



(51) МПК  
*A61K 39/108* (2006.01)  
*A61K 31/739* (2006.01)  
*A61K 31/78* (2006.01)  
*A01K 67/00* (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(52) СПК

*A61K 39/00 (2021.08); A61K 31/739 (2021.08); A61K 31/78 (2021.08); A01K 67/00 (2021.08)*

(21)(22) Заявка: 2021106438, 11.03.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 11.03.2021

Дата регистрации:  
 10.02.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 11.03.2021

(45) Опубликовано: 10.02.2022 Бюл. № 4

Адрес для переписки:

350044, г. Краснодар, ул. Калинина, 13,  
 Кубанский ГАУ, отдел организации и  
 сопровождения научной деятельности

(72) Автор(ы):

Тищенко Александр Сергеевич (RU),  
 Терехов Владимир Иванович (RU),  
 Степаненко Анастасия Владимировна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное  
 образовательное учреждение высшего  
 образования "Кубанский государственный  
 аграрный университет имени И.Т.  
 Трубилина" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
 о поиске: RU 2723709 C1, 17.06.2020. RU  
 2070819 C1, 27.12.1996. ТИЩЕНКО А.С.  
 Влияние адъювантов на иммуногенные  
 свойства эшерихиозного анатоксина /  
 Автореферат диссерт. на соиск. уч. степен.  
 к.в.н., Краснодар, 2011. ТИЩЕНКО А.С. и др.  
 Влияние бактериального полисахарида и  
 полиэлектролита на иммуногенные свойства  
 эшерихиозного анатоксина / Молодой ученый,  
 (см. прод.)

(54) Способ профилактики эшерихиоза у телят

(57) Реферат:

Изобретение относится к области ветеринарии, касается способа профилактики эшерихиоза телят. Способ профилактики эшерихиоза включает двукратную иммунизацию анатоксин-вакциной против эшерихиоза стельных коров с интервалом 15 дней и двукратное введение препарата телятам, рожденным от иммунизированных стельных коров. При этом стельных коров и рожденных от них телят иммунизируют анатоксин-вакциной, которая в качестве адъювантов содержит раствор пирогенала, содержащий 100 мкг действующего вещества, и 3% водный раствор полиакриловой кислоты, внесенные поочередно с последующим перемешиванием в бесклеточную культуральную среду, содержащую инактивированные

формалином до его конечной концентрации 0,4% термолabile, термостабильные и шигаподобные токсины *Escherichia coli*, при следующем соотношении компонентов, мас. %: раствор пирогенала, содержащий 100 мкг действующего вещества 9-11; 3% водный раствор полиакриловой кислоты 9-11; бесклеточная культуральная среда, содержащая инактивированные термолabile, термостабильные и шигаподобные токсины *Escherichia coli* до 100. При этом стельных коров иммунизируют первый раз за 30 дней, а второй раз за 15 дней до отела в дозе 5 и 10 мл соответственно, а телят прививают дважды, первый раз в возрасте 15-20 дней, а второй через 10-14 дней в дозе 1 и 2 мл соответственно. 2 табл.,

5 пр.

(56) (продолжение):

2016, N 20 (124), стр. 113-115. WIELER L.H. et al. Characterization of Shiga-like Toxin Producing Escherichia coli (SL TEE) Isolated from Calves with and without Diarrhoea / Zbl. Bakt., 1992, 276, pages 243-253.

R U  
2 7 6 6 2 4 9  
C 1

R U  
2 7 6 6 2 4 9  
C 1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.  
*A61K 39/108* (2006.01)  
*A61K 31/739* (2006.01)  
*A61K 31/78* (2006.01)  
*A01K 67/00* (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*A61K 39/00 (2021.08); A61K 31/739 (2021.08); A61K 31/78 (2021.08); A01K 67/00 (2021.08)*(21)(22) Application: **2021106438, 11.03.2021**(24) Effective date for property rights:  
**11.03.2021**Registration date:  
**10.02.2022**

Priority:

(22) Date of filing: **11.03.2021**(45) Date of publication: **10.02.2022** Bull. № 4

Mail address:

**350044, g. Krasnodar, ul. Kalinina, 13, Kubanskiy  
GAU, otdel organizatsii i soprovozhdeniya  
nauchnoj deyatel'nosti**

(72) Inventor(s):

**Tishchenko Aleksandr Sergeevich (RU),  
Terekhov Vladimir Ivanovich (RU),  
Stepanenko Anastasiya Vladimirovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethoe  
obrazovatel'noe uchrezhdenie vysshego  
obrazovaniya "Kubanskiy gosudarstvennyy  
agrar'nyy universitet imeni I.T. Trubilina" (RU)**(54) **METHOD FOR PREVENTING ESCHERICHIOSIS IN CALVES**

(57) Abstract:

FIELD: veterinary medicine.

SUBSTANCE: invention relates to the field of veterinary medicine, pertains to a method for preventing escherichiosis in calves. The method for preventing escherichiosis includes double immunisation of pregnant cows with an anatoxin vaccine against escherichiosis at an interval of 15 days and double introduction of the preparation to calves born from the immunised pregnant cows. The pregnant cows and calves born therefrom are therein immunised with an anatoxin vaccine containing a pyrogenal solution containing 100 mcg of the active substance, and a 3% aqueous solution of polyacrylic acid, as adjuvants, introduced consecutively, followed by mixing, into an acellular culture medium containing thermolabile, thermostable and shiga-like Escherichia coli toxins inactivated by formalin until the

final concentration thereof of 0.4%, with the following component ratio, % wt.: pyrogenal solution containing 100 mcg of the active substance 9 to 11; 3% aqueous solution of polyacrylic acid 9 to 11; acellular culture medium containing inactivated thermolabile, thermostable and shiga-like Escherichia coli toxins up to 100. Pregnant cows are therein immunised for the first time 30 days, the second time 15 days prior to calving at a dose of 5 and 10 ml, respectively, and calves are vaccinated twice, for the first time at the age of 15 to 20 days, the second time after 10 to 14 days at a dose of 1 and 2 ml, respectively.

EFFECT: possibility of preventing escherichiosis in calves.

1 cl, 2 tbl, 5 ex

Изобретение относится к области ветеринарии, касается способа профилактики эшерихиоза у телят.

Известен способ профилактики колибактериоза, включающий иммунизацию телят вакциной против эшерихиоза животных (Коли-Вак К88, К99, 987Р, F41, ТЛ и ТС-анатоксины) внутримышечно перед отъемом с интервалом 10-15 дней; при этом первая доза составляет 1 см<sup>3</sup>, вторая - 1,5 см<sup>3</sup> [Наставление по применению вакцины против эшерихиоза животных (Коли-Вак К88, К99, 987Р, F41, ТЛ- и ТС-анатоксины)/Утверждено Департаментом ветеринарии Минсельхоза России 20.06.1997 г.].

Установлено, что эффективными средствами специфической профилактики эшерихиоза у животных являются вакцины, содержащие в своем составе инактивированные экзотоксины патогенных *Escherichia coli* (Биологические препараты для специфической профилактики и терапии эшерихиоза животных/М.К. Пирожков// Дисс. док. вет. наук. - Москва, 2002. - 298 с). В настоящее время есть исследования по использованию биопрепаратов, которые включают сразу три вида токсинов патогенных эшерихий: термолабильный (LT) и термостабильный (ST) и шигагюдобный (STX) токсины, как в чистом виде, так и в сочетании с адъювантами (Караев Я.М. Иммуногенные и протективные свойства эшерихиозного анатоксина: дис. ... канд. вет. наук/Я.М. Караев. - Краснодар: КубГАУ, 2009. - 132 с; Тищенко А.С. Влияние адъювантов на иммуногенные свойства эшерихиозного анатоксина: дис. ... канд. вет. наук/А.С. Тищенко. - Краснодар: КубГАУ, 2011. - 124 с). Однако, этими исследованиями было установлено, что эшерихиозный анатоксин стимулирует клеточные и гуморальные звенья иммунитета в первые сутки после введения препаратов, а использование адъювантов хоть и усиливает иммунный ответ, но на непродолжительное время. Учитывая данные обстоятельства, необходимо искать новые способы повышения иммуногенной активности вакцинных препаратов на основе инактивированных токсинов кишечной палочки.

Известно применение пирогенала и полиакриловой кислоты по-отдельности в качестве адъювантов для усиления иммуногенности эшерихиозного анатоксина, содержащим инактивированные токсины (TL, TS, STX) *E. coli* (Терехов, В.И. Влияние различных адъювантов на иммуногенные свойства эшерихиозного анатоксина/В.И. Терехов, Я.М. Караев, А.С.Тищенко, А.В. Иванов//Тр./КубГАУ. - 2009. - Вып.№1 (ч. 1) Серия: Ветеринарные науки. - С. 100-102.; Тищенко А.С.и др. Влияние бактериального полисахарида и полиэлектролита на иммуногенные свойства эшерихиозного анатоксина/Молодой ученый. - 2016. - №20 (124). - С. 113-115.; Тищенко А.С, Терехов В.И., Сердюченко И.В. Иммуногенность эшерихиозного анатоксина при использовании с пирогеналом и полиакриловой кислотой//Научное обеспечение агропромышленного комплекса: сб. ст.по материалам X Всерос. конф. молодых ученых. - Краснодар: КубГАУ, 2017 - С. 287-288.).

Недостатком известных исследований является то, что эшерихиозный анатоксин с использованием в качестве адъюванта пирогенала и эшерихиозный анатоксин с использованием в качестве адъюванта полиакриловой кислоты обладали низкими иммуногенными свойствами, что негативно сказывалось на формировании и продолжительности поствакцинальной защиты у животных против токсинов кишечной палочки. Кроме того, биологической моделью в этих исследованиях выступали белые крысы и кролики и неизвестно, как будут проявлять себя компоненты вакцины на телятах.

Известно применение адъювантов, в том числе полиакриловой кислоты и пирогенала, в сочетании с эшерихиозным анатоксином в опытах на стельных коровах и супоросных

свиноматках (Тищенко А.С. Влияние адъювантов на иммуногенные свойства эшерихиозного анатоксина: дис. ... канд. вет. наук/А.С.Тищенко. - Краснодар: КубГАУ, 2011. - 124 с; Тищенко, А.С. Оценка гуморального иммунного ответа у супоросных свиноматок, иммунизированных эшерихиозным анатоксином в сочетании с адъювантами/А.С.Тищенко, В.И. Терехов//Тр./КубГЛУ. - 2011. - Вып. №2 (29). - С. 144-147; Терехов, В.И. Влияние адъювантов на иммуногенные свойства эшерихиозного анатоксина при вакцинации стельных коров/В.И. Терехов, А.С. Тищенко//Ветеринария Кубани. - 2011. - №3. - С. 19-21; а также определена профилактическая эффективность данных препаратов (Тищенко, А.С. Профилактическая эффективность эшерихиозного анатоксина при эшерихиозе телят/А.С. Тищенко, В.И. Терехов//Опыт международного сотрудничества в области экологии, лесного хозяйства, ветеринарной медицины и охотоведения: материалы II-й Междунар. науч. - практ. конф./КубГАУ. - Краснодар, 2010. - С. 380-381).

Недостатком известных исследований является то, что эшерихиозный анатоксин с использованием по отдельности в качестве адъювантов пирогенала и полиакриловой кислоты обладали непродолжительным иммунным ответом, что отражалось на эффективности специфической профилактики эшерихиоза. Кроме того, адъювантные компоненты, применяемые с эшерихиозным анатоксином по-отдельности, в целом обладают слабой иммуногенностью и могут проявлять ректогенность.

Известен способ получения эшерихиозного анатоксина (патент №2432174 от 27.10.2011, МПК А61К 39/108, С12N 1/20, А61P 1/00), в котором, отбирают и отдельно культивируют эпизоотические штаммы *Escherichia coli*, обладающие генами термолabileного, термостабильного и шигаподобного токсинов, на питательном бульоне при температуре 37°C в течение 6-7 дней с ежедневным двукратным перемешиванием. Инактивацию культур проводят путем добавления формалина до концентрации не более 0,4%, при температуре 37°C в течение 14 суток с ежедневным двукратным перемешиванием. После чего отбирают и смешивают культуры в равных соотношениях, отделяют бактериальную массу с помощью стерилизующей фильтрации и получают комплексный препарат.

Недостатком данного способа является отсутствие адъювантов, и как следствие низкая иммуногенная активность препарата, что недостаточно обеспечивает эффективность профилактики эшерихиоза у животных.

Известно использование высокоактивного неспецифического иммуномодулирующего препарата широкого спектра действия «Пирогенал», который вводят внутримышечно до родов в дозе 0,1 мкг/кг массы тела беременных животных, а именно в первую половину беременности выполнение в количестве 10 инъекций с интервалом 1 день, а во вторую половину беременности 5 инъекций с интервалом 2 дня, общим курсом 15 инъекций (патент РФ №2654563, кл. А01К 67/02, 2018 г.).

Наиболее близким по технической сущности является техническое решение (патент РФ №2612081, кл. А61К 39/02, 2017 г.), включающее двукратную иммунизацию вакциной против эшерихиоза стельных коров с интервалом 15 дней и двукратное введение препарата телятам рожденных от иммунизированных стельных коров.

Недостатком известного способа является недостаточная эффективность специфической профилактики эшерихиоза у телят.

Техническим результатом изобретения является повышение эффективности специфической профилактики эшерихиоза у телят.

Технический результат достигается тем, что в способе профилактики эшерихиоза у телят, включающем двукратную иммунизацию анатоксин-вакциной против эшерихиоза

стельных коров с интервалом 15 дней и двукратное введение препарата телятам рожденных от иммунизированных стельных коров, согласно изобретению, стельных коров и рожденных от них телят иммунизируют вакциной, которая в качестве адьювантов содержит раствор пирогенала содержащий 100 мкг/мл действующего вещества и 3% водный раствор полиакриловой кислоты, внесенные поочередно с последующим перемешиванием в бесклеточную культуральную среду, содержащую инактивированные формалином до его конечной концентрации 0,4% термобильные, термостабильные и шигаподобные токсины *Escherichia coli*, при следующем соотношении компонентов, мас. %:

10	раствор пирогенала, содержащий 100 мкг действующего вещества	9-11
	3% водный раствор полиакриловой кислоты	9-11
	бесклеточная культуральная среда, содержащая инактивированные термобильные, термостабильные и шигаподобные	
15	токсины <i>Escherichia coli</i>	до 100,

при этом стельных коров иммунизируют первый раз за 30 дней, а второй раз за 15 дней до отела в дозе 5 и 10 мл соответственно, а телят прививают дважды, первый раз в возрасте 15-20 дней, а второй через 10-14 дней в дозе 1 и 2 мл соответственно.

Новизна технического решения состоит в том, что за счет использования бесклеточных культур эпизоотических штаммов *Escherichia coli*, продуцирующих термобильный, термостабильный и шигаподобный токсины, инактивированных формалином, при совместном использовании растворы пирогенала и полиакриловой кислоты обеспечивается повышение иммуногенных свойств вакцины и эффективности профилактики эшерихиоза у телят, а также безвредность биопрепарата за счет отсутствия после применения, поствакцинальных реакций.

В патентной и научно-технической литературе не обнаружена аналогичная заявляемой совокупность признаков, что позволяет судить об изобретательском уровне заявляемого предложения.

Предложенный способ профилактики эшерихиоза у телят соответствует критерию «промышленная применимость», поскольку может быть широко использован в животноводческих комплексах.

Способ профилактики эшерихиоза у телят осуществляется следующим образом.

Эффективность использования вакцины против эшерихиоза зависит от свойств подобранных эпизоотических штаммов *Escherichia coli*, последовательности приготовления и процентного соотношения компонентов входящий в ее состав, таких как: - пирогенал (фармацевтический препарат, выпускается в ампулах, в виде раствора для внутримышечного введения в дозе 1 мл которого, содержится 100 мкг действующего вещества - липополисахарид (ЛПС), выделенный из клеток *Salmonella typhi*) (EAN: 4602379000047) - 8 мл (8 ампул по 1 мл) - (8%); 9 мл (9 ампул по 1 мл) - (9%); 10 мл (10 ампул по 1 мл) - (10%); 11 мл (11 ампул по 1 мл) - (11%) и 12 мл (12 ампул по 1 мл) - (12%);

- 3% водный раствор полиакриловой кислоты - 8 мл (8%); 9 мл (9%); 10 мл (10%); 11 мл (11%) и 12 мл (12%).

Для иммунизации стельных коров и телят полученных от этих стельных коров используют вакцину, которая в качестве адьювантов содержит раствор пирогенала содержащий 100 мкг действующего вещества и 3% водный раствор полиакриловой кислоты, внесенные поочередно с последующим перемешиванием в бесклеточную культуральную среду, содержащую инактивированные формалином до его конечной

концентрации 0,4% термолабильные, термостабильные и шигаподобные токсины *Escherichia coli*, при следующем соотношении компонентов, мас. %:

5	раствор пирогенала, содержащий 100 мкг действующего вещества	9-11
	3% водный раствор полиакриловой кислоты	9-11
	бесклеточная культуральная среда, содержащая инактивированные термолабильные, термостабильные и шигаподобные токсины <i>Escherichia coli</i>	до 100

10 Стельных коров иммунизируют первый раз за 30 дней, а второй раз за 15 дней до отела в дозе не более 5 и 10 мл соответственно, а телят прививают дважды, первый раз в возрасте 15-20 дней, а второй через 10-14 дней в дозе не более 1 и 2 мл соответственно.

15 Периоды двукратной иммунизации стельных коров обусловлены тем, что на последней стадии беременности начинает происходить образование молозива, которое необходимо наполнить антителами, путем иммунизации, поэтому первое введение препарата за 30 дней до отела. Проводить иммунизацию раньше 30 дней до отела не целесообразно, поскольку защитные антитела не накопятся в молозиве в достаточных титрах. Вторая иммунизация за 15 дней - проводится с целью увеличения молозивных антител, для повышения иммунного статуса организма стельной коровы перед отелом, что положительно влияет на плод, также, повышая его иммунитет перед эшерихиозной 20 инфекцией. Кроме того, установлено, что защитные антитела против возбудителей эшерихиоза не передаются внутриутробно от коров-матерей к плоду. Это объясняется тем, что плацента коров является непроницаемой для передачи материнских антител к плоду. Поэтому единственным фактором защиты новорожденных телят от эшерихиозной инфекции является колостральный иммунитет за счет специфических 25 иммуноглобулинов, содержащихся в молозиве.

30 Что касается доз 5 и 10 мл для стельных коров, то они были подобраны экспериментальным путем, увеличенная доза на втором введении обладает потенцирующим действием, что положительно сказывается на выработке антител. При введении меньших доз, не вырабатывается достаточное количество антител, при 30 больших дозах выработка антител угнетается, кроме того, возможны местные поствакцинальные реакции.

Двукратное введение вакцины телятам и рекомендованные дозы подобраны экспериментальным путем, вакцинацию проводят в соответствии со следующими периодами:

- 35 - в возрасте 15-20 дней, так как в этот период содержание пассивно полученных молозивных антител у теленка уменьшается, и для поддержания иммунного статуса животного, необходимо ввести в их организм анатоксин-вакцину в количестве 1 мл;
- 40 - повторно через 10-14 дней в дозе 2 мл, что достаточно для стимулирования собственного активного иммунитета и накопления необходимого уровня антител против эшерихиозной инфекции. Если взять меньшее количество вакцины, то не будет обеспечиваться требуемый уровень защитных антител, а при большем - выработка антител угнетается и возможны местные реакции в виде припухлостей и раздражений.

Пример конкретного осуществления способа профилактики эшерихиоза у телят.

45 Результаты исследований использования вакцины для профилактики эшерихиоза у телят.

В хозяйстве Краснодарского края, неблагополучном по эшерихиозу телят, провели производственное испытание заявляемой вакцины. По данным ветеринарной лаборатории диарею у молодняка крупного рогатого скота в данном хозяйстве

вызывают патогенные штаммы кишечной палочки. Эффективность вакцины, изготовленной по заявляемому способу, сравнивали с эффективностью прототипа, для этого было сформировано 3 группы стельных коров по 25 голов в каждой.

Первую группу коров иммунизировали заявляемой вакциной 1-й раз за 30 дней до отела в дозе 5 мл, 2-й раз за 15 дней до отела в дозе 10 мл. Полученных от этих коров телят, также иммунизировали заявляемой вакциной 1-й раз в возрасте 15-20 дней в дозе 1 мл, а 2-й - через 10-15 дней в дозе 2 мл. Вакцину вводили подкожно в область верхней трети шеи.

Вторую группу коров и полученных от них телят иммунизировали эшерихиозным вакциной с раствором пирогенала содержащий 100 мкг действующего вещества по схеме и в дозах аналогичных в первой группе.

Третью группу коров и полученных от них телят иммунизировали эшерихиозным вакциной с водным раствором полиакриловой кислоты по схеме и в дозах аналогичных в первой группе.

Четвертую группу коров и полученных от них телят иммунизировали эшерихиозным вакциной без адьювантов по схеме и в дозах аналогичных в первой группе.

Пятая группа коров была контрольной, они и полученные от них телята не иммунизировались.

Эффективность вакцин оценивали по достижении телятами 3-месячного возраста и перевода их другой корпус на групповое содержание. Критериями оценки служили показатели заболеваемости и летальности.

Результаты опыта отражены в таблице 1, из материалов которой, видно, что в первой группе эшерихиозная инфекция была зарегистрирована у 2 телят, при этом диарею у них удалось купировать в течение 3 дней, а на 5 день телята полностью выздоровели. Таким образом, профилактическая эффективность заявляемой вакцины составила 92%.

Во 2-ой группе эшерихиозная инфекция была зарегистрирована у 5 телят, причем у одного теленка она протекала очень тяжело и закончилась гибелью животного. Профилактическая эффективность аналога составила 80%.

Таблица 1 – Эффективность использования вакцин при эшерихиозе у телят

Группа	Кол-во телят в группе	Заболело, гол/Заболеваемость, %	Защита (эффективность), %	Пало, гол	Летальность, %	Сохранность, %
1. Иммунизировалась заявляемой вакциной	25	2/8	92	0	0	100
2. Иммунизировалась аналогом 1 (вакцина с раствором пирогенала)	25	5/20	80	1	20	96
3 Иммунизировалась аналогом 2 (вакцина с раствором полиакриловой кислоты)	25	6/24	76	2	33,3	92
4 Иммунизировалась аналогом 3 (вакцина без адьювантов)	25	8/32	68	3	37,5	88
5. Не иммунизировалась (контроль)	25	18/72	-	5	27,8	80

В третьей группе эшерихиозная инфекция была зарегистрирована у 6 телят, у двоих телят она протекала очень тяжело и закончилась гибелью животных. Профилактическая эффективность аналога составила 76%.

В четвертой группе эшерихиозная инфекция была зарегистрирована у 8 телят, из них у троих телят она протекала очень тяжело и закончилась гибелью животных. Профилактическая эффективность прототипа составила 68%.



В пятой группе из 25 телят заболело 18 животных, из которых 5 пали. Таким образом, в 3 группе заболеваемость составила 72%, а летальность - 27,8%, что свидетельствует о значительной тяжести болезни.

Следовательно, применение вакцины против эшерихиоза, используемой в заявляемом способе позволило более эффективно профилактировать заболевание телят эшерихиозной инфекцией. Заболеваемость телят привитых заявляемой вакциной составила 8%, а сохранность 100%, тогда как при использовании аналога 1 заболеваемость телят составила 20%, а сохранность 96%, аналога 2 - заболеваемость 24%, сохранность 92%, аналога 3 - заболеваемость 32%, сохранность 88%. В контрольной группе заболеваемость телят острой кишечной инфекцией составила 72%, а сохранность 80%.

Иммуногенные свойства эшерихиозной вакцины изучали у телят, полученных от вакцинированных стельных коров. Сыворотку крови для определения наличия антитоксических антител в реакции диффузной преципитации отбирали через 7, 14, 28 и 56 дней после последней их вакцинации.

Влияние применения вакцин на титр антител у телят представлены в таблице 2, из данных которой видно, что иммунизация коров и телят заявляемым способом обеспечивает более напряженный и продолжительный специфический иммунитет против эшерихиозной инфекции. Об этом свидетельствуют количество антител к токсинам кишечной палочки у телят, которых у животных первой группы в 2-16 раз больше, чем у животных из второй и третьей группы, и 8-32 раза больше, чем у животных четвертой и пятой групп.

Таблица 2 – Результаты сравнительного изучения иммуногенных свойств вакцины и аналогов

Группа животных	Титр антиоксических антител после последнего введения препаратов			
	На 7-й день	На 14-й день	На 28-й день	На 56-й день
1. Иммунизировалась заявляемой вакциной	1:16-1:32	1:32-1:64	1:32-1:64	1:16-1:32
2. Иммунизировалась аналогом 1 (вакцина с раствором пирогенала)	1:8-1:16	1:16-1:32	1:8-1:16	1:4-1:8
3 Иммунизировалась аналогом 2 (вакцина с раствором полиакриловой кислоты)	1:8-1:16	1:8-1:16	1:8-1:16	1:4-1:8
4 Иммунизировалась аналогом 3 (вакцина без адьювантов)	1:4-1:8	1:2-1:8	1:2-1:4	1:2-1:4
5. Не иммунизировалась (контроль)	1:2-1:4	1:2-1:4	1:2-1:4	1:2-1:4

Эффективность использования вакцины в способе профилактики эше-рехиоза у телят зависит от свойств подобранных эпизоотических штаммов *Escherichia coli*, последовательности приготовления и процентного соотношения компонентов входящий в ее состав.

Количественные значения ввода адьювантов подобраны экспериментальным путем, при этом учитывалась иммуногенная активность вакцины. При вводе растворов пирогенала и полиакриловой кислоты в объеме 8% иммуногенная активность повышалась, но все же была не достаточной для длительного сохранения поствакцинального иммунитета. При вводе адьювантов в объеме 12%, увеличения продукции специфических антител более значения, чем при их вводе в объеме 9-11% не происходило, а экономические затраты возрастали. Кроме того, вслед за повышением ввода раствора полиакриловой кислоты возрастала опасность развития местной

воспалительной реакции из-за раздражения тканей.

Приведено пять примеров (1-5) зависимости эффективности вакцины против эшерихиоза телят от соотношения заявленных компонентов из расчета на 100 мл вакцины.

5 Для примеров 1-5 использовали эпизоотические штаммы *Escherichia coli*, обладающие генами термолабильного, термостабильного и шигаподобного токсинов, проводили их культивирование на питательном бульоне при температуре 37°C в течение 6-7 дней с ежедневным двукратным перемешиванием, затем их инактивировали формалином  
10 перемешиванием, после чего отбирали и смешивали культуры в равных соотношениях, отделяли бактериальную массу с помощью стерилизующей фильтрации, для получения бесклеточной культуральной среды, в которую поочередно с последующим перемешиванием вносили адъюванты со следующими объемными количествами и процентным соотношением:

15 Пример 1 - при следующем соотношении компонентов, масс. %:

	раствор пирогенала, содержащий 100 мкг действующего вещества	8
	3% водный раствор полиакриловой кислоты	8
20	бесклеточная культуральная среда, содержащая токсины <i>Escherichia coli</i>	до 100

При данном соотношении компонентов вакцина обладает слабой протективной активностью и защищает от эшерихиозной инфекции, обусловленной патогенными *Escherichia coli* телят в 75%.

Пример 2. При следующем соотношении компонентов, масс. %:

25	раствор пирогенала, содержащий 100 мкг действующего вещества	9
	3% водный раствор полиакриловой кислоты	9
	бесклеточная культуральная среда, содержащая токсины <i>Escherichia coli</i>	до 100

30 При данном соотношении компонентов вакцина защищает от эшерихиозной инфекции, обусловленной патогенными *Escherichia coli*, телят в 86% случаев.

Пример 3. При следующем соотношении компонентов, масс. %:

	раствор пирогенала, содержащий 100 мкг действующего вещества	10
35	3% водный раствор полиакриловой кислоты	10
	бесклеточная культуральная среда, содержащая токсины <i>Escherichia coli</i>	до 100

40 При данном соотношении компонентов анатоксин-вакцина защищает от эшерихиозной инфекции, обусловленной патогенными *Escherichia coli*, телят в 92% случаев.

Пример 4. При следующем соотношении компонентов, масс. %:

	раствор пирогенала, содержащий 100 мкг действующего вещества	11
	3% водный раствор полиакриловой кислоты	11
45	бесклеточная культуральная среда, содержащая токсины <i>Escherichia coli</i>	до 100

При данном соотношении компонентов вакцина защищает от эшерихиозной инфекции, обусловленной патогенными *Escherichia coli*, телят в 94% случаев.

## Пример 5. При следующем соотношении компонентов, масс. %:

	раствор пирогенала, содержащий 100 мкг действующего вещества	12
	3% водный раствор полиакриловой кислоты	12
5	бесклеточная культуральная среда, содержащая токсины <i>Escherichia coli</i>	до 100

При данном соотношении компонентов вакцина защищает от эшерихиозной инфекции, обусловленной патогенными *Escherichia coli*, телят в 84%, случаев. На месте введения у отдельных животных, особенно из числа телят развились плотные болезненные припухлости и повышение температуры тела.

Вакцину для использования в способе профилактики эшерихиоза телят производят следующим образом.

Первоначальные этапы получения эшерихиозной вакцины осуществляли по патенту РФ на изобретение №2432174 от 27.10.2011, МПК А61К 39/108, С12N 1/20, А61Р 1/00.

Предварительно из эпизоотических штаммов *Escherichia coli* отобрали штаммы, обладающие генами термолабильного, термостабильного и шигаподобного токсинов. Для этого использовали тест-системы «АмплиСенс *E.coli*-tox» (Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии МЗ РФ, г. Москва). Подтверждение токсипообразования на искусственной питательной среде осуществляли с помощью биотеста на инфузориях-стилонихиях (патент РФ на изобретение 2262529 от 20.10.2005, МПК С12N 1/10, С12Q 1/10). По известному патенту, для испытания по выживаемости инфузорий использовали культуру кишечной палочки, выращенную на бульоне Хоттингера со сроком инкубации 1-3 суток, затем среду с инфузориями смешивали с бульонной культурой кишечной палочки в соотношении 3:1. При наличии в культуральной среде экзотоксинов, количество погибших инфузорий должно быть не менее 70-80%, в то время как количество погибших инфузорий в контрольной пробе, не содержащей токсин, не должно превышать 5%.

Отобранные штаммы по отдельности засеивали в пробирки с 10 мл питательного бульона для накопления токсинов кишечной палочки, в состав которой входят кислотный гидролизат крови (9-11%), аутолизат пекарских дрожжей (9-11%), пептон (0,9-1,1%), натрия хлорид (0,4-0,6%), двузамещенный фосфорнокислый натрий (0,05-0,15%) и калия хлорид (0,01-0,03%) (патент РФ на изобретение 2342425 от 27.12.2008, МПК С12N 1/20, С12Q 1/04). Затем их помещали в термостат и культивировали при 37°C в течение 6-8 ч до появления легкой мути, свидетельствующей о росте микроорганизмов. Далее полученные культуры переносили в колбы с 200-300 мл аналогичного питательного бульона и инкубировали при 37°C в течение: продуцирующие термолабильный и термостабильный - 6 суток, а продуцирующие шигаподобный токсин - 7 суток. Ежедневно 2 раза в сутки колбы встряхивали. Перед окончанием инкубирования из каждой колбы отобрали по 10 мл культуральной жидкости, центрифугировали при 10 тыс.об/мин в течение 30 мин и определяли методом биотестирования на инфузориях наличия токсинов.

При наличии токсинов в оставшиеся культуры добавили формалин до концентрации 0,3-0,4%. Инактивацию культур проводили в течение 14 суток при температуре 37°C с ежедневным двукратным перемешиванием. После завершения инактивации равные объемы культур объединяли, получив, таким образом, комплексный препарат, содержащий 3 вида антигенов. С помощью стерилизующей фильтрации отделили микробную массу от среды культивирования, получая, таким образом, бесклеточную культуральную среду *Escherichia coli* (эшерихиозный антигенный токсидный

компонент). Далее в бесклеточную культуральную среду *Escherichia coli*: вносили адьюванты: препарат пирогенал (липополисахарид, выделенный из микробных клеток *Salmonella typhi*, производитель ФГБУ ПИЦЭМ им Н.Ф. Гамалеи Минздрава России) в 0,01% концентрации и 3% раствор полиакриловой кислоты (производства ООО Химдирект сервис, Москва) при следующем соотношении компонентов, мас. %:

	раствор пирогенала, содержащий 100 мкг действующего вещества	9-11
	3% водный раствор полиакриловой кислоты	9-11
10	бесклеточная культуральная среда, содержащая инактивированные термолабильные, термостабильные и шигаподобные токсины <i>Escherichia coli</i>	до 100

Использование вакцины в заявляемом способе позволяет обеспечить защиту телят от эшерихиозной инфекции продолжительностью не менее 6 месяцев (срок наблюдения).

#### 15 (57) Формула изобретения

Способ профилактики эшерихиоза у телят, включающий двукратную иммунизацию анатоксин-вакциной против эшерихиоза стельных коров с интервалом 15 дней и двукратное введение препарата телятам, рожденным от иммунизированных стельных коров, отличающийся тем, что стельных коров и рожденных от них телят иммунизируют анатоксин-вакциной, которая в качестве адьювантов содержит раствор пирогенала, содержащий 100 мкг/мл действующего вещества, и 3% водный раствор полиакриловой кислоты, внесенные поочередно с последующим перемешиванием в бесклеточную культуральную среду, содержащую инактивированные формалином до его конечной концентрации 0,4% термолабильные, термостабильные и шигаподобные токсины *Escherichia coli*, при следующем соотношении компонентов, мас. %:

	раствор пирогенала, содержащий 100 мкг действующего вещества	9-11
	3% водный раствор полиакриловой кислоты	9-11
30	бесклеточная культуральная среда, содержащая инактивированные термолабильные, термостабильные и шигаподобные токсины <i>Escherichia coli</i>	до 100,

при этом стельных коров иммунизируют первый раз за 30 дней, а второй раз за 15 дней до отела в дозе 5 и 10 мл соответственно, а телят прививают дважды, первый раз в возрасте 15-20 дней, а второй через 10-14 дней в дозе 1 и 2 мл соответственно.

40

45