.В., Пигорев И.Я. // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. 2013. №3. С. 55-56.
 23. Откормочные качества чистопородных и помесных животных / Николайченко О.С., Гончарова Н.А., Кибкало Л.И., Пигорев И.Я. // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. 2011. Т. 5. №5. С. 55-56.
 24. Использование пробиотиков в животноводстве / Мирошниченко О.Н., Подчалимов М.И., Пигорев И.Я. // Вестник Курской государственной сельскохозяйственной академии. 2008. Т. 3. №3. С. 18-20.