

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ,
РАДИАЦИОННОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ»

На правах рукописи

АКБАШЕВ ИЛЬГИЗАР РАСИЛОВИЧ

**УСОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ СРЕДСТВ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ
ПРОФИЛАКТИКИ ВИРУСНО-ХЛАМИДИЙНЫХ ИНФЕКЦИЙ
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

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

**ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата ветеринарных наук**

Научный руководитель:
доктор биологических наук, доцент,
Евстифеев Виталий Валерьевич

Казань – 2021

ОГЛАВЛЕНИЕ

	стр.
1 ВВЕДЕНИЕ.....	4
2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
2.1 Краткая характеристика респираторно-кишечных инфекций крупного рогатого скота.....	11
2.2 Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота.....	13
2.2.1 Основные биологические свойства инфекционного ринотрахеита.....	13
2.2.2 Клинико-эпизоотологические особенности инфекционного ринотрахеита.....	15
2.2.3 Диагностика инфекционного ринотрахеита.....	18
2.3 Парагрипп-3 крупного рогатого скота.....	19
2.3.1 Основные биологические свойства парагриппа-3.....	19
2.3.2 Клинико-эпизоотологическая особенность парагриппа-3.....	21
2.3.3 Диагностика парагриппа-3.....	23
2.4 Вирусная диарея-болезнь слизистых оболочек крупного рогатого скота.....	24
2.4.1 Основные биологические свойства вирусной диареи-болезни слизистых оболочек	24
2.4.2 Клинико-эпизоотологическая особенность вирусной диареи-болезни слизистых оболочек	26
2.4.3 Диагностика вирусной диареи-болезни слизистых оболочек	28
2.5 Хламидийная инфекция крупного рогатого скота.....	29
2.5.1 Основные биологические свойства хламидий.....	29
2.5.2 Клинико-эпизоотологическая особенность хламидий.....	31
2.5.3 Диагностика хламидий.....	33
2.6 Специфическая профилактика респираторно-кишечных инфекций.....	35
3 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	
3.1 Материалы исследования.....	38
3.2 Методы исследования.....	40

3.3 Результаты собственных исследований	
3.3.1 Клинико-эпизоотологическое обследование и серо-иммунологический мониторинг животноводческих хозяйств.....	46
3.3.2 Определение оптимальных условий репродукции вируса ВД-БС штамм «ВК-1» (ВИЭВ) на различных перевиваемых культурах клеток.....	52
3.3.2.1 Изучение чувствительности различных линий культур клеток к вирусу ВД-БС штамм «ВК-1» (ВИЭВ).....	53
3.3.2.2 Определение факторов, влияющих на репродукцию вируса ВД-БС штамм «ВК-1» (ВИЭВ) в культуре клеток.....	55
3.3.3 Разработка методики изготовления инактивированного антигена вируса ВД-БС штамм «ВК-1» (ВИЭВ) для конструирования ассоциированной вакцины.....	61
3.3.4 Конструирование экспериментальных образцов усовершенствованной ассоциированной вакцины против ИРТ, ПГ-3, ВД-БС и хламидиоза крупного рогатого скота и изучение их на лабораторных животных.....	64
3.3.4.1 Испытание различных адьювантов в составе ассоциированной вакцины.....	66
3.3.5 Изучение антигенной активности и иммуногенности «Ассоциированной вакцины против ИРТ, ВД-БС, ПГ-3 и хламидиоза крупного рогатого скота инактивированной эмульсионной» на телятах.....	79
3.3.6 Эффективность применения ассоциированной вакцины против ИРТ, ВД-БС, ПГ-3 и хламидиоза крупного рогатого скота в условиях неблагополучного хозяйства.....	87
4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	91
5 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.....	93
6 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	94
7 СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	96
8 ПРИЛОЖЕНИЯ.....	117

1 ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Массовые заболевания новорожденных телят с симптомами конъюнктивита, поражения верхних и нижних дыхательных путей, гастроэнтеритов, представляют наиболее серьезную проблему для животноводческих хозяйств во многих регионах Российской Федерации [12,15,16,19,24,26,42,47,87,90]. Несмотря на то что, в той или иной мере в инфекционном процессе могут принимать участие большое число микроорганизмов различной природы, как правило, главная роль принадлежит только нескольким возбудителям, таким как вирусы ПГ-3, ИРТ и ВД-БС, а также хламидиям [24,25,34,42,63,87]. Учитывая вышеизложенное, становится очевидно, что профилактика заболеваний, вызываемых данными инфекционными агентами должна проводиться с использованием ассоциированных вакцин [3,10,21,46,53,117,132,158,172,176].

Инактивированные вакцины, в силу своей безопасности и достаточно высокой иммуногенности, наиболее предпочтительны для профилактики инфекций, вызывающих патологию органов воспроизводства у коров и телок, а также респираторно-кишечных инфекций у телят. Использование инактивированных вакцин играет весьма высокую и важную роль в профилактике инфекционных болезней, возбудителей которых способны длительное время персистировать в организме животных на иммунном фоне [53].

Ранее, в лаборатории вирусных и хламидийных инфекций разработана, испытана с положительными результатами и зарегистрирована Федеральной службой по ветеринарному и фитосанитарному надзору «Ассоциированная вакцина против парагриппа-3, инфекционного ринотрахеита и хламидиоза крупного рогатого скота инактивированная эмульсионная». Препарат прошёл широкие производственные испытания, применяется в хозяйствах многих регионов Российской Федерации. При этом была установлена его высокая эффективность при профилактике респираторных и желудочно-кишечных инфекций крупного рогатого скота [25,46].

Однако, в связи с завозом в Российскую Федерацию импортного поголовья КРС, предположительно повлекшее за собой проникновение на территорию РФ новых возбудителей инфекционных болезней, разработанная ранее вакцина против вирусных и хламидийных инфекций КРС понизила свою профилактическую эффективность, по всей видимости, ввиду изменения этиологической структуры в инфекционной патологии крупного рогатого скота [16,19,35,90,94].

Следует отметить, что как раз в это время, при обследовании неблагополучного по заболеванию телят хозяйства, в которое завезли импортное поголовье скота, из патологического материала от павшего теленка, был выделен цитопатогенный агент, идентифицированный как вирус вирусной диареи – болезни слизистых оболочек крупного рогатого скота, который, предположительно, мог являться этиологическим фактором заболеваемости животных пневмоэнтеритами.

Исходя из этого, целесообразно было провести серо-иммунологического мониторинг неблагополучных стад с целью выяснения этиологической роли вируса вирусной диареи в инфекционной патологии молодняка КРС, с целью дальнейшего усовершенствования средств специфической профилактики путем включения в их состав антигена вирусной диареи-болезни слизистых оболочек КРС.

Цели и задачи исследования.

Цель работы - усовершенствование ассоциированной вакцины против ПГ-3, ИРТ и хламидиоза крупного рогатого скота инактивированной эмульсионной.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

1. Провести клинико-эпизоотологический и серо-иммунологический мониторинг животноводческих хозяйств, неблагополучных по респираторно-кишечным инфекциям;
2. Изучить репродукцию вируса ВД-БС штамма «ВК-1» (ВИЭВ) на различных перевиваемых культурах клеток, установить факторы,

влияющие на уровень накопления вируса и изыскать оптимальные параметры для его крупно-масштабного культивирования;

3. Разработать способ получения антигена вируса ВД-БС для включения в состав ассоциированной вакцины;

4. Изготовить экспериментальные образцы усовершенствованной ассоциированной вакцины против ИРТ, ПГ-3, ВД-БС и хламидиоза крупного рогатого скота и изучить их на лабораторных животных;

5. Изучить иммуногенность ассоциированной вакцины против ИРТ, ПГ-3, ВД-БС и хламидиоза крупного рогатого скота в остром опыте;

6. Оценить эффективность применения ассоциированной вакцины против ИРТ, ПГ-3, ВД-БС и хламидиоза крупного рогатого скота в условиях неблагополучного хозяйства.

Степень разработанности проблемы.

В зарубежной и отечественной литературе встречается достаточно много информации о природе и степени распространенности вирусных и хламидийных инфекций в животноводческих хозяйствах различных регионов РФ, а так же и в странах зарубежья, которые вызывают заболевания различных систем органов у всех половозрастных групп КРС [12,15,17,23,27,42,49,52,84,88,120,128,179,180].

В связи с этим сохраняется актуальность улучшения эпизоотической ситуации в крупных животноводческих комплексах путем проведения ветеринарно-санитарных мероприятий и применения различных моно- и ассоциированных вакцин.

Для профилактики ассоциированных инфекций во многих странах, в том числе и в России, применяют различные виды импортных моно- и поливалентных вакцин: «Бови-шилд Голд», Хипрабовис-4, Хипрабовис Баланс, Respivac, Бовимун 4 и другие.

Отечественными исследователями так же был разработан большой арсенал средств специфической профилактики вирусных инфекций у КРС: «Вакцина ассоциированная против ПГ-3, ИРТ и ВД КРС эмульсионная

инактивированная» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»); «КОМБОВАК», «КОМБОВА-Р», «КОМБОВАК-К» производства ООО «Ветбиохим», «ТРИВАК» (ВИЭВ) и другие аналоги. Внедрение этих вакцин позволило значительно улучшить эпизоотическую ситуацию по вирусным заболеваниям в стране и ограничить их распространение.

Разработкой средств специфической профилактики хламидиоза у КРС в нашей стране занимались целый ряд ученых[17,34,99,100].

Так, Караваевым Ю.Д. [45] была разработана и внедрена в производство инактивированная эмульсионная вакцина против хламидиоза КРС.

Кроме этого, исследования в данном направлении проводились учеными в ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (Хамадеев Р.Х., Гаффаров Х.З., Евстифеев В.В., Хусаинов Ф.М., Равилов А.З., Равилов Р.Х, Гумеров В.Г. и др.). Ими, в конечном итоге, была разработана полиштаммовая вакцина против хламидиоза КРС, которая с успехом была внедрена в производственную практику.

В дальнейшем, по мере изучения этиологической структуры пневмоэнтеритов, на основе моновакцины против хламидиоза КРС, путем добавления антигенов вирусов ПГ-3 и ИРТ, была разработана «Ассоциированная вакцина против ПГ-3, ИРТ и хламидиоза КРС инактивированная эмульсионная», которая, так же, с успехом применялась в неблагополучных животноводческих хозяйствах РФ.

Но, к сожалению, устойчивая тенденция большинства вирусов к мутациям, а так же проникновение на территорию РФ новых штаммов патогенных вирусов, их новые сочетания, обуславливающие синнергетическое действие, динамично изменяют этиологическую структуру инфекционной патологии, что понижает эффективность имеющихся средств специфической профилактики и требует их постоянного усовершенствования с учетом сложившейся эпизоотической ситуации.

Научная новизна.

На основании клинико-эпизоотологических и лабораторных исследований установлена этиологическая структура возбудителей на современной этапе и доказана роль вируса ВД-БС, совместно с вирусами ПГ-3, ИРТ и хламидиями, в этиологии респираторно-кишечных заболеваний у крупного рогатого скота.

Изысканы оптимальные параметры для полупромышленного культивирования вирусного штамма ВК-1 (ВИЭВ) в культуре клеток MDBK с применением различных вариаций питательных сред.

Впервые научно обоснованы технологические параметры изготовления ассоциированной вакцины против респираторно-кишечных инфекций крупного рогатого скота на основе антигенов вирусов ИРТ, ПГ-3, ВД-БС и возбудителя хламидиоза.

Изучена динамика формирования иммунитета после одно- и двукратной вакцинации, установлена иммуногенная активность ассоциированной вакцины против ИРТ, ПГ-3, ВД-БС и хламидиоза КРС в лабораторных условиях.

Кроме того, результатами производственных испытаний доказана эффективность применения разработанной вакцины для профилактики заболеваемости в условиях неблагополучных по пневмоэнтеритам и заболеваний репродуктивных органов в животноводческих хозяйствах.

Методология и методы исследований. Методология проведенных исследований включает стандартные процедуры с использованием различных материалов и естественно восприимчивых животных.

В работе использовали вирусологические (вирусвыделение, культивирование, титрование вируса, экспериментальное заражение лабораторных и восприимчивых животных), серологические (иммуноферментный анализ, реакция связывания комплемента, реакция торможения гемагглютинации), физико-химические (приготовление

растворов заданной молярности, центрифугирование, эмульгирование) методы.

Практическая значимость.

Разработаны проекты нормативной документации на изготовление, контроль и применение опытных серий ассоциированной вакцины против ИРТ, ПГ-3, ВД-БС и хламидиоза крупного рогатого скота.

Разработана технология полупромышленного выращивания штамма ВК-1(ВИЭВ) вируса ВД-БС для изготовления ассоциированной вакцины против ИРТ, ПГ-3, ВД-БС и хламидиоза КРС.

Апробация работы.

Результаты исследований по теме диссертации доложены на научно-практических конференциях: «Актуальные проблемы ветеринарной медицины», посвященной 90-летию со дня рождения профессора В.А. Киршина («ФЦТРБ-ВНИВИ» 2018 г.), «Актуальные вопросы фундаментальных и прикладных исследований в области ветеринарной медицины, биологии и биотехнологии» (ТОО «КазНИВИ» 2019 г.), «Инновационное решение проблем развития АПК в РФ» («ФЦТРБ-ВНИВИ» 2019 г.)

Публикации результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 14 научных работ из них 7 рекомендованные ВАК РФ. 2 статьи – в изданиях, включенных в базы данных Scopus и Web of Science.

Основные положения, выдвигаемые на защиту:

- научное обоснование антигенной композиции при конструировании ассоциированной вакцины для профилактики вирусно-хламидийных инфекций КРС;
- результаты изучения факторов, влияющих на уровень накопления вируса ВД-БС на перевиваемых линиях культур клеток;
- изучение антигенный активности и иммуногенности экспериментальных серий ассоциированной инактивированной вакцины

против парагриппа-3, инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и хламидиоза крупного рогатого скота на кроликах и телятах.

- результаты изучения эффективности применения экспериментальных серий ассоциированной инактивированной вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и хламидиоза крупного рогатого скота в производственных условиях.

Структура и объем диссертации.

Материалы диссертации изложены на 129 страницах машинописного текста и включает: титульный лист, введение, обзор литературы, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследований, выводы и практические предложения. Список использованной литературы (всего 179 источников, из них 63 зарубежных), список иллюстрированного материала и приложения. Диссертация содержит 13 таблиц, 10 рисунков.

2 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

2.1 Краткая характеристика респираторных и желудочно-кишечных инфекций крупного рогатого скота

Основными причинами смешанных респираторных и кишечных инфекций на фоне стрессовых воздействий являются такие этиологические агенты, как вирусы инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, хламидии и др [1,2,15,27,34,48,51,115,161,140,].

Ассоциированные инфекции протекают тяжелее, длительнее, со значительной вариабельностью клинических признаков. При них чаще возникают осложнения. Такие сочетания затрудняют постановку диагноза, выбор средств лечения и профилактики. В связи с этим ветеринарные специалисты должны иметь четкое представление о смешанных вирусных и бактериальных инфекциях для квалифицированного проведения соответствующих общих и специальных мероприятий [96,97,108].

Респираторно-кишечные болезни молодняка крупного рогатого скота наносят огромный экономический ущерб животноводству всех развитых стран. По мнению многих авторов, первопричиной инфекционных пневмоний у телят в 90 % случаев являются вирусы, вызывающие инфекционный процесс в макроорганизме и формирующие оптимальные условия для жизнедеятельности в нем бактерий. В настоящее время респираторные заболевания телят получили распространение во всех странах мира с развитым скотоводством: в США, Канаде, Австралии, Новой Зеландии, Англии, Германии, Италии, Венгрии, Югославии, Болгарии, Чехии, Словакии, Франции, Израиле, Египте, странах Африки. [120,134,149,171,173,179,180]. Особенность ОРВИ КРС состоит в том, что они протекают в виде смешанных инфекций и, как правило, осложняющихся бактериальными. В таких случаях иногда проявляется синергизм – усиление патогенности одного вида микроорганизма под влиянием другого.

Секундарная инфекция имеет эндогенный характер, ее возбудители

обычно условно - патогенные инфекционные агенты, обитающие на слизистых оболочках дыхательных путей, кишечника как комменсалы. Они активизируются только при снижении резистентности организма. Особенно часто вторичная инфекция развивается на фоне болезней, вызываемых вирусами. Патогенное действие пастерелл и сальмонелл, например, осложняет течение инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи - болезни слизистых, парагриппа 3 и хламидиями крупного рогатого скота [62,135].

Характерной особенностью перечисленных вирусов является способность их вызывать клинически выраженные заболевания органов дыхания, кишечного тракта молодняка и различные формы патологий репродуктивной и нервной систем, которые в различных сочетаниях приводят к гибели животных, снижению их продуктивности, племенной ценности и недополучению приплода. Наблюдается также латентное вирусоносительство взрослыми животными [27,38,39,47,51,55,62,73].

Респираторные инфекции у телят протекают в более тяжелой форме, когда в процесс вовлекаются несколько видов возбудителей. Так, например, инфекционный ринотрахеит и вирусная диарея протекают более злокачественно при совместной смешанной инфекции. Тяжесть парагриппа-3 и инфекционного ринотрахеита возрастает в присутствии пастерелл. Принято считать, что бактериальные инфекции вторичны, однако от них во многом зависит тяжесть и исход болезни. Эти инфекционные болезни охватывают от 80 до 100% телят, сопровождающие частыми рецидивами и гибелю от 20 до 30% больных животных. При этом возможный механизм патогенеза заключается в непосредственном изменении эпителиальных клеток респираторного и желудочно-кишечного трактов под воздействием вирусной инфекции и обусловленного синергическим действием бактерий [27,69,70,73].

Полиэтиологичность смешанных респираторных и желудочно-кишечных инфекций заставляет критически подойти к оценке относительного значения в патологии каждого инфекционного агента,

которая не означает, что все они участвуют в инфекционном процессе одновременно и хаотично [28,39,43,51,55,57,98].

Проблема смешанных, вторичных и ассоциативных инфекций стала особенно актуальной в условиях современного промышленного животноводства при большой концентрации животных на ограниченных площадях. В этих условиях значительно усложняется микробный пейзаж. Установлено, в частности, что в возникновении вирусных респираторных болезней крупного рогатого скота могут участвовать вирусы диареи, ринотрахеита, парагриппа, адено-, рота-, коронавирусы, хламидии, микоплазмы. Зарегистрировано одновременное течение ринотрахеита и диареи у 5-10-месячных телят, доказана возможность развития смешанной инфекции, вызванной вирусами ринотрахеита и парагриппа-3 [44,47,57,69].

Другой важной проблемой респираторных болезней является их поздняя диагностика, в основном при вспышках заболеваний легких инфекционной этиологии ранняя диагностика осуществляется не более чем в 25 % случаев. В связи с этим следует заметить, что гиподиагностика не исчерпывается только клиническими аспектами проблемы, неполная ветеринарная статистика чревата сильной недооценкой экономического ущерба, наносимого заболеванием хозяйству [50,52,73,79,84,85].

2.2 Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота

2.2.1 Основные биологические свойства инфекционного ринотрахеита

Инфекционный ринотрахеит – *Rinotracheitis infectiosa bovum* – (ИРТ, пузырьковая сыпь, инфекционный вульвовагинит, инфекционный некротический ринотрахеит, инфекционный ринит, “красный нос”, контагиозная бронхопневмония, инфекционный катар верхних дыхательных путей) – остропротекающая контагиозная болезнь КРС, характеризуется преимущественно катарально-некротическим поражением дыхательного тракта, лихорадкой, общим угнетением и конъюнктивитом, при попадании

вируса в половые органы – появлением пустулезного вульвовагинита или баланопостита,abortами у стельных коров [12,81,90,98,119,140].

Вирион состоит из капсида диаметром 120–150 нм, окруженный липидосодержащей оболочкой. Плавучая плотность капсида составляет 1,305 г/мл. Он окружает ядро вируса из ДНК, которая намотана на белковую шпульку. В одном вирионе может быть около 33 различных структурных белков с молекулярной массой до 290000. Геном вируса состоит из двусpirальной ДНК с молекулярной массой $92\text{--}102 \times 10^6$ дальтон. Содержание гуанина и цитозина в ДНК колеблется в пределах от 33 до 74 %. Капсомеры, составляющие капсид – полые образования, пентагексагональные в поперечном сечении. Капсид содержит 162 полых капсомера.

Комитет под председательством Ройцмана в 1973 году предложил обозначить герпесвирусы крупного рогатого скота следующим образом:

- ◆ *Herpesvirus bovis* 1 – вирус инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота;
- ◆ *Herpesvirus bovis* 2 – вирус мамиллита крупного рогатого скота;
- ◆ *Herpesvirus bovis* 3 – вирус злокачественной катаральной лихорадки крупного рогатого скота; вирус африканской злокачественной катаральной лихорадки;
- ◆ *Herpesvirus bovis* 4 – герпесвирус лёгочного adenоматоза овец [99,169].

Физико-химическая характеристика вируса ИРТ КРС изучена достаточно полно. Вирус термолабилен; он инактивируется при 50–52 С в течение 30 минут. При 37°С наступает инактивация вируса в течение 10 часов. При изучении различных факторов, влияющих на термостабильность вируса, показано, что при добавлении хлористого магния, сернокислого магния, фосфорнокислого калия и хлористого калия она резко уменьшается. Растворы формалина 1:500 инактивируют вирус через 24 ч, 1:5000 – через 6ч. Ацетон, эфир, хлороформ и этиловый спирт инактивируют его немедленно. Вирус, ресуспендированный в водной среде, содержащей аминокислоты или

белок, более стабилен. Наивысшая термостабильность вируса наблюдается при pH 6,5–6,9.

Вирус устойчив к воздействию низких температур. При -70 °C он может длительно сохраняться. После хранения при 4 °C через 20 недель титр снижается на 5,5 lg, а при хранении в тот же период при -20 °C и -70 °C на 0,5 и 0,1 lg соответственно. Вирус устойчив при 4 °C в 5 % растворе глицерина.

Вирус хорошо лиофилизируется в присутствии фрагментов ткани и при этом может сохраняться годами. Вирус ИРТ чувствителен к эфиру, что связано с наличием липидов в оболочке. Он весьма устойчив к ультразвуку, а также к повторному замораживанию и оттаиванию. Имеются сообщения о выживании вируса в сперме быков, хранящейся при температуре сухого льда, в течение 4-12 мес, а в жидким азоте – в течение года.

Облучение ультрафиолетовыми и рентгеновскими лучами может разрушить вирус даже при небольших дозах воздействия [84,169].

2.2.2 Клинико-эпизоотологическая особенность инфекционного ринотрахеита

В естественных условиях к вирусу восприимчив крупный рогатый скот всех пород и возрастов. Молодые животные более восприимчивы. Болезнь у них протекает тяжелее. Молочный скот болеет легче, чем мясной. Нет особых различий в восприимчивости к болезни животных разного пола. Заболевание может возникнуть в любое время года, независимо от климатических условий, чаще оно регистрируется осенью, зимой и весной [15,84,97].

Впервые инфекция бычьего ринотрахеита была описана в 1950 году в Колорадо и Калифорнии. Экспорт крупного рогатого скота и семени из США почти на все континенты впоследствии распространил новую респираторную болезнь по всему миру [170] в нашей стране заболевание выявили в 1968 году [72].

Герпесвирусная инфекция типа I КРС регистрируется во всех странах мира. Распространенность герпесвирусной инфекции в популяции КРС в той

или иной степени выявлена в большинстве стран Европы: во Франции, Испании, Великобритании, Германии, Италии, Бельгии, Нидерландах. В Бразилии методом ПЦР установлено, что 82,8 % КРС являются положительными в отношении герпесвируса типа 1, 93,1 % - в отношении герпесвируса типа 5 и 75,9 % популяции КРС латентно инфицированы обоими типами герпесвируса [80,115,121].

Вирус передаётся аэрозольно, с носовыми выделениями, контактно, со спермой. При половом акте, инфекция, как правило, передаётся от быка к корове. Такой путь передачи не исключается и при искусственном осеменении, потому что даже при соблюдении всех мер предосторожности вирус передается со спермой. При получении семени, быки зачастую заражаются через чучело [72,89,115,137,138,139,163].

Вирус, проникающий в незащищенное стадо, может вызвать острое заболевание животных с максимальным охватом поголовья крупного рогатого скота. Пик выделения возбудителя в окружающую среду приходится на первые 4–6 месяцев после заражения [72,81].

В зависимости от способа передачи возбудителя и локализации патологического процесса, различают респираторную, конъюнктивальную, нервную, генитальную, abortивную, кожную, стомальную, энтеральную формы болезни, а также могут иметь место артриты. Наиболее часто встречаются респираторная, генитальная и abortивная формы, которые наносят значительный ущерб животноводству[110,118,161].

Респираторная форма болезни проявляется в виде ринотрахеита, у телят

возможна пневмония. Инкубационный период длится в среднем 2-4 дня. Первыми симптомами заболевания являются обильные серозные истечения из носа и повышение температуры тела до 41,0-42,0 °C, сопровождающееся гиперемией слизистых оболочек носа, носоглотки и трахеи, общим угнетением животного, сухим болезненным кашлем, обильными серозно-слизистыми истечениями из носа и пенистым

слюноотделением. По мере развития заболевания слизь приобретает густую консистенцию, в дыхательных путях образуются слизистые пробки и очаги некроза, истечения из носа переходят в фибринозные, а затем – в фибринозно-гнойные, гиперемия распространяется на носовое зеркальце – «красный нос». При тяжелом течении болезни отмечается асфиксия, которая может привести к летальному исходу [83,86,100].

Кроме того, у телят раннего возраста герпесвирус типа I (вирус ИРТ) вызывает остропротекающую болезнь с поражением желудочно-кишечного тракта, которую клинически трудно дифференцировать от диспепсии и энтеротоксемии. Имеются сообщения о развитии у молодых телят при этой инфекции мультисистемного синдрома [115,130].

Bartha A. соавт. (1974) наблюдали генерализованную лихорадочную форму ринотрахеита у телят 1-6 мес. возраста, характеризующуюся высокой температурой, кашлем, потерей аппетита, истечением из носа и рта с развитием у некоторых животных тяжелой пневмонии [142].

Генитальная форма болезни проявляется в виде инфекционного пустулезного вульвовагинита (пузырьковая сыпь) у коров и телок и инфекционного баланопостита у быков. Спустя 2-4 дня после случки или осеменения инфицированной спермой у коров отмечается повышение температуры тела, гиперемия и отек слизистой оболочки влагалища и вульвы, на которой позднее образуются мелкие пустулы, которые очень быстро увеличиваются в размерах и лопаются, образуя язвы и эрозии, что приводит к накоплению бактериальной микрофлоры. В этот период у животных наблюдаются гнойные истечения из наружных половых органов. Вследствие болевых ощущений животные постоянно беспокойно машут хвостом. Температура тела достигает максимума 40,5-41,5 °С на 4-6 день. Процесс заживления начинается сразу после прекращения разрушения клеток, вызванного размножением вируса. Эпителий полностью восстанавливается через 14 дней при отсутствии бактериальных осложнений. Однако после заживления язвенных поражений на слизистой оболочке

длительное время остаются гиперемированные узелки, представляющие собой лимфатические фолликулы. У некоторых животных наблюдаются учащение дефекации и выраженные позывы, обусловленные проникновением воспалительных процессов в каудальные отрезки кишечника [].

Иногда у коров развиваются эндометриты, что также может стать причиной бесплодия [81,84,140].

У коров, пораженных вирусом ИРТ КРС, наблюдаются abortionы, обычно в последнем триместре стельности; признаков подготовленности организма к отелу при этом не наблюдается. Каких-либо клинических симптомов, предвещающих abortion, так же не отмечают. Однако, у abortировавших коров, как правило, случается переболевание какой-либо формой ИРТ/ИПВ за несколько недель до abortionа [89,100]. Abortionы также могут быть следствием применения живых вакцин против ИРТ в период стельности, и имеют место обычно на 21-105 день после вакцинации [89,146,154]. По сообщению ряда исследователей, вирус ИРТ/ИПВ может быть причиной остро протекающих mastитов у коров. При этом отмечается воспаление вымени, сопровождающееся увеличением его в объеме и болезненностью при palpации, а также значительным снижением надоев [12,81,154,156].

2.2.3 Диагностика инфекционного ринотрахеита

Диагноз на герпесвирусную инфекцию устанавливают на основании эпизоотологических, клинических, патологоанатомических данных и результатов лабораторных исследований с использованием вирусологических методов.

Лабораторные исследования по диагностике герпесвирусной инфекции включают: а) выделение вируса из патологического материала в культуре клеток и его идентификацию в РН, РДП, а также методом электронной микроскопии; б) обнаружение антигенов вируса ИРТ в патологическом материале с помощью РИФ, ИФА, РИА, ПЦР и ДНК-зонда; в) обнаружение специфических антител к вирусу в сыворотке крови больных и переболевших

животных (ретроспективная диагностика) в РН, РНГА, РИА и ИФА [47,89,100].

В качестве патологического материала от больных животных берут смывы со слизистых оболочек носовой полости, глаз, влагалища, препутия, а также сперму. От вынужденно убитых и павших животных берут кусочки носовой перегородки, трахеи, гортани, легких, селезенки, средостенные лимфоузлы, от абортированных плодов – кусочки паренхиматозных органов и плаценты.[89,96].

Для выделения вируса используют первичные культуры клеток почки эмбрионов коров (ПЭК), бычих testicул (БТ) и легких или их субкультуры.

Также можно использовать перевиваемые линии клеток: МДВК, ЛЭК, ТР, ПТ-80[100,140,153].

2.3 Парагрипп-3 крупного рогатого скота

2.3.1 Основные биологические парагриппа-3

Парагрипп-3 (ПГ-3) КРС (транспортная лихорадка КРС, параифлэнца-3) – острая протекающая контагиозная вирусная болезнь преимущественно молодняка до 6-ти месячного возраста, характеризующая воспалением носовых ходов придаточных полостей носа, глотки, бронхов, а при осложнении бактериальной инфекцией – острой фибринозной бронхопневмонией [25,48].

Впервые ее писали в США в 1932г. [99] установив при этом роль пастерелл в этиологии болезни. Представление об этиологии болезни изменилось в 1959г., когда от больных телят был изолирован вирус Рейзингером и др. в штате Мириленд (США), сходный по АГ-структуре с вирусом ПГ-3 человека. В СССР вирус парагриппа-3 был выделен 1968г. Зотовым А.П. и др. В настоящее время болезнь зарегистрирована во всех странах мира, где развито промышленное животноводство [25,48,84].

Вирус парагриппа -3 РНК- содержащий вирус сходен с таковым вирусом болезни Ньюкасла. О существовании пяти структурных белков было известно заранее – фосфопротеин (Р,мол.м. 83 кД), ГА-найраминидазный

гликопротеин (HN, мол.м.69 кД), главный нуклеокапсидный протеин (NP, мол.м.66 кД), гликопротеин (F, мол.м. 55 кД), матричный белок (M, мол.м. 38 кД). Шестой белок L (мол.м. 180 кД) является, очевидно, полимеразой. Клеточный активный белок A (мол.м. 43 кД), ассоциированный со многими оболоченными вирусами, обнаружен как седьмой белок [25,99,148]

Вирус парагриппа -3 не обладает высокой устойчивостью во внешней среде. Он быстро разрушается под действием высокой температуры и УФ-излучения. При 37°C титр вируса в течение 2-4 суток снижается на 1-3,5 lg ТЦД; прогревание при 56°C в течение 30 мин и выдерживании при pH 3,0 приводит его к полной инактивации. Вирус инактивируется при 60°C в течение 30 мин, при 50°C – за 120 мин, при обработке 0,5%-ным раствором формалина и 1%-ным раствором додецилсульфата натрия и 1M раствора MgCl₂ снижается как инфекционную, так и ГА-активности. Обработка 0,4%ным этиленимином в течение 20ч не действует на ГА-активность, но уничтожает инфекционность вируса. На вирус губительно действуют низкие значения pH: при 6,8-7,5 он хорошо сохраняется, но при pH 3,4 быстро инактивируется [25,36,99,].

Антигенная структура вируса ПГ-3 обладает выраженной антигенной активностью и имеет 2 типа АГ, различающихся по свойствам и специфичности: рибонуклеопротеидный, или S-АГ, и поверхностный V-АГ. 1-й обнаруживается в РСК, 2-й – в РСК и РТГА.

АГ-вариабельность штаммов вируса ПГ-3 не установлено. Все штаммы в разных странах от телят и взрослых животных по АГ-структуре идентичны и соответствуют прототипному шт. SF-4, выделенному в США. Установлены различия в вариантах вируса ПГ-3 по ГА-, нейраминидазной и синцитий-образующей активности. Вирусы ПГ-3 КРС и человека АГ-сходны между собой. У обоих вирусов обнаружена значительная консервативность и гомология в аминокислотной последовательности NP-, P-, С- и M-белков (34a) ПГ-3 КРС отличается от вируса ПГ-3 человека по белку HN (41a).

Однако белок F ПГ-3 КРС имеет 80,44% и 22% гомологии с аналогичными белками ПГ-3 человека, вирусов Сендей и НБ.

Вирус ПГ-3 хорошо размножается в первичных культурах клеток ПТ, ПЭК, легких и тестикул теленка; наиболее чувствительны клетки почки, легкого и тонкого кишечника, менее чувствительны клетки лимфоузлов, тестикул, тимуса и печени [46,99]. Размножение в диплоидных перевиваемых клетках: HeLa, Нер-2, KB, MDBK, ВНК-21, Vero, АИ-ВЕК. Однако зараженные куриные эмбрионы вирусом ПГ-3 не погибают, поэтому при первичном выделении вируса можно использовать КЭ, но для доказательства наличия его в экстраэмбриональной жидкости ее испытывают на патогенность в культуре клеток почки теленка (ПЭК).

Размножение вируса в культуре клеток сопровождается цитопатическим действием, характер которого варьирует в зависимости от вида клеток и множественности заражения [46,78].

2.3.2 Клинико-эпизоотологическая особенность парагриппа-3

Источник инфекции - больные телята, которые в острой стадии болезни выделяют вирус в количестве $10^6\text{-}10^{7.5}$ ТЦД_{50/мл}. Заражение телят происходит воздушно-капельным путем и, возможно, перорально, так как установлено выделение вируса с молоком, фекалиями и вагинальными истечениями. Не исключительно передача возбудителя и половым путем [48,56].

В естественных условиях вирус ПГ-3 вызывает заболевание у КРС, поражая 90-100% животных и обуславливая в 20-25% случаев вспышки респираторных болезней. Парагриппом болеют телята не старше года [28, 29,96].

Вирус ПГ-3 относится к возбудителям, которые оказывают прямое воздействие на респираторный тракт. При попадании в носовую полость или другие участки дыхательной системы вирионы внедряются в эпителиальные клетки, где они быстро размножаются. Затем большое число их выделяется на поверхность слизистых оболочек, поступает в слизь, тем самым разрушая защитный барьер-слизистую оболочку, что создает благоприятные условия

для секундарной микрофлоры. Движение слизи и воздуха способствует распространению вирусных частиц по всей дыхательной системы с последующим заражением других эпителиальных клеток [29,168].

Диапазон проявления болезни разнообразен: от легких ринитов и бронхитов до тяжелой бронхопневмонии. Течение болезни обуславливается многими факторами: способом заражения животных, их иммунным и физиологическим состоянием, вирулентностью штамма. Ввиду того, что симптомы ПГ-3 сходны с клиническими проявлениями ВД-БС, ИРТ, адено-вирусной инфекции и хламидиозов. Инкубационный период болезни длится 24-30 ч. Клинические признаки проявляются через 24-36 ч. после введения вируса. Первые симптомы – повышенная температура тела и серозные истечения из носа. Максимальная температура повышается на 3-5й день до 40,9-41,5°C, нормализуется на 7-10-й день. У животных выражены угнетение, одышка, кашель, серозно-слизистые истечения из носа, которые переходят в гнойные, дыхание поверхностное и частое, хрипы продолжаются до 12-14-го дня. Животное отказывается от корма. Если нет осложнений секундарной бактериальной микрофлорой, через 2-3 недели наступает выздоровление животного [25,75,114]. У телят при подостром и хроническом течении отмечают слизисто-гнойные выделения из носа и глаз, признаки пневмонии и плеврита, иногда энтериты. На исход болезни влияют вирулентность циркулирующего штамма вируса и факторы, осложняющее течение болезни. Тяжелое течение болезни, приводящее животное к гибели, результат одновременного инфицирования вирусом ПГ-3 и пастереллами, а также воздействием стресс-факторов, в тоже время каждый фактор в отдельности не приводит к столь тяжелому течению болезни [24,48,56,78].

У взрослых животных болезнь, как правило, не сопровождается симптомами респираторного заболевания. У стельных коров инфекция может привести к внутриутробному заражению плода, abortionам или рождению нежизнеспособных телят [28,29,56].

Патологические изменения в основном, наблюдается в органах дыхания: катаральное воспаление слизистой оболочки верхних дыхательных путей; в течение 7-9 дней (в острый период) слизистая отечна, гиперемирована. В полостях носа и околоносовых пазух слизисто-гнойный, в просветах трахеи и бронхов серозно-гнойный экссудат. В брюшной и грудной полостях скапливается серозный экссудат. Отмечается бронхопневмония. Средостенные лимфоузлы отечны и пронизаны кровоизлияниями. Обильные точечные и пятнистые кровоизлияния находятся в тимусе, плевре, брюшине, эпикарде. На слизистой оболочке съчуга, кроме кровоизлияний, наблюдается так же эрозии и язвы. Слизистая оболочка кишечника отекшая и с кровоизлияниями [61,69,70].

2.3.3 Диагностика парагриппа-3

Включает: а) обнаружение АГ в патологическом материале (мазках, отпечатках, срезах), полученных от больных животных в РИФ; б) выделение возбудителя из патологического материала в культуре клеток почки эмбриона коровы (ПЭК) или легких эмбриона коровы (ЛЭК) и его идентификацию в РТГА, РИФ и др; в) выявление АТ в сыворотке крови больных и переболевших животных (ретроспективная диагностика) в РТГА [96,98].

Вирус ПГ-3 выделяют в первичных субкультурах клеток ПЭК, ЛЭК, ПТ, ТБ и др., которые готовят по общепринятой методике. Для парагриппозных вирусов характерным является диффузный характер РГА, которая проявляется раньше чем ЦПД вируса. Метод выделения вируса ПГ-3 на эмбрионах менее чувствителен, чем заражение культур клеток и применяются сравнительно редко[47,99,129,138].

Заражение естественно-восприимчивых животных. Применяют редко вследствие дороговизны и большой трудности в подборе телят, восприимчивых к ПГ-3, не имеющих специфических АТ. От экспериментально зараженных телят вирус удается выделить из экссудата носовой полости во время подъема температуры или из крови на 4-6 день

после интраназального и на 2-й день после внутривенного заражения. С носовым истечением вирус обычно выделяется со 2-го по 10-й день.

Серодиагностика и ретроспективная диагностика. При серологической диагностике ПГ-3 КРС исследуют парные сыворотки телят взрослых животных для выявления прироста АТ. Интервал между взятием проб 2-3 недели [137,146].

РГА, РН, РЗГАд дают в целом идентичные результаты при исследовании АТ в период развития болезни и реконвалесценции. Однако РТГА обладает высокой чувствительностью и значительной информационной способностью в связи с простой ее исполнения [99,147,148]

Максимальный срок обнаружения АТ в сыворотках крови телят после инфицирования вирусом ПГ-3 точно не установлено. Ряд исследователей полагают, что АТ сохраняются течение 4-6 мес. Уровень образования ВНА и анти-ГА достигал пика 1:320 и выше к 14-21 дню после заражения. ELISA широко используется за рубежом для индикации и титрования АТ. Он в 4-64 раза чувствительней, чем РТГА.

При постановке диагноза на ПГ-3 необходимо исключить ИРТ, ВД-БС, адено- и РС-инфекции, имеющие очень сходные эпизоотические, клинические и патологоанатомические данные. Поэтому материал, поступивший с подозрением на ПГ-3, в лаборатории исследуют параллельно на все вышеуказанные инфекции [137,138].

2.4 Вирусная диарея - болезнь слизистых оболочек крупного рогатого скота

2.4.1 Основные биологические свойства вирусной диареи - болезни слизистых оболочек

Вирусная диарея – болезнь слизистых оболочек (ВД-БС) – инфекционная контагиозная болезнь КРС, преимущественно молодых животных, характеризующаяся эрозивно-язвенным воспалением слизистых оболочек пищеварительного тракта, ринитом, увеличением лимфоузлов, высокой лихорадкой, общим угнетением, лейкопенией, постоянной или

перемежающейся диареей, эрозивным и язвенным стоматитом с обильным слюноотделением, появлением слизисто-гнойных истечений износовой полости. При инфицировании стельных коров возможны abortionы [16,20,37]

Представителями рода *Pestivirus* являются: вирус вирусной диареи – болезнь слизистых оболочек КРС (Bovine viral diarrhea virus 1 и 2 (BVDV)), вирус пограничной болезни овец (Border disease virus (BDV)) и вирус классической чумы свиней (Classical swine fever virus (CSFV)) [17,99,132].

Величина вириона колеблется от 30 до 50 нм, Геном вируса представлен однонитевой РНК, состоящей по крайне мере из трех сегментов [17,127,128,162,].

Вирус диареи чувствителен к эфиру, хлороформу, трипсину и дезоксихолату. Быстро инактивируется при pH 3,0. При изменении pH среды от 5,7 до 9,3 инфекционность его снижается, наиболее устойчив при pH 7,4. Переносит температуру 4°C, годами сохраняет активность при температуре минус 20°C. При действии температуры 37°C погибает через 5 дней. Прогревание (56°) в течение 15 мин снижает его активность в 10 раз, однако для полной инактивации его при этой температуре требуется 1 час.

В природе существуют 2 генетические группы или генотипа вируса ВД-БС антигенно различающихся между собой: BVDV-1 и BVDV-2. В каждой генетической группе встречаются как цитопатогенные (ЦП), так и не цитопатогенные (НЦП) штаммы вируса по способности вызывать видимые микроскопические изменения в клетках хозяина. [117,132,152].

Перsistентная форма ВД-БС возникает при заражении плода только нецитопатогенным биотипом вируса в период с 90-го по 125-й день внутриутробного развития, когда его иммунная система не сформирована. Вирус не распознается как чужеродный и получает доступ практически ко всем органам и тканям плода, включая лимфоидные, где интенсивно размножается. В данном случае животные становятся толерантными к нему и не вырабатывают специфические антитела. У них регистрируют перsistентную вирусемию, сопровождающуюся лейкопенией [99,117,124].

Цитопатогенный биотип вызывает у крупного рогатого скота выраженный симптомокомплекс болезни слизистых: повышение температуры тела, депрессию, гиперемию и изъязвление на слизистых пищеварительного и реже респираторного тракта, диарею, иногда с высокой смертностью, а также наблюдают поражение конечностей в области венчика [34].

Телята, рожденные персистентно инфицированными, могут казаться нормальными, но часто отстают в росте, бывают слабыми и более чувствительными ко многим респираторным инфекциям. Доказано, что вирус ВД значительно усиливает течение болезней, вызываемых вирусом ПГ-3, герпесвирусом типа I, РС-вирусом и *Pasteurella (Mannheimia) haemolytica* [17,37,155]

По мнению ряда авторов, оба биотипа, относящиеся к 1 и 2 генотипам, инфицируют КРС и вызывают болезнь, но наибольшее эпизоотологическое значение имеет нецитопатогенный биотип вируса, способный преодолевать транс-плацентарный барьер и вызывать персистентную форму инфекции [17,37,61,133,154,155].

2.4.2 Клинико-эпизоотологическая особенность вирусной диареи - болезни слизистых оболочек

Основным источником возбудителя являются больные животные и персистентно инфицированные, а также клинически здоровые животные, выделяющие вирус во внешнюю среду с калом, мочой, слюной, носовыми и глазными экскретами, со спермой [17,37,34].

Восприимчивы животные всех возрастов, но чаще болеют животные в возрасте 8-24 месяцев. Уровень материнских антител у телят исчезает к 3-8 месяцам, и они могут быть инфицированы. Заболевание телят может осложняться вторичными респираторными и кишечными инфекциями. Вирус патогенен для овец, коз и диких жвачных. Болезнь поражает от 10 до 100% животных в стаде. Летальность составляет 10-90%. [34].

У взрослого поголовья крупного рогатого скота инфекция может протекать субклинически. Несмотря на то, что инфицирование чувствительно взрослых коров обычно имеет небольшие последствия, передача вируса плодам происходит с высокой частотой. Результат такого заражения зависит от возраста (иммунологической зрелости плода) и от штамма вируса. В большинстве случаев инфицирование плодов происходит в первые 40 дней беременности и сопровождается гибелью эмбриона, его рассасыванием, мумификацией плода или абортом. Заражение коров при осеменении может вызывать раннюю гибель эмбрионов. Телята, инфицированные трансплацентарно, остаются инфицированными на всю жизнь. Они выделяют вирус, оставаясь серонегативными [34,73,99,171].

Вирус ВД-БС вызывает различные клинические формы болезни: инфекция репродуктивного тракта, приводящую к врожденным уродствам или abortam, или появлению персистентно инфицированных животных-носителей; инфекцию желудочно-кишечного и респираторного тракта; болезни слизистых и острые инфекции с иммуносупрессией [37,99,124].

Различают острое, подострое, хроническое и латентное течение болезни.

При остром течении симптомы появляются внезапно и выражаются лихорадкой (39,5-42,4 °C) в течение 12-60 ч, тахикардией, учащенным дыханием и потерей аппетита, проявление множество эрозии и язв на слизистых оболочках ротовой полости и почти всего пищеварительного тракта. В тяжелых случаях вся лицевая часть больного животного покрывается толстым слоем липких выделений, засыхающих виде корочек, под которым в дальнейшем образуются эрозии. Катаральный конъюнктивит и сильное слезотечение иногда сопровождаются помутнением роговицы. На 7-9 й день появляется диарея и продолжается 1-4 недели. Испражнения водянистые, темные, содержат пузырьки зловонных газов, а часто слизь и сгустки крови [17,155].

Подострое течение характеризуется внезапностью, подъемом температуры тела на 1-2 °С, учащенным сердцебиением и дыханием, снижением или полным отсутствием аппетита. У некоторых больных животных поражаются слизистые оболочки ротовой полости, появляются истечения из носа, кашель и кратковременная диарея. Иногда болезнь сопровождается гиперемией, цианозом слизистых оболочек и атонией преджелудков [34,38,99].

Хроническое течение вирусная диарея чаще принимает после острой вспышки болезни. Характеризуется длительная диарея и кахексия. Часто инфекция протекает субклинически (стертая форма), иногда сопровождаетсяAbortами, поносами и появлением слабого потомства [124].

При латентном течении, болезнь протекает бессимптомно, и переболевшие определяют по наличию специфических антител. Антитела часто находят у клинически здорового крупного рогатого скота неблагополучных хозяйств [15,16].

Вирус легко преодолевает плацентарный барьер и вызывает развитие обширных патологических изменений, приводящий к морфологическим и функциональным нарушениям [38,124,158].

2.4.3 Диагностика вирусной диареи - болезни слизистых оболочек

Лабораторная диагностика ВД-БС основывается на использовании различных методов: выделение вируса в культуре клеток с последующей идентификацией (РН, ИФА), обнаружение вирионов электронной микроскопией [128]. Наиболее широко используют методы выявления специфических антител (РН, ИФА) в сыворотке крови и молоке [23,67]. Как указывает Сергеев О.В. (2009) [89], без периодического серологического контроля существует вероятность не заметить наличие субклинической инфекции и не предотвратить дальнейшего распространения болезни.

Относительно новым и перспективным направлением в ветеринарной вирусологии является применение полимеразной цепной реакцией (ПЦР). Методы, основанные на ПЦР, превосходят на несколько порядков

иммунологические тесты по чувствительности и специфичности. Применение ПЦР позволяет получить однозначный результат в течение нескольких часов, что становится важным при остром течении заболевания, когда оно может за 2-3 дня привести к летальному исходу.

Одной из главных проблем серологической диагностики является недостаточная стандартизация методики и антигенная вариабельность вируса [20,21,128,165]

При дифференциации вирусной диареи необходимо исключить чуму крупного рогатого скота, инфекционный ринотрахеит, злокачественную катаральную горячку, паратуберкулезный энтерит. Кроме перечисленных болезней, сходные симптомы наблюдаются при эфемерной лихорадке, ящуре, транспортной лихорадке (парагрипп-3), алиментарные отравления [99].

2.5 Хламидийная инфекция крупного рогатого скота

2.5.1 Основные биологические свойства хламидий

Хламидии – облигатные внутриклеточные паразиты с уникальным циклом, в котором они используют энергетический цикл клетки-хозяина, поэтому их называют энергетическими паразитами [2,13,31,62,104,150].

Инфекционная болезнь, протекающая чаще хронически и характеризующаяся поражением околоплодных оболочек, в результате чего наступают abortiones, преждевременное рождение мертвых или нежизнеспособных телят [62,103].

Хламидии представлены двумя отличающимися формами и имеющие общий групповой антиген [122]. Формы эти являются стадиями развития возбудителя и обозначаются как элементарные и инициальные (ретикулярные) тельца [32,103]

Элементарные и ретикулярные тельца имеют сферическую форму диаметром соответственно 200-400 и 500-1000 нм. Снаружи они ограничены двумя трехслойными мембранами (толщина каждой равна 8 нм). Клеточная стенка ответственная за ригидность телец, сохранение формы сферы внутри

и вне клеток хозяина. В центре элементарных телец находится плотный непрозрачный нуклеотид и менее плотная структура по периферии. Остальная часть телец состоит из плотного вещества, в котором содержаться рибосомы [13,27,57,105].

Вышеуказанные формы хламидий прекрасно адаптированы к условиям существования как внутри, так и вне клетки. Совокупность двух фаз внутриклеточного развития и внеклеточного существования составляет жизненный цикл хламидий [27,37,58].

Одним из биологических свойств хламидий является их токсичность, которой обладают некоторые штаммы возбудителя. Хламидии имеют эндотоксин, прочно связанный со стенкой инфекционных частиц. Патогенность и летальность хламидий определяется сочетанным действием токсина и прямым повреждением клеток хозяина элементарными тельцами [27,179]. Установлено, что ретикулярные тельца не обладают токсичностью, т.е токсичность и инфекционность проявляется почти одновременно – с появлением элементарных телец [159,173].

Возбудитель очень чувствителен к нагреванию. Даже такая невысокая температура как 43⁰C в течение суток на 100% снижает его инфекционность. Температура 55⁰C убивает хламидии за 45 минут, 60⁰C – за 30 минут, а при 75⁰C возбудитель погибает не менее чем через 1 минуту [90,106,109.159]. Низкие температуры, оказывают на хламидии консервирующее действие, при температуре минус 20-40⁰C возбудитель сохраняется в патматериале до года, но титр снижается в 2-3 раза

Возбудитель инактивируется эфиром, хлором, йодом. Внеклеточные формы хламидий высокочувствительны к 70%-ному спирту, 0,5%-ному раствору нитрата серебра и 0,5 %-ному раствору перманганата калия. Губителен для хламидий контакт с 0,1% раствором формальдегида; 0,5%-ным раствором фенола и метафора [58,90,103].

Чувствительность к различным антибиотикам неодинакова. Одни из них обладают по отношению к возбудителю бактерицидным, другие –

бактериостатическими действием. Это такие антибиотики, как стрептомицин, ристоцетин, ванкомицин, виоцин, канамицин, колистин, мокостатин, полимиксин, биоцин и новобиоцин [61,64,68]

2.5.2 Клинико-эпизоотологическая особенность хламидий.

Хламидийная инфекция является классическим антропозоонозом, представляющим постоянную угрозу для человека и животных вследствие полифагизма и выраженного пластицизма ее возбудителя. В связи с этим хламидиоз следует рассматривать как типичную природно-очаговую инфекцию.

Хламидиозом болеют животные всех возрастов независимо от породы и пола. На интенсивность проявления эпизоотического процесса влияет ряд факторов, в том числе условия кормления и содержание животных, а на течение болезни – вирулентность возбудителя, возраст, пол животного [2,7,13,27,58,101,173,180].

Источником инфекции являются больные животные и хламидоносители, которые выделяют возбудителя во внешнюю среду с abortированными плодами и их оболочками, истечениями из половых путей, с молоком, фекалиями и спермой [31,62]. При хламидиозах возможны разные пути выделения возбудителя из организма больного и пути заражения – алиментарный, аэрогенный, лактогенный, плацентарный, контактный, через конъюнктиву [87,106].

При хламидийной инфекции ярко выражен полиморфизм клинических признаков, что, в свою очередь, значительно осложняет диагностику данного заболевания. Из-за малочисленных симптомов и латентного протекания инфекции заболевание нередко приобретает хронический характер, что приводит к развитию разнообразных осложнений. Инкубационный период от нескольких часов до 3-4 месяцев [62,66].

У крупного рогатого скота хламидиоз характеризуется широким спектром клинических проявлений, которые зависят от возраста, пола,

физиологического и иммунного состояния организма, а также от вирулентности и полученной дозы хламидии [62,104,105].

У коров наиболее часто встречается abortивная форма. Основным клиническим признаком являются аборты, которые обычно наступают на 7-9-м месяце беременности, но возможны и на 4-м месяце, кроме того развивается хроническое бесплодие, выкидыши, рождение мертвых, больных и латентно инфицированных телят [101,102,103].

В зависимости от пути заражения и возраста основными признаками хламидиоза у молодняка крупного рогатого скота являются гастроэнтероколит, полиартрит, бронхопневмония, кератоконъюнктивит и энцефаломиелит [2,13,64,90].

У новорожденных телят отмечают диарею, жидкие испражнения с примесью слизи и крови. Происходит обезвоживание организма, западают глаза, телята сильно угнетены, отказываются от корма [31,90].

У телят 3-10-и дневного возраста и старше проявляются полиартриты на фоне гастроэнтеритов и, как правило, являются следствием генерализованной инфекции. В патологическом процессе вовлекаются преимущественно карпальные, заплюсневые, коленные, локтевые и другие суставы, имеют припухлости различной степени. Отмечаются хромота, повышение общей и местной температуры. Больные телята быстро худеют, проявляется лихорадка, конъюнктивит и через 2-10 дней после проявления первых признаков болезни погибают [36,65].

При хламидиозном конъюнктивите телят инкубационный период продолжается 10-15 дней. В начале наблюдается слезотечение, светобоязнь, гиперемия сосудов, отек конъюнктивы век и глазного яблока. У больных телят развивается кератит, наиболее частый катаральный, реже фибринозный и гнойный. В большинстве хозяйств хламидийные инфекции глаз наблюдаются у 10-30% больных телят, энзоотии в летнее время может охватить до 90% поголовья [36,65,105,177].

Клинические признаки патологии органов дыхания особо отчетливо выявляются у телят 20-дневного возраста и старше после перевода их из профилактория в общий телятник. В начале отмечается снижение аппетита, температура тела повышается до 40⁰С, частый кашель, влажные хрипы в легких и обильное слизисто-гнойное истечение из носовой полости. Нередко болезнь осложняется вторичной аутоинфекцией, иногда протекает в ассоциации с адено-вирусами, возбудителем парагриппа -3 [64].

У быков хламидиоз характеризуется орхитами, баланопоститами, уретритами. У больных быков семенники незначительно увеличены, болезненные, малоподвижные [27,65,66,102].

Характерным признаком является изменение качества спермы (у 80% больных) В частности отмечаются снижение концентрации и подвижности спермиев, аспермия и некроспермия. Из-за низкой концентрации сперматозOIDов выбраковывают до 17% эякулятов, малой степени активности сперматозOIDов (менее 7 баллов) – 40% [58,66,87,102].

2.5.3. Диагностика хламидий

Широкое разнообразие клинического проявления хламидийной инфекции, а зачастую «стертое» или латентное течение хламидиоза, не позволяет дифференцировать его от других заболеваний по симптомам, а часто и по результатам патологоанатомического вскрытия [101].

Окончательный диагноз ставят на основании результатов лабораторных исследований, которые включают в себя несколько этапов: обнаружение хламидий в патологическом материале путем обычной микроскопии или в реакции иммунофлуоресценции; выделение возбудителя на куриных эмбрионах, лабораторных животных и выявление нарастания специфических антител в серологических реакциях (РСК, РНГА, ИФА) [104].

При исследовании под иммерсионной системой светового микроскопа мазков-отпечатков, окрашенных по методу Стемпа элементарные тельца хламидий обнаружаются в виде красно-фиолетовых точек на зеленовато-синем фоне препарата. Возбудитель находится как внутри, так и вне клеток,

располагаясь одиночно и группами. При этом ядро клеток хозяина окрашиваются в ярко-синий цвет [7].

Среди лабораторных животных белые мыши наиболее чувствительны к возбудителю хламидиоза. При изучении хламидийных инфекций сельскохозяйственных животных используют интрацеребральное, интраназальное, подкожное, внутрибрюшинное и внутривенное заражение белых мышей [7,57,60,176].

Наиболее распространенный и доступный метод выделения и культивирования хламидий это заражение развивающихся куриных эмбрионов. Все известные штаммы хламидий одинаково хорошо размножаются в эндотелиальных клетках оболочки желочных мешков 6-8 дневных куриных эмбрионов [60].

Одним из главных мест в лабораторной диагностике хламидиоза занимают методы выявления в сыворотках крови инфицированных животных специфических антител. Следует подчеркнуть, что исследования в серологических тестах сывороток крови подозрительных по заболеванию животных носят предварительный характер (имmunологический скрининг), т.е. позволяют предполагать циркуляцию в стаде возбудителя хламидиоза и являются предпосылкой для проведения дальнейших исследований по подтверждению диагноза другими методами. Ретроспективная диагностика успешно используется при постановке диагноза хронических последствий (осложнений) инфекций, вызванных хламидиями, когда другие методы лабораторной диагностики не эффективны и не позволяют выявить антигены, ДНК агенты или живые микроорганизмы [67,87,105,122].

Серологические исследования основаны на выявлении специфических антител в сыворотке крови животных. Из существующих серологических реакций в диагностике хламидиозов используются: реакция связывания комплемента (РСК) и ее вариации (РДСК, РНСК), реакция непрямой гемагглютинации (РНГА), иммуноферментный анализ (ИФА, ELISA) [104].

При дифференциальной диагностике следует иметь в виду, что хламидиозный аборт крупного рогатого скота клинически сходен с бруцеллезом, лептоспирозом, кампилобактериозом, листериозом, трихомонозом, инфекционным ринотрахеитом и вирусной диареей [104,108,109].

Хламидиозные бронхопневмонии телят дифференцируют от парагриппа -3 крупного рогатого скота, аденовирусной и респираторно-синцитиальной (РС) инфекций, стрептококкоза, вирусной диареи, инфекционного ринотрахеита и респираторного микоплазмоза.

Хламидиозную кишечную инфекцию у крупного рогатого скота следует дифференцировать от вирусной диареи, кишечной формы сальмонеллеза, колиэнтеротоксемии [2,7].

При дифференциальной диагностике хламидийных полиартритов телят следует исключить минеральную недостаточность, которая характеризуется остеомаляцией, мышечной дистрофией и обычно протекает без температурных реакций [57,87,109,122].

При дифференциальной диагностике хламидиозных конъюнктивитов следует иметь в виду клинические сходные поражения глаз, вызываемые гельминтами, риккетсиями, микоплазмами, вирусами и бактериями [56,87,122].

Приведенные клинико-эпизоотологические особенности перечисленных инфекционных заболеваний позволяют провести их дифференциацию. Окончательная дифференциальная диагностика хламидиоза животных осуществляется лабораторными методами [80,104].

2.6 Специфическая профилактика респираторно-кишечных инфекций крупного рогатого скота.

Анализ научной литературы свидетельствует о том, что большое влияние на возникновение и течение смешанных инфекций крупного рогатого скота оказывают различного рода стрессовые факторы и

неблагополучные условия содержания и кормления. Необходимо особо подчеркнуть роль микроклимата в помещениях, основу которого составляет температура, влажность, движение воздуха, повышенное содержание аммиака и пыли [7,9,12,33,32,44,61,68].

Концентрация поголовья сельскохозяйственных животных и не всегда оптимальные зоогигиенические условия их содержания могут служить предпосылкой развития инфекционного процесса. В этой связи широко распространенная вакцинация животных против инфекционных болезней имеет основное значение в системе профилактики эпизоотий [5,8,10,30,40].

ИРТ, ВД-БС, ПГ-З и хламидиоз КРС – одни из распространенных инфекционных болезней, поражающие практически все виды сельскохозяйственных животных, наносящие большой экономический ущерб хозяйствам. Вакцинопрофилактика крупного рогатого скота занимает важное место в системе противоэпизоотических мероприятий [41,44,52,85,95].

Учитывая, что смешанные инфекции имеют полиэтиологичную структуру, в настоящее время из специфических средств активной профилактики широкое применение находят как живые, так и инактивированные моно-и ассоциированные вакцины [10,32,46,52,116,121].

В нашей стране для этих целей применяют: вакцину живую лиофилизированную «Парвак» против ПГ-З крупного рогатого скота; вакцину лиофилизированную «Бивак» против ПГ-З и ИРТ крупного рогатого скота; вакцину инактивированную «Комбовак» против ПГ-З, ИРТ, ВД-БС, РС и рота-, коронавирусов; вакцину ассоциированную инактивированную эмульсионную против ПГ-З, ИРТ и хламидиоза крупного рогатого скота производства ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (г.Казань). [10,21,32,52,116,174]

Инактивированные вакцины, в силу своей безопасности и достаточно высокой иммуногенности, наиболее предпочтительны для профилактики инфекций вызывающих патологию органов воспроизведения у коров и телок, а также респираторных и кишечных инфекций у телят. Использование инактивированных вакцин играет весьма высокую и важную роль в

профилактике инфекционных болезней, возбудитель которых способны длительное время персистировать в организме животных на иммунном фоне. К числу таких опасных и широко распространенных инфекций следует отнести ИРТ, ПГ-3, ВД-БС и хламидиоз крупного рогатого скота [3,10,32,45,52,53,67,69,74,].

Таким образом, анализ отечественной и зарубежной литературы свидетельствует о том, что смешанные инфекции молодняка и взрослого поголовья крупного рогатого скота широко распространены и наносят существенный экономический ущерб скотоводству [1,50,62,71,84,86,89,93].

Полиэтиологичность данных заболеваний, вовлечение в патологический процесс различных сочетаний и ассоциации вирусных и бактериальных агентов осложняет их диагностику и резко снижает эффективность профилактических и лечебных мероприятий [39,82,93,94,110,117].

Снижение распространения смешанных респираторных инфекций и экономического ущерба может быть достигнуто путём систематического проведения комплекса профилактических мероприятий, важным звеном которых является своевременная, достоверная диагностика и высокоэффективная специфическая профилактика.

3 СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Материалы исследований

Штаммы микроорганизмов: В ходе выполнения работы были использованы следующие штаммы вирусов и хламидий:

- вакцинный штамм «ТК-А (ВИЭВ)-В-2» вируса ИРТ (ВНИИЭВ) г. Москва;
- эпизоотический штамм «КА-9» вируса ИРТ; (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ») г. Казань;
- референтный штамм «ПТК-45/86» вируса (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ») г. Казань
- эпизоотический штамм «ТМ-50» вируса ПГ-3; (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ») г. Казань
- вакцинный штамм «ВК-1» (ВИЭВ) вируса ВД-БС; (ВНИИЭВ) г. Москва;
- эпизоотический штамм «АБА-13» вируса ВД-БС; ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» г. Казань;
- производственный штамм «250» возбудителя хламидийного аборта крупного рогатого скота; (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ») г. Казань;
- эпизоотический штамм «МЗ» возбудитель хламидиоза крупного рогатого скота

Культура клеток:

- перевиваемая культура клеток почки эмбриона крови, линии MDBK;
- перевиваемая культура клеток легкие эмбриона коровы, линия ЛЭК;
- перевиваемая линия клеток почки сирийского хомяка (ВНК-21/13);
- перевиваемая культура клеток трахеи эмбриона коровы, линии TR;
- перевиваемая культура клеток почки африканской зеленой мартышки (VERO).

Куриные эмбрионы:

- 6-11-и дневные куриные эмбрионы (КЭ).

Питательные среды и растворы:

- 0,5% раствор гидролизата лактоальбумина (ГЛА) на растворе Хенкса;
- среда Игла МЭМ (рН 7,5-7,6) с глютамином (НПО «Вектор», Россия);

- синтетическая среда 199;
- питательные среды для бактериологических исследований: МПА, МПБ, МППБ, Сабуро, Китта-Тороцции;
- сбалансированный раствор Хенкса по стандартной прописи pH 7,2-7,4;
- раствор хлорида натрия pH 7,2-7,4;
- 0,1 М фосфатно-буферный раствор pH 7,2-7,4 (ФБР);
- 0,1 М фосфатно-буферный раствор с твином pH 7,2-7,4 (ФБР-т);
- 0,01М карбонатно-бикарбонатный буфер (КББ) pH 9,6

Диагностические препараты:

- «Набор для иммуноферментной диагностики вирусной диареи-болезни слизистых (ВД-БС) крупного рогатого скота», (ВИЭВ, г. Москва).
- «Набор для выявления антител к вирусу инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота иммуноферментным методом «ИРТ-СЕРОТЕСТ», (ООО«Ветбиохим», г. Москва);
- «Набор антигенов и сывороток для серологической диагностики хламидиозов сельскохозяйственных животных» (РОСС RU.ФВ01.Н00022) производства ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (г. Казань);
- «Набор для диагностики парагриппа-3 крупного рогатого скота» (ФКП «Курская биофабрика – Фирма «БИОК»)

Животные:

Для проведения экспериментов использовали лабораторных и естественно-восприимчивых животных:

- 200 белых мышей живой массой 16-20 г;
- 24 кролика живой массой 2,0-2,5 кг;
- 1571 голов крупного рогатого скота разных возрастных групп и пород;

Аппаратура:

- промышленная роллерная установка для культивирования клеток и вирусов в бутылках 130 ± 2 мл и высотой 375 ± 3 мм (типа четверть);
- одно- и многоканальные автоматические микропипетки;

- морозильная камера SANYOULTRALOW –85⁰С
- диспергатор " IKAULTRA-TURRAXT 50 basik"
- термостат с температурой нагрева 37⁰С и 56⁰С;
- ультрацентрифуга «Beckman Coulter – OptimaL-90K» (USA);
- спектрофотометры «СФ-46» и «BIO-Rad Model 680»
- центрифуга «Thermo Sorvall RC6+» (German)

3.2 Методы исследований

Клинико-эпизоотологический анализ проводили согласно «Методическим указаниям по эпизоотологическому исследованию» [6] и «Методическим указаниям по комплексной диспансеризации крупного рогатого скота» [112].

Диагностику вирусных и хламидийных инфекций крупного рогатого скота проводили с использованием серологических, вирусологических и бактериологических методов исследований.

Серологические исследования основывались на выявлении специфических антител к вирусам ВД-БС, ИРТ, ПГ-3 и к хламидиям.

Специфические антитела к вирусам ИРТ и ВД-БС определяли методом постановки ИФА с использованием «Набор для выявления антител к вирусу инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота иммуноферментным методом «ИРТ-СЕРОТЕСТ», (ООО «Ветбиохим», г. Москва) и «Набор для иммуноферментной диагностики вирусной диареи-болезни слизистых (ВД-БС) крупного рогатого скота», (ВИЭВ, г. Москва) соответственно.

Гемагглютинирующие антитела к вирусу ПГ-3 определяли в реакции торможения гемагглютинации с использованием диагностикума «Набор для диагностики парагриппа-3 крупного рогатого скота» (ФКП «Курская биофабрика – Фирма «БИОК»). За диагностический титр принимали положительную реакцию сыворотки в разведении 1:40 и выше.

Комplement связывающие антитела к группоспецифическому хламидийному антигену выявляли в реакции связывания комплемента, используя «Набор антигенов и сывороток для серологической диагностики

хламидиоза сельскохозяйственных животных» (регистр.удостовер. № ПВР-1-2.7/02109) ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ». Сыворотки с титром 1:10 и выше считали положительными.

Определение стерильности вакцины проводили в соответствии с ГОСТом 28085-2013, путем высея на МПА, МПБ, МППБ, Сабуро и Китта-Тароцци. О стерильности биопрепарата судили по отсутствию роста микроорганизмов на данных питательных средах.

Определение безвредности ассоциированной вакцины определяли путем внутрибрюшинного введения биопрепарата в дозе 0,5 см³ белым мышам. Вакцину считали безвредной, если в течение 15 дней после ее инъекции не были выявлены случаи падежа среди подопытных животных.

Определение оптимальных условий для репродукции ВД-БС в опытах по изучению чувствительности к вирусу ВД-БС различных культур клеток были использованы перевиваемые линии: почки эмбриона коровы(MDBK); почки африканской зеленой мартышки (Vero), трахеи эмбриона коровы (TR), легкие эмбриона коровы (ЛЭК) и почки сирийского хомячка (ВНК 21/13).

Заражение 2-3 суточной культуры клеток (после формирования монослоя) вакцинным штаммом «ВК-1» дозе 6,75 lgTЦД_{50/см³}проводили после смены ростовой среды на поддерживающую. Инфицированные культуры клеток инкубировали при температуре 37 ± 0,5°C до появления цитопатических изменений.

Культуры клеток, на которых происходило максимальное накопление вируса, были использованы для изготовления ассоциированной вакцины.

При оптимизации условий культивирования штамма «ВК-1» были изучены следующие параметры: возраст культуры клеток, посевная концентрация клеток, дозы заражения, состав питательной среды, смена среды в момент заражения культуры клеток, коэффициент заполнения бутылей, скорость вращения роллерных бутылей, pH среды культиви-

рования, температура культивирования, продолжительность выращивания, количество пассажей клеток и вирусов.

Инактивация вируса. Для инактивации производственной расплодки вируса ВД использовали формалин в конечных концентрациях 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,5% и 1%. Время экспозиции для вируса ВД-БС 48 часов при температуре 37°C.

Очистка и концентрация вирусного антигена. Очистку вирусных частиц от клеточного дебриза осуществляли после 3 -х кратного замораживания и оттаивания путем центрифугирования (3 тыс. об/мин - 20 минут). После этого надосадочную жидкость смешивали с ПЭГ-6000 в концентрации 7 % и оставляли на контакт в течение 14-18 ч при 37±0,5°C.

Осаждение вируса осуществляли центрифугированием при 8000 об/мин в течение 40 минут.

Оценка антигенной активности ассоциированной вакцины против ИРТ, ВД-БС, ПГ-З и хламидиоза на кроликах

В работе использовали 4 варианта ассоциированной инактивированной вакцины против ИРТ, ВД-БС, ПГ-З и хламидиоза крупного рогатого скота: 1-ый вариант – в качестве адьюванта использовали ПЭС-3+ланолин (МЛА); 2-ой вариант – ISA-50; 3-и вариант – ISA-61 и 4-й вариант – гидроокисьалюминия (ГОА).

С этой целью были подготовлены 5 групп кроликов по 4 животных в каждой. 1-ая группа – кролики, вакцинированные вакциной на основе МЛА в дозе 1,0 см³ подкожно; 2-ая группа – кролики, вакцинированные вакциной на основе ISA-50 в дозе 1,0 см³ подкожно; 3-я группа – кролики, вакцинированные вакциной на основе ISA-61 в дозе 1,0 см³ подкожно; 4-ая группа вакцинированные ГОА вакциной в дозе 2,0 см³ подкожно; 5-ая группа служила контролем, и вакцинации не подвергалась.

Повторную вакцинацию опытных кроликов проводили на 14-ый день и последних двух кроликов на 21-й день в вышеуказанных дозах.

Антигенную и иммуногенную активность вакцины оценивали по уровню антител в крови опытных животных. Антитела к вирусам ПГ-3 определяли в РТГА, ИРТ и ВД-БС – в ИФА и к хламидиям – в РСК. Взятие крови у животных для серологических исследований проводили: перед вакцинацией, через 14 дней (ревакцинация), а также через 30 и 60 дней после первого введения вакцины.

Определение оптимальной прививочной дозы ассоциированной вакцины на кроликах

Для опыта использовали 16 взрослых кроликов, массой 2,5 – 3 кг из которых были сформированы, по принципу аналогов, 3 опытные группы и 1 контрольная группа, по 4 головы в каждой: 1-ая группа – кролики, вакцинированные в дозе 0,5 см³ подкожно; 2-ая группа – кролики, вакцинированные в дозе 1,0 см³ подкожно; 3-я группа – кролики, вакцинированные в дозе 2,0 см³ подкожно; 4-ая группа – (контрольная) не вакцинированные животные.

Через 14 дней, по 2 кролика, из каждой опытной группы, ревакцинировали в тех же дозах, с целью установления целесообразности ревакцинации для стимулирования выработки специфических антител.

Взятие крови у животных для серологических исследований проводили: перед вакцинацией, через 14 дней после вакцинации (перед ревакцинацией), а также через 30 дней после первого введения вакцины.

Определение активности образования антител в сыворотке крови кроликов определяли до вакцинации, через 14 дней, 1 и 3 месяца после введения препарата в РТГА к вирусу ПГ-3, в ИФА к вирусам ИРТ, ВД-БС и в РСК к хламидиям.

Определение антигенной и иммуногенной активности ассоциированной вакцины против ИРТ, ВД-БС, ПГ-3, и хламидиоза КРС инактивированной эмульсионной в остром опыте на телятах

Изучение эффективности ассоциированной вакцины проводились на 5-ти телятах 10-ти дневного возраста. С этой целью 3 головы (опытная группа)

были привиты ассоциированной инактивированной вакциной против ИРТ, ВД-БС, ПГ-З и хламидиоза КРС двукратно с интервалом 14 дней в дозе 1,0 см³ в области средней треть шеи. Два контрольных телёнка (не вакцинированные) были подвергнуты обработке полиспецифической сывороткой против выше указанных возбудителей с интервалом 10-15 дней в дозе 0,5 см³ на 1кг массы животных. В течение 60 дней опытные и контрольные телята находились в хозяйстве (ООО «Среднее Девятое» Лайшевского р-на РТ). По истечении этого срока все животные были завезены в виварное помещение лаборатории вирусных и хламидийных инфекций ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» и подвергнуты контрольному заражению эпизоотическими штаммами возбудителей ИРТ, ВД-БС, ПГ-З и хламидиоза крупного рогатого скота.

У всех животных до заражения и в течение 20 дней после него ежедневно измеряли температуру тела, частоту пульса и дыхания. Кроме того, с целью реизоляции введенных возбудителей впервые 15 дней с момента инфицирования от животных отбирали пробы носовых и глазных истечений. В дальнейшем материалы инфицировали культуре клеток MDBK и ВНК-21/13, а также - развивающиеся куриные эмбрионы.

Взятие крови на серологические, биохимические и гематологические исследования проводили до заражения, а также на 7-ой и 21 дни после инфицирования эпизоотическими штаммами. На 22-ой день после заражения проведен контрольный убой по 1-му теленку из опытной и контрольной групп для патоморфологических исследований.

Испытания ассоциированной вакцины против ИРТ, ВД-БС, ПГ-З и хламидиоза КРС в производственных условиях

В неблагополучных по респираторно-кишечным заболеваниям хозяйствах Приволжского федерального округа проведены опыты по изучению антигенной и иммуногенной активности ассоциированной вакцины против ИРТ, ВД-БС, ПГ-З и хламидиоза крупного рогатого скота.

В заключительном опыте эффективность применения ассоциированной инактивированной вакцины оценивали по сохранности животных до и после использования препарата в неблагополучных по респираторно-кишечным и репродуктивным заболеваниям КРС в хозяйствах.

Статистическая обработка результатов.

Для статистической обработки результатов исследований использовали программу Office Microsoft Excel 2013.

3.3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.3.1 Клинико-эпизоотологическое обследование и сероиммунологический мониторинг животноводческих хозяйств

Для выяснения структуры инфекционной патологии в хозяйствах, неблагополучных по респираторным и кишечным заболеваниям телят, а также в хозяйствах, где регистрировались массовые нарушения функции воспроизводства у коров и телок, нами, согласно тематического плана научно-исследовательских работ ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (утв. Деп. Научно-технологической политики и образования МСХ РФ) в течение трех лет, с 2015 по 2017 годы включительно, проводились клинико-эпизоотологическое обследование и сероиммунологический мониторинг на основные вирусные и хламидийную инфекции.

Предварительно проведенный анализ исследований прошлых лет, выполненный сотрудниками лаборатории вирусных и хламидийных инфекций (Евстифеев В.В., Гумеров В.Г.), а также многочисленные литературные данные [1,4,7,10,15,16,21,26,29,38,45,66,80] свидетельствуют о том, что респираторно-кишечные инфекции характеризуются полиэтиологичной структурой и часто протекают как смешанные вирусно-бактерийные инфекции.

Наиболее часто, при заболеваниях молодняка КРС с признаками бронхопневмонии, гастроэнтеритов, артритов, сочетающихся с нарушением функций воспроизводства (abortы, мертво-, слаборождения), выявлялись специфические антитела к возбудителю хламидиоза, а также к вирусам ПГ-3 и герпесвирусу (ИРТ). Кроме того, есть отдельные сообщения (ГаффаровХ.З., Ефимова М.А.) о заболеваниях со схожей картиной, при которых этиологическая роль принадлежала вирусу диареи КРС (ВД-БС), адено-вирусу и реовирусу.

Опираясь на эти данные, серо-иммунологический мониторинг поголовья в обследуемых неблагополучных хозяйствах проводили в

отношении антигенов вирусов ПГ-3, ИРТ, ВД-БС, рео- и адено-вирусов, а также к хламидийному антигену.

Данные эпизоотологического обследования животноводческих хозяйств и клинический осмотр поголовья крупного рогатого скота, проведённые нами в различных регионах Российской Федерации, показали, что болезни органов дыхания и пищеварения регистрируются практически повсеместно, у разных половозрастных групп крупного рогатого скота.

Клинико-эпизоотологические исследования показали, что респираторно-кишечные вирусные инфекции чаще регистрируются в осенне-зимний и зимне-весенний периоды в комплексах по откорму КРС или племенных хозяйствах, где комплектация стада происходит за счет хозяйств-поставщиков.

Клиническая картина заболеваний у телят характеризовалась гипертермией ($40\text{--}41^{\circ}\text{C}$), угнетением общего состояния, учащением пульса и дыхания, гиперемией слизистых оболочек носовой и ротовой полости, сухим кашлем и слизисто-серозными истечениями из носа. Кроме того, у больных животных наблюдалась диарея, которая сопровождалась жидкими испражнениями темного цвета с примесью слизи и крови. В течение 3-7 дней заболевание охватывало до 75% молодняка в возрасте от нескольких дней до 4-6 месяцев. При этом, наряду с вышеописанными симптомами, у больных телят были выявлены эрозии и язвы в ротовой полости и частично на носогубном зеркальце.

При вскрытии павших и вынужденно убитых животных наблюдали эрозии и язвы в ротовой полости, цианоз слизистых оболочек носовой полости, скопление серозного экссудата в просвете трахеи, бронхов и альвеол, уплотнение верхушечных долей легких, гиперплазию заглоточных и мезентериальных лимфоузлов, а также геморрагический энтерит.

Респираторные заболевания у телят старшего возраста регистрировали через 1-3 мес. после перевода их на доращивание. При этом возникали массовые вспышки острого заболевания, которые, как правило, осложнялись

вторичной бактериальной микрофлорой и при несвоевременном этиотропном лечении обуславливали тяжелые формы гнойно-катаральной пневмонии.

При патологоанатомическом вскрытии павших и вынужденно убитых животных, как правило, выявляли гиперемию слизистых оболочек носовых ходов, гортани и трахеи; в просвете трахеи и бронхов обнаруживали скопление большого количества слизистого экссудата с примесью фибринозных плёнок, частично закрывающих просвет, а также наблюдали признаки катарального гастроэнтероколита.

При изучении клинической и патологоанатомической картины пневмо-гастроэнтеритов были выявлены случаи заболевания животных, когда на фоне респираторного синдрома наблюдали признаки поражения желудочно-кишечного тракта, суставов конечностей, органов зрения, центральной нервной системы и репродуктивных органов взрослого поголовья скота. У больных животных наблюдали гиперемию слизистых оболочек носовой полости, конъюнктивы, отек век, светобоязнь, скопление во внутреннем углу глаза серозно-гнойного экссудата, который загрязнял веки. В дальнейшем, через 2-4 недели с начала заболевания, большинство животных выздоравливало, однако у отдельных телят отмечали помутнение роговицы глаза (кератит) и они преждевременно выбраковывались.

В большинстве обследованных хозяйств у половозрелых групп крупного рогатого скота так же отмечались нарушения репродуктивных органов с дальнейшими осложнениями. Это приводило к снижению молочной продуктивности,abortам во второй половине стельности животного, задержке последа, метритам, вагинитам и бесплодию. Так же отмечалось рождение слабого и не жизнеспособного молодняка сопровождающееся энтеритами, залеживаниями, обезвоживанием и токсикозами, опухание суставов, в частности запястных суставов, повышение местной температуры, болезненность и хромота.

В хозяйствах, где регистрировались вышеописанные заболевания нами проводился серо-иммунологический мониторинг в отношении

перечисленных выше возбудителей. Всего, в течение 3-х лет, была исследована 1571 проба сывороток крови, полученных от невакцинированного против респираторно-кишечных инфекций поголовья крупного рогатого скота из 46 современных скотоводческих хозяйствах 9 областей и республик Приволжского Федерального округа и некоторых других регионов РФ. Результаты серо-иммунологического мониторинга обобщены и представлены в таблице 1.

Таблица 1. – Результаты серо-иммунологического мониторинга респираторно-кишечных заболеваний крупного рогатого скота за 2015-2017 год.

Наименование регионов РФ	Кол-во обследованных хозяйств	Исследовано проб	ПГ-3		ИРТ		ВД-БС		Хламидиоз	
			из них положительных		из них положительных		из них положительных		из них положительных	
			кол-во проб	%						
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Республика Татарстан	30	945	427	45	421	44,5	223	23,5	108	11,4
Республика Башкортостан	1	4	0	0	0	0	0	0	0	0
Республика Чувашия	2	74	64	86	54	73	46	62,1	24	32,4
Республика Марий-Эл	2	74	10	13,5	2	2,7	0	0	0	0
Нижегородская область	7	374	225	60	61	16,3	96	25,6	49	13,1
Самарская область	2	21	20	95,2	20	90	20	90	1	4,7
Вологодская область	1	54	0	0	0	0	0	0	6	11,1
Ульяновская область	1	19	17	89,4	4	21	5	26,3	14	73,6
Пермский край	1	6	0	0	6	100	5	90	0	0
Итого	46	1571	763	43,2	562	38,6	395	35,2	202	16,2

Из представленных в таблице 1 данных видно, что исследованием сывороток крови крупного рогатого скота, была установлена высокая серопозитивность животных к антигенам вирусов ПГ-3 (43,2 %), ИРТ (38,6 %), ВД-БС (35,2 %) и к хламидиям (16,2%). Положительно реагирующие животные имелись в каждом из обследованных регионов. Серопозитивность к различным вирусным и к хламидийному антигенам по регионам варьировала в довольно широких диапазонах. Так, к антигену ПГ-3 в РТГА, в зависимости от региона, выявлялось от 10 до 64% положительных проб сывороток крови. С антигеном вириуса ИРТ в ИФА диапазон позитивных проб сывороток был наиболее широким и составил от 2,7 до 90%. С антигеном ВД-БС в ИФА реагировало от 25 до 90% и к хламидийному антигену специфические антитела выявлялись от 4,7 до 73,6% случаев.

При сравнении величины титров у серопозитивных животных из неблагополучных хозяйств существенных различий не выявлено.

К антигенам рео- и адено-вириусов серопозитивность животных в обследованных нами хозяйствах была не высокой. Серопозитивные к этим вириусам животные были выявлены только в 7 из 46 обследованных хозяйств, при этом количество серопозитивных животных, в зависимости от хозяйства, к реовириусу колебалось в пределах 3-10%, а к адено-вириусу – от 6 до 15%, т.е. было незначительным, чтобы вызывать массовые заболевания молодняка КРС.

Также, важным является то, что в 43 из 46-ти (93%) обследуемых хозяйств одновременно были обнаружены антитела к ИРТ, ПГ-3, ВД-БС и к хламидийному антигену. Данный факт указывает, во-первых, на широкое распространение изучаемых вирусных и хламидийной инфекции в хозяйствах неблагополучных по респираторно-кишечным инфекциям молодняка и патологии репродуктивных органов взрослого поголовья КРС, где они, по всей видимости, являются этиологическим фактором заболевания животных. Во-вторых, одновременное обнаружение антител ко всем 4-м антигенам, указывает на полиэтиологичность заболевания.

Следует отметить, что ранее в РФ заболевание крупного рогатого скота вирусом диареи регистрировалось лишь в единичных случаях и не носило массового характера. О массовом поражении КРС вирусом диареи сообщали, в основном, зарубежные ученые, которые регистрировали эту инфекцию в странах Восточной Европы, Южной и Северной Америки [119,122,126,143]. Однако, в связи с массовым завозом импортного поголовья крупного рогатого скота из-за рубежа в 2005-2015 годы, заболевание вирусом вирусной диареи КРС стало регистрироваться в России, сначала в отдельных регионах с интенсивным ведением животноводства, а затем и повсеместно.

И если ранее, для профилактики заболеваемости молодняка в хозяйствах достаточно эффективно было использовать в составе ассоциированной вакцины только 3 антигена возбудителей – «Ассоциированная вакцина против ПГ-3, ИРТ и хламидиоза крупного рогатого скота инактивированная эмульсионная», то на сегодняшний день такой биопрепарат уже не оказывает должного профилактического эффекта из-за наличия в структуре инфекционной этиологии кроме ПГ-3, ИРТ и хламидиоза еще и возбудителя ВД-БС.

Таким образом, проведенные нами исследования явились определяющим фактором при выборе антигенного состава для создания ассоциированной вакцины против ИРТ, ПГ-3, ВД-БС и хламидиоза крупного рогатого скота.

3.3.2 Определение оптимальных условий репродукции вируса ВД-БС штамм «ВК-1» (ВИЭВ) на различных перевиваемых культурах клеток

При конструировании вакцин эффективность создаваемых препаратов определяется двумя основными взаимосвязанными факторами. Во-первых, для создания вакцин, обладающих высокими защитными свойствами необходимы штаммы вируса, способные вызывать гуморальный и клеточный ответ у макроорганизма. Во-вторых, это качество и количество антигенного материала на дозу вакцины.

Для включения в состав вирус ВД-БС ассоциированной вакцины, нами был выбран вакциненный штамм вируса вирусной диареи «ВК-1» (ВИЭВ),

выделенный в 1988 году в ВИЭВ С.А. Жидковым и Н.Н. Крюковым. Это РНК-содержащий вирус, представитель рода Pestivirus семейства Flaviviridae, относятся к 1-ой подгруппе цитопатогенных штаммов. Величина вирионов колеблется от 30 до 50 нм. Вирус диареи чувствителен к эфиру, хлороформу, трипсину и дезоксихолату. Быстро инактивируется при pH 3,0. Продуктивно репродуцируется в перевиваемых линиях культуры клеток MDBK, ЛЭК, TR и ВНК-21/13. При этом инфекционный титр составляет 6,0 lg ТЦД_{50/мл}.

3.3.2.1 Изучение чувствительности различных линий культур клеток к вирусу ВД-БС штамм «ВК-1» (ВИЭВ)

При создании вакцинных препаратов большую роль играет выбор эффективных биологических моделей с целью получения высокоактивной биомассы микроорганизмов.

Для выполнения этой задачи нами была изучена чувствительность перевиваемых линий культуры клеток MDBK, ЛЭК, ВНК-21/13, TR и Vero к штамму «ВК-1» (ВИЭВ) вируса ВД-БС.

Для этого использовали метод последовательных пассажей. Линии культур клеток заражали стандартизированной вирусодержащей суспензией, полученной от предыдущих пассажей.

Культуру клеток выращивали стационарным методом в культуральных флаконах объемом 1500 см³.

Различные культуры клеток вносили в культуральные флаконы, их маркировали и помещали в термостат при 37°C на 48 часов для культивирования монослоя. По мере роста монослоя культуры клеток предварительно проводили оценку методом световой микроскопии на отсутствие контаминации клеток и грибково-бактерийного пророста.

В качестве ростовой среды использовали сыворотку крови крупного рогатого скота.

После предварительного отмывания клеток раствором Хенкса на монослой вносили вирусную суспензию штамма «ВК-1» (ВИЭВ) с инфекционной активностью не ниже 6,75 lgТЦД_{50/см3} с контактом 1 час при

температуре 37°C. Множественность инфицирования при этом составляла 0,1lg ТЦД_{50/см³}. После контакта добавляли поддерживающую среду Игла pH 7,0-7,2 без сыворотки и глютамина до объема 200-250 см³. В качестве контроля оставляли по два культуральных флакона с незараженной культурой клеток.

Инфицированную культуру клеток контролировали 2 раза в день микроскопией в течение 5 суток.

Репродукцию вируса ВД-БС штамм «ВК-1» (ВИЭВ) в культуре клеток учитывали по появлению интенсивных специфических цитопатических проявлений в клетках монослоя. При поражении 75-80% монослоя, вирус замораживали при температуре минус 20±1°C. После оттаивания из полученной суспензии отбирали пробы для определения активности вируса ВД-БС. Определение инфекционной активности получаемой вирусной суспензии проводили методом титрования в культуре клеток. Для следующего пассажа в качестве расплодки использовали пробы с наибольшим титром инфекционной активности. Полученные данные представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Оценка чувствительности перевиваемых линий культур клеток к штамму вирусной диареи КРС «ВК-1» (ВИЭВ)

Культура клеток	Титр вируса, lg ТЦД _{50/мл} (n=3; P<0,05)				
	исходный	1 – пассаж	2 – пассаж	3 – пассаж	4 - пассаж
MDBK	6,75±0,12	6,82±0,14	7,01±0,12	7,0±0,2	6,87±0,10
ЛЭК	6,75±0,12	6,65±0,13	6,74±0,15	6,83±0,17	6,82±0,18
BHK-21/13	6,75±0,12	6,17±0,20	6,95±0,10	6,91±0,10	6,81±0,13
TR	6,75±0,12	6,2±0,20	6,1±0,17	6,05±0,21	6,34±0,16
Vero	6,75±0,12	4,27±0,10	2,12±0,16	1,16±0,11	0

Результаты исследований показали, что в культуре клеток Vero вирус ВД-БС практически не размножается в течение 3-4-х пассажей и тем самым теряет первоначальную инфекционную активность.

Вирус ВД-БС репродуцировался в культурах клеток MDBK, ЛЭК и ВНК-21/13 вызывая характерные для ВД-БС цитопатические изменения в монослое при первом пассаже и увеличивая активность к 4-му пассажу.

Так же, но с чуть незначительным уменьшением инфекционной активности, вирус размножался в культуре клеток TR. При этом его активность снижалась с каждым пассажем на 0,5-0,7 lg ТЦД_{50/мл} по сравнению с исходным титром.

Таким образом, проведенными исследованиями установлена высокая чувствительность культуры клеток MDBK, ЛЭК и ВНК-21/13 к вирусу ВД-БС: оказывая интенсивное цитопатическое действие на монослое, вирус сохранял высокую инфекционную активность в дальнейших пассажах. Однако, активность вируса на культуре клеток MDBK, была наиболее высокой, что позволило нам использовать эту культуру в качестве основной биологической модели при наработке антигенной биомассы для изготовления ассоциированной вакцины.

3.3.2.2 Определение факторов, влияющих на репродукцию вируса ВД-БС штамм «ВК-1» (ВИЭВ) в культуре клеток

Выбор эффективных биологических моделей и стабильное культивирование в них штамма «ВК-1» (ВИЭВ) ВД-БС с высокими показателями по инфекционной и антигенной активности позволили нам, в дальнейшем, приступить к разработке масштабной технологии получения вирусной биомассы. В связи с этим, нами проведены опыты, по изучению влияния некоторых факторов на уровень репродукции вируса: концентрация клеток, способы культивирования (стационар, роллер), возраст выращенной культуры клеток, условия инфицирования клеток, дозы вирусов для заражения, сроки культивирования и др.

Наиболее значимым, из всех перечисленных факторов, при получении вирусной биомассы является способ культивирования клеточных культур.

Из доступных нам способов мы выбрали два: роллерный и стационарный метод.

По данным из литературных источников приемуществами обладает роллерный метод культивирования, т.к. при этом методе время культивирования сокращается до 24-48 часов (стационарный метод культивирования требует 48-72 часов); объем вирусодержащей суспензии, получаемый из роллерного сосуда ($\approx 400 \text{ см}^3$) в 2 раза больше выхода вирусного сырья с матраца ($\approx 200 \text{ см}^3$); средний титр вируса ВД-БС КРС, получаемого при роллерном культивировании, на 0,8-1,0 lg больше аналогичного показателя при стационарном культивировании.

Для определения наиболее подходящего способа мы, в сравнительном аспекте, изучили процесс получения биомассы вируса ВД-БС двумя способами.

При стационарном культивировании культур клеток MDBK применяли стеклянные культуральные флаконы с вместимостью 1500 см^3 . Далее вносили клетки с поддерживающей средой, состоящий из среды Игла МЕМ – 90% эмбриональной сыворотки - 10% и поместили в термостат при 37°C для дальнейшего наблюдения за ростом монослоя. Клеточный монослой формировался на 3-4 сутки при посевной концентрации 110 ± 5 тыс. клеток на 1 см^3 среды.

Перед заражением сливали ростовую среду и промывали монослой раствором Хенкса. Затем вносили поддерживающую среду (Игла МЕМ – 99% и 1%-ный раствор глутамина) в количестве $200-250 \text{ см}^3$, в которую предварительно вносили вирус в дозе $0,2-0,4 \text{ lg TCD50}/\text{cm}^3$.

При роллерном культивировании MDBK в роллерных бутылях объемом 3000 м^3 вращающихся в горизонтальном положении со скоростью 8 об/мин, обеспечивая постоянное перемешивание питательной среды и интенсивный рост клеток, на комбинированной среде, состоящей из среды Игла МЕМ - 90%, эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота – 10% в объеме $400-450 \text{ см}^3$ клеточный монослой формировался на 2-3 сутки при посевной концентрации 110 ± 5 тыс. клеток на 1 см^3 среды.

Перед заражением сливали ростовую среду и промывали монослой раствором Хенкса. Затем вносили поддерживающую среду (Игла МЕМ – 99% и

1%-ный раствор глутамина) в количестве 300-350 мл, в которую предварительно вносят вирус в дозе 0,2-0,4 ТЦД_{50/клетка}, а так же антибиотики пенициллинового и стрептомицинового ряда. Бутыли инкубировали в роллерной установке при 37 °С в течение 2-4 суток при тех же режимах. Сбор культуральной жидкости производили в период выраженного цитопатического действия. Освобождение вирусов из клеток осуществляли путем трехкратного замораживания и оттаивания.

Таблица 3 – Оценка инфекционной активности вируса ВД-БС штамм ВК-1(ВИЭВ)
при стационарном и роллерном способах культивирования (n=5; P<0,05)

Штамм «ВК-1 (ВИЭВ)» вируса ВД-БС на культуре клеток MDBK					
Способ культивирования	Посевная концентрация клеток тыс./см ³	Время формирования монослоя, часы.	Доза вируса для заражения, ТЦД _{50/см³} на клетку	Время выращивания вируса, час.	Инфекционная активность вируса, lg ТЦД _{50/см³} .
Стационарный (в культуральных флаконах)	110±5	49-64	0,2	48-64	6,80±0,17
	80±5	49-64	0,3	46-60	6,62±0,11
	50±5	49-68	0,4	45-52	6,54±0,19
Роллерный	110±5	46-49	0,2	48-68	7,66±0,15
	80±5	46-50	0,3	48-52	7,82±0,12
	50±5	46-59	0,4	37-45	7,49±0,20

Результаты исследований показали, что максимальная репродукция вируса ВД-БС методом роллерного культивирования регистрируется при посевной концентрации клеток 110 тыс. кл/см³, при дозе инфицирования 0,3 ТЦД_{50/см³} и продолжительности репродукции вируса в течение 2-3 дней инфекционная активность составила $7,82 \pm 0,12$ lg ТЦД_{50/мл}.

При стационарном методе культивирования с посевной концентрации 110 тыс. кл/см³, дозе инфицирования 0,2 ТЦД_{50/см³} с продолжительностью репродукции вируса 2-3 дня, инфекционная активность составила $6,80 \pm 0,17$ lg ТЦД_{50/мл}. Что на $1,02 \pm 0,12$ lg ТЦД_{50/мл} ниже, чем при роллерном методе культивирования.

Установлено, что на репродукцию вирусов в культуре клеток существенное влияние оказывает состав питательной среды. Поэтому, перед нами была поставлена следующая задача: подобрать оптимальный состав питательных сред для культуры клеток MDBK, обеспечивающий максимальное накопление вируса, используя, при этом, не дорогие и доступные компоненты.

С этой целью нами были выбраны поддерживающие среды МЕМ, ГЛА, 199. В последующем применением их в разных процентных соотношениях с добавлением глутамина и без его добавления.

Таблица 4 – Состав питательных сред для роллерного культивирования вируса ВД-БС в перевиваемых линиях культуры клеток MDBK (n=5; P<0,05)

Вирус, штамм	Вид культуры клеток	Состав питательной среды	% соотношения сред	Время выращивания, сутки	Инфекционный титр вируса, lg ТЦД _{50/мл}
«ВК-1» (ВИЭВ)	MDBK	МЕМ без глутамина	-	3 – 4	$6,01 \pm 0,16$
		МЕМ+1% глутамин	-	3 – 4	$7,80 \pm 0,14$
		ГЛА МЕМ 199	50 40 10	3 – 3,5	$6,45 \pm 0,16$

Анализ результатов опытов показал, что штамм «ВК-1» (ВИЭВ) вируса ВД-БС интенсивно размножается в культуре клеток MDBK при использовании до 99% среды Игла МЕМ и 1% глутамина. Показатели репродукции штамма «ВК-1» (ВИЭВ) ВД-БС в культуре клеток MDBK также были высокими ($7,80 \pm 0,14$ lg ТЦД_{50/см³}). Следует отметить, что инфекционная активность вируса ВД-БС была на 0,8–1,60 lg ТЦД_{50/см³} выше, чем при применении других комбинаций питательных сред.

Присутствие антибиотиков в культуральных питательных средах, предотвращало контаминацию культуры клеток бактериями и не оказывало влияния на инфекционную активность вирусной биомассы.

Полученные нами результаты опытов свидетельствуют о том, что оптимизированные условия культивирования производственных штаммов «ВК-1» (ВИЭВ) вируса ВД-БС позволяют использовать их в качестве исходных данных при разработке эффективной полупромышленной технологии производства вирусной биомассы. Параметры роллерного культивирования на перевиваемых линиях культур клеток вируса ВД-БС представлены в таблице 5

Таблица 5 – Эффективные параметры роллерного культивирования вируса ВД-БС крупного рогатого скота на культурах клеток MDBK

№ п/п	Наименование параметров	шт. ВК-1 (ВИЭВ) вируса ВД-БС
1	Скорость вращения роллерных бутылей (об/час.)	8–10
2	Посевная концентрация клеток (тыс/см ³)	110
3	Возраст культуры клеток (сутки)	2–3
4	Доза заражения (lg ТЦД _{50/клетка})	0,3
5	pH среды культивирования	$7,2 \pm 0,2$
6	Продолжительность выращивания (час)	36 – 48
7	Температура культивирования (°C)	$37 \pm 0,5$
8	Питательная среда	Игла МЕМ с глутамином
9	Смена среды в момент заражения культуры клеток	2 – 3 х кратная промывка монослоя, контакт вируса с клеткой без среды 30 – 45 мин.

10	Коэффициент заполнения бутылей	0,17 – 0,19
11	Инфекционная активность вируса (lgТЦД _{50 / см³})	6,5 – 8,0

В результате проведенных исследований была разработана эффективная методика роллерного культивирования вирусного штамма «ВК-1» (ВИЭВ) с использованием доступных компонентов позволяющая снизить производственные затраты и получать вирусную биомассу с высокой инфекционной активностью для изготовления антигенов при конструировании инактивированных вакцин.

3.3.3 Разработка методики изготовления инактивированного антигена вируса ВД-БС штамм «ВК-1» (ВИЭВ) для конструирования ассоциированной вакцины

В процессе изготовления антигена, который может быть применен для специфической профилактики инфекции в составе ассоциированной вакцины, биомасса вируса проходит несколько качественных стадий обработки, связанных с инактивацией вируса, очисткой от клеточного дебриса и остаточных компонентов питательных сред, концентрированием и стандартизацией.

В своей работе мы опирались на общепринятые методики, используемые для получения антигенов, которые были отработаны ранее другими авторами, при получении аналогичных препаратов [32,109], а так же были использованы для получения смежных антигенов в усовершенствованном нами прототипе [25]. Однако некоторые моменты требовали адаптации и модернизации методов с учетом ранее отработанной методики культивирования вируса ВД-БС штамма «ВК-1» и конкретных производственных условий.

Для разрушения клеточных стенок и высвобождения вируса из клеток с целью получения антигена вирусную биомассу подвергали трехкратному замораживанию при -20⁰С с последующим оттаиванием при 37⁰С.

Инактивация. Для инактивации вирусов применяются различные методы: физические и химические, а также комбинированные способы, которые способны подавлять инфекционность вирусов и при этом сохранить их иммуногенные свойства. Наиболее широкое применение получили воздействие высокой температурой, формальдегидом, УФ-излучение, а также ультразвук и некоторые другие. Следует отметить, что вакцины, изготовленные с использованием термической инактивации, не нашли широкого применения из-за слабой иммуногенности.

Для инактивации вирусов в производстве вакцинных препаратов широко применяется формальдегид в различных концентрациях (0,05-0,5%), который мы тоже использовали в своей работе, как наиболее доступный и эффективный препарат.

Для определения оптимальной дозы инактиватора использовали различные его концентрации. Для этого в вирусодержащую суспензию вносили инактиватор в конечной концентрации: 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,5%, и 1%. Процесс инактивации проводили при температуре $37\pm1^{\circ}\text{C}$, время экспозиции 48 ч. Эффективность различных концентраций формалина для инактивации вируса ВД-БС определили путем заражения обработанной вирусной суспензией перевиваемой культуры клеток MDBK. При отсутствии характерного ЦПД проводили не менее трех «слепых» последовательных пассажей с использованием этой же культуры клеток.

Таблица 6 – Инактивация вируса ВД-БС КРС штамм «ВК-1» в течение 48 часов при температуре 37°C ($n=3$)

Пассаж	Концентрация формальдегида (%)				
	0,05	0,1	0,2	0,5	1
1	+	+/-	-	-	-
2	+	-	-	-	-
3	+	-	-	-	-

Примечание: «+» - наличие остаточной инфекционности вируса;

«-» - вирус инактивирован полностью;

«+/-» - частично инактивированный вирус

Данные, приведенные в таблице 6, свидетельствуют о том, что формальдегид, в конечной концентрации 0,2% и выше при экспозиции 48 ч и температуре 37°C надежно инактивирует вирус штамма «ВК-1» (ВИЭВ).

Очистка и концентрирование вирусной биомассы. В процессе репродукции вируса в клетках происходит накопление его в клеточной культуре. С целью очистки вируса от балластных веществ (остатков тканей, разрушенных клеток и т.д) применяют различные методы. Физические: термолизис, фильтрация через керамические, асbestовые и мембранные фильтры (Зейтца, Шамберлана, Бекфальда), центрифугирование в градиенте плотности сахарозы (20-60%) и дифференциальное центрифугирование. Зачастую они связаны с технологическими трудностями и не позволяют получать большие объемы концентрированного вирусного антигена.

Химические методы, к которым относятся осаждение метанолом, изоэлектрической точкой, осаждение солями и полиэтиленгликолем, метод Ильенко с использованием хлороформа и эфира и др, наиболее просты и технологичны. Поэтому из доступных методов нами был выбран метод концентрации солями и ПЭГом, с предварительной очисткой центрифугированием.

Для этого, трижды размороженную вирусодержащую суспензию очищали от клеток путем центрифугирования при 3000 об/мин. в течение 20 минут. В дальнейшем надосадочную жидкость обрабатывали ПЭГ-6000 в концентрации 7% по сухому веществу и оставляли на контакт 14-18 ч при +4...8°C.

Осаждение вирусных частиц проводили центрифугированием при 8000 об/мин. в течение 40 минут. Полученный осадок ресуспензировали в фосфатном солевом буфере с pH 7,2-7,4.

Вирусный материал, концентрированный в 100 раз по объему, разливали во флаконы по 50 – 100 см³ и оставляли при -40°C для хранения и дальнейшего использования при изготовлении ассоциированной вакцины.

Анализ результатов исследований показал, что применение ПЭГ-6000 позволяет концентрировать вирусную биомассу ВД-БС на 1,64–3,14 lg ТЦД_{50/см³} по сравнению с исходной вирусной суспензией.

Стандартизация антигена.

Стандартизацию антигена штамма вируса диареи «ВК-1» осуществляли путем определения концентрации белка. Для этого измеряли оптическую плотность раствора антигена на спектрофотометре СФ-46. Количество белка в антигене вычисляли по формуле:

$$C = \frac{A - B}{2,51} \times P$$

где С - количество белка;

А - показатели при длине волны 235;

В - показатели при длине волны 280;

Р - разведение пробы.

После проведения измерения количества белка и вычисления проводили корректировку концентрации количества белка путем добавления фосфатного буфера до 1,6 – 1,8 мг/мл.

3.3.4 Конструирование экспериментальных образцов усовершенствованной ассоциированной вакцины против ИРТ, ВД-БС, ПГ-3 и хламидиоза крупного рогатого скота и изучение их на лабораторных животных

При конструировании ассоциированных инактивированных вакцин, на основе нескольких антигенных комплексов, существуют несколько ключевых моментов, которые обуславливают их качество. Прежде всего, это безвредность (ареактогенность) вакцин, а также их антигенная активность и иммуногенность.

Эти качества создаваемых биопрепаратов обуславливают такие параметры как иммуногенность отдельных антигенов, их концентрация и соотношение в составе общей антигенной композиции, а также использование дополнительных веществ, усиливающих иммунный ответ

организма-реципиента – адьювантов.

Составление антигенной композиции.

В своей работе, при составлении антигенной композиции мы учитывали оптимальную концентрацию каждого антигена, вызывающую наилучший иммунный ответ. При этом концентрации антигенов ПГ-3, ИРТ и хламидийного антигена нам были известны из предыдущих работ, проведенных в нашей лаборатории [25,32,46,109], а оптимальная концентрация вируса ВД-БС была установлена нами опытным путем.

Для этого, нами были проведены опыты на кроликах, которых иммунизировали с применением вирусного антигена ВД-БС в дозе 0,5 см³ подкожно в области холки. При этом нами были использованы различные концентрации белка в одной иммунизирующей дозе антигена: 1,4-1,6; 1,6-1,8; 1,8-2,0 мг/мл.

Таблица 7 – Динамика уровня антител у кроликов после введения вируса ВД

№ группы	Конц. белка мг/мл	№ кроликов	Обратные величины титров антител к антигену ВД-БС в ИФА				
			0 дн	14 дн.	28 дн.	36 дн.	
1	1,4-1,6	1	0	100	200	200	
		2	0	100	100	200	
		3	0	100	200	100	
		4	0	100	200	100	
Средний титр (M+m)			0	100±0,01	175±4,81	150±9,62	
2	1,6-1,8	5	0	200	200	200	
		6	0	100	400	200	
		7	0	100	400	200	
		8	0	100	400	400	
Средний титр (M)			0	125±4,81	350±9,62	250±9,62	
3	1,8-2,0	9	0	100	400	400	
		10	0	100	400	200	
		11	0	200	400	200	
		12	0	100	200	200	
Средний титр (M)			0	150±14,43	350±9,62	250±9,62	
4. Контроль		13 - 16	0	0	0	0	

Результаты проведенных исследований показали, что у всех кроликов, после введения иммуногена, происходит нарастание титров специфических антител к вирусному штамму «ВК-1», которые достигли максимального значения к 28 – 36 дням. Наиболее оптимальной оказалась концентрация белка в антигене равная 1,6- 1,8 мг/мл. При этом достигался высокий уровень накопления специфических антител в крови у иммунизированных кроликов, который, на 28 и 36 дни наблюдений, обнаруживался в среднем титре 1:350 и 1:250 соответственно. Увеличение концентрации антигена не приводило к увеличению титра антител в крови опытных животных, к тому же, при этом наблюдалась реактогенность от повышения концентрации белка, которая выражалась в виде реакции на месте введения.

3.3.4.1 Испытание различных адъювантов в составе ассоциированной вакцины.

При конструировании инактивированных вакцин против вирусных и хламидийных инфекций животных важное значение отводится выбору адъюванта. Кроме того, для вакцин, применяемых в ветеринарной практике, важна не только высокая иммуногенность, но и себестоимость дозы препарата, что, не в последнюю очередь, определяется стоимостью используемого адъюванта.

В современном этапе применяются адъюванты минерального (гидроокись алюминия), растительного (сапонин) и искусственного (синтетические масла) происхождения. На основании вышеизложенного, нами были изготовлены 4 варианта ассоциированной инактивированной вакцины против ИРТ, ВД-БС, ПГ-З и хламидиоза крупного рогатого скота: 1-ый вариант – в качестве адъюванта использовали ПЭС-3+ланолин (МЛА); 2-ой вариант – ISA-50; 3-и вариант – ISA-61 и 4-й вариант – гидроокись алюминия (ГОА).

Стерильность вакцин определяли в соответствии с ГОСТ 28085-2013 путем высеива на МППБ под вазелиновым маслом, МПБ, МПА, Сабуро-агар,

среда Китта-Тароцци с последующим помещением в термостат при $37\pm0,5^{\circ}\text{C}$ и наблюдением в течение контрольного срока – 10 дней.

При определении стерильности испытуемой ассоциированной вакцины в течение установленного срока роста бактериальной и грибной микрофлоры на питательных средах не наблюдалось, что свидетельствовало о стерильности препарата.

Безвредность определяли на белых лабораторных мышах с живой массой 16-20 г. путем внутрибрюшинного введения вакцины в дозе 0,25-0,3 см^3 и дальнейшего наблюдения за состоянием подопытных животных в сравнении с контрольными в течение 10 дней. Для этого использовали 20 голов белых мышей, которых делили на 2 равные группы опытную и контрольную.

Испытание на безвредность вакцины показало, что после введения вакцины ухудшения состояния у белых мышей не наблюдалось. Выживаемость мышей, как в опытных, так и в контрольных группах была 100%, что говорило о безвредности испытуемой вакцины.

По принципу аналогов были сформированы 5 групп кроликов массой 2,5 - 3,0 кг, по 4 животных в каждой: 1-ая группа - кролики, вакцинированные вакциной на основе МЛА в дозе 1,0 см^3 подкожно; 2-ая группа - кролики, вакцинированные вакциной на основе ISA-50 в дозе 1,0 см^3 подкожно; 3-я группа - кролики, привитые вакциной на основе ISA-61 в дозе 1,0 см^3 подкожно; 4-ая группа вакцинированные ГОА вакциной в дозе 2,0 см^3 подкожно; 5-ая группа служила контролем, и вакцинации не подвергалась. Повторную вакцинацию опытных кроликов проводили на 14-ый день и последних двух кроликов на 21-й день в вышеуказанных дозах.

После вакцинации проводили ежедневную термометрию и клинический осмотр кроликов.

Антигенную активность вакцины оценивали по уровню антител в крови опытных животных. Антитела к вирусам ПГ-3 определяли в РТГА, ИРТ и ВД-БС – в ИФА и к хламидиям – в РСК. Взятие крови у животных для

серологических исследований проводили: перед вакцинацией, через 14 дней (ревакцинация), а также через 30 и 60 дней после первого введения вакцины.

В результате проведенных исследований было установлено, что до вакцинации все животные опытных групп, а так же контрольной группы, были серонегативными по отношению к ПГ-3, ИРТ, ВД-БС и хламидийному антигену. Кроме того, в течение всего срока опыта (60 дней), интактные животные оставались серонегативными ко всем 4-м использованным в опыте антигенам, что говорило о специфичности полученной реакции в опытных группах животных.

Во всех группах животных, вакцинированных различными вариантами ассоциированной вакцины, на различных сроках исследования выявлялись специфические антитела к ПГ-3, ИРТ, ВД-БС и хламидийному антигену, что позволяло сделать заключение о высокой антигенный активности всех 4-х вариантов вакцины. Результаты серологических исследований сывороток крови опытных и контрольных животных, на протяжении всего срока опыта, обобщены и представлены в таблице 8

Таблица 8 – Результаты исследования антигенной активности ассоциированной вакцины на основе различных адьювантов

Адьювант	№ жив.-го	Сроки исследования											
		14 дней				30 дней				60 дней			
		ПГ-3	ИРТ	ВД-БС	Хлам.	ПГ-3	ИРТ	ВД-БС	Хлам.	ПГ-3	ИРТ	ВД-БС	Хлам.
МЛА	1	160	800	800	20	80	1000	2000	20	1280	3200	6400	20
	2	160	200	600	20	80	400	1000	20	640	3200	6400	20
	3	80	400	600	10	160	600	1000	20	640	1000	1200	20
	4	160	600	600	10	320	600	800	20	640	2000	1000	40
Средний титр (M _{±m})		140± 11,55	500± 19,25	650± 9,62	15± 0,95	120± 30,79	650± 9,62	1200± 76,98	20± 0,05	800± 30,79	2350± 67,36	3750± 529,24	20± 2,89
ISA-50	1	160	400	200	5	320	600	400	10	320	600	1000	20
	2	640	400	200	10	320	200	800	10	80	600	1600	20
	3	640	400	200	5	1280	600	1000	20	320	1000	2400	20
	4	160	200	200	0	1280	1000	1000	10	320	2000	3200	10
Средний титр (M _{±m})		400± 46,19	350± 9,62	200± 0,05	5± 0,10	520 92,38	600± 76,98	800± 39,49	12,5± 0,48	260± 11,55	900± 128,83	2050± 221,32	17,5± 1,44
ISA-61	1	320	400	200	0	320	400	800	0	80	1000	1600	10
	2	320	400	400	5	160	100	400	10	80	400	800	10
	3	20	400	200	5	40	400	1000	5	80	600	1200	40
	4	160	200	400	5	80	400	600	5	320	600	3200	10
Средний титр (M _{±m})		205± 35,60	350± 9,62	300± 19,25	3,75± 0,24	150± 13,47	325± 14,43	700± 19,25	5± 0,10	160± 34,64	800±3 9,49	1700± 288,68	17,5± 1,44
ГОА	1	320	200	400	10	160	600	800	10	40	200	400	10
	2	640	200	400	0	80	200	800	10	160	600	800	10
	2	80	80	400	10	80	100	1000	20	640	200	800	20
	3	100	100	800	10	100	100	800	20	160	200	600	20
Средний титр (M _{±m})		285± 39,45	145± 12,51	500± 19,25	7,5± 0,48	195± 0,92	250± 28,87	850± 9,62	15± 0,96	280± 17,32	300± 19,25	650± 9,62	15± 0,95

Несмотря на высокие показатели антигенностии всех опытных образцов вакцины, между ними, все-таки, была установлена достоверная разница, как по вариантам адьюванта, так и по видам антигенов.

Так, при исследовании сывороток крови опытных групп животных на 14 день после первичной вакцинации со специфическим хламидийным антигеном (Рисунок 1) наибольшую антигенную активность проявляла вакцина на основе масло-ланолинового адьюванта. В более поздние сроки, на 30 и 60 дни после первой вакцинации, наблюдалась аналогичная картина, подтвердившая наиболее высокую антигенную активность МЛА-вакцины перед остальными образцами. При этом средние титры антител со специфическим хламидийным антигеном по группе составляли $1:15 \pm 0,95$, $1:20 \pm 0,05$ и $1:20 \pm 2,89$ соответственно на 14, 30 и 60 дни наблюдений, что говорило о высокой антигенной активности ассоциированной вакцины на основе МЛА по отношению к хламидийному антигену.

Несколько ниже, на 14 день наблюдений, был средний титр специфических хламидийных антител у животных, иммунизированных препаратом изготовленным на основе ГОА ($1:7,5 \pm 0,48$). У животных вакцинированных препаратами на основе ISA-50 и ISA-61 титры антител, в этот период, находились на уровне $1:5 \pm 0,10$ и $1:3,75 \pm 0,24$ соответственно.

Аналогичная картина наблюдалась и на 30 день после первой иммунизации. Так средние титры специфических антител к хламидийному антигену составляли в этот период $1:15 \pm 0,96$, $1:12,5 \pm 0,48$ и $1:5 \pm 0,10$ соответственно с препаратами на основе ГОА, ISA-50 и ISA-61.

На 60 день опыта, титры специфических антител в сыворотках крови животных, вакцинированных препаратом на основе ГОА, остались на прежнем уровне – $1:15 \pm 0,95$, а вот титры антител у животных в группах иммунизированных вакцинами на основе ISA-50 и ISA-61 несколько выросли, достигнув одинакового уровня – $1:17,5 \pm 1,44$ и $1:20 \pm 2,89$ – у препарата на основе МЛА.

Несколько более разнообразная картина, по уровню специфических антител, наблюдалась при исследовании сывороток крови с антигеном к ПГ-3 рисунок 2.

Так, на 14 день после первой прививки, наиболее высокий уровень антител к ПГ-3 выявлялся в крови опытных животных вакцинированных препаратом на основе ISA-50. Средний титр антител по этой группе кроликов в этот период составил $1:400 \pm 4,19$

Препараты, изготовленные на основе других адьювантов: ISA-61, ГОА, МЛА проявили меньшую антигennую активность к ПГ-3 с составе ассоциированной вакцины. Средние титры антител, соответственно использованным в вакцине адьювантом, в этот период опыта, составляли $1:205 \pm 35,60$, $1:285 \pm 39,45$ и $1:140 \pm 11,55$.

К 30 дню наблюдений у животных вакцинированных препаратом на основе ISA-50 средние титры антител достигли уровня $1:520 \pm 92,36$; у животных вакцинированных препаратом на основе ISA-61 – $1:150 \pm 13,47$; у животных вакцинированных препаратом на основе ГОА – $1:105 \pm 0,92$ и у животных иммунизированных МЛА-вакциной – $1:120 \pm 30,79$.

К 60 дню опыта, динамика уровня специфических антител в опытных группах кроликов по отношению к антигену ПГ-3 кардинально изменилась. Так, наиболее высокую антигennую активность проявил препарат на основе МЛА. Средние титры специфических антител в крови у животных этой группы выявлялись на уровне $1:800 \pm 30,79$. Антигеннность остальных вакцин была существенно ниже. Средние титры антител у животных этих групп составляли $1:260 \pm 11,55$, $1:160 \pm 34,64$ и $1:280 \pm 17,32$ соответственно с ISA-50, ISA-61 и ГОА препаратами.

Динамика роста специфических антител к вирусу ИРТ представлена в диаграмме 3. В данной схеме видно, что на 14 дней после первой вакцинации у животных показали следующее: при использование вакцины на основе МЛА средний титр составил $1:500 \pm 19,25$; вакцина на основе ISA-50

составило $1:350 \pm 9,62$; вакцина на основе ISA-61 составило $1:350 \pm 9,62$ и вакцина на основе ГОА составило $1:145 \pm 12,51$.

На 30 день после первой иммунизации показали аналогичную динамику роста антител в котором средний титр специфически антител к вирусу ИРТ составляет: вакцина на основа МЛА $1:650 \pm 9,62$; вакцина на основе ISA-50 $1:600 \pm 76,98$; вакцина на основе ISA-61 $1:325 \pm 14,43$ и вакцина на основе ГОА $1:250 \pm 28,87$.

На 60 день после первой иммунизации вакцины на основе МЛА наблюдался значительный рост специфических антител, что составило $1:2350 \pm 67,36$. Остальные варианты вакцины дали незначительный рост антител к данному антигену. Средние титры составляли $1:900 \pm 128,83$, $1:800 \pm 39,49$, $1:300 \pm 19,25$ соответственно с ISA-50, ISA-61 и ГОА вакцинами.

Динамика роста специфических антител к вирусу ВД-БС представлена на рисунке 4. В данной схеме видно, что на 14 дней после первой вакцинации у животных показатели были следующие: при использование вакцины на основе МЛА средний титр составил $1:650 \pm 9,62$; вакцина на основе ISA-50 – составило $1:200 \pm 0,10$; вакцина на основе ISA-61 - составило $1:300 \pm 19,25$ и вакцина на основе ГОА – составило $1:500 \pm 19,25$.

На 30 день после первой иммунизации кроликов показатели были аналогично 14-ю, специфические антитела к вирусу ВД-БС составили: вакцина на основа МЛА $1:1200 \pm 76,98$; вакцина на основе ISA-50 $1:800 \pm 39,49$; вакцина на основе ISA-61 $1:700 \pm 19,25$ и вакцина на основе ГОА $1:850 \pm 9,62$.

На 60 день после первой иммунизации наблюдался значительный рост специфических антител к вакцине на основе МЛА, в титре антител что составило $1:3750 \pm 529,24$. Остальные варианты вакцины дали незначительный рост антител к данному антигену. Средние титры составляли $1:2050 \pm 221,32$, $1:1700 \pm 288,68$, $1:650 \pm 9,62$ соответственно с ISA-50, ISA-61 и ГОА вакцинами.

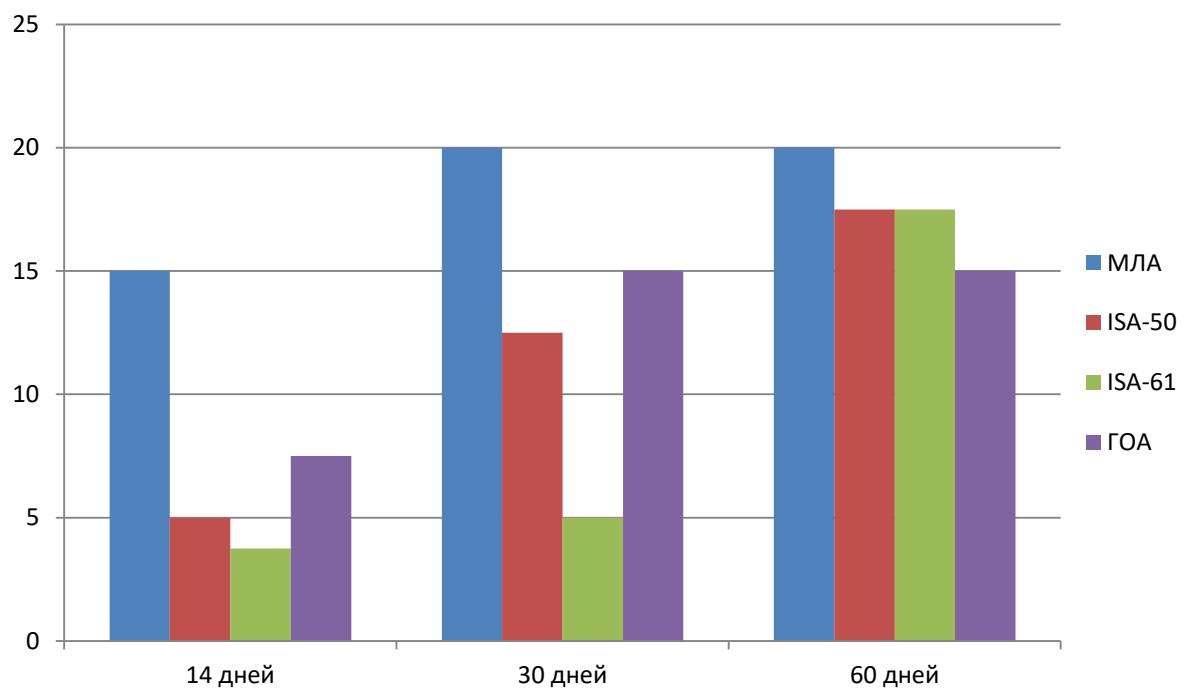


Рисунок 1 – Динамика титров противохламидийных антител у кроликов, вакцинированных ассоциированной вакциной на основе разных адьювантов.

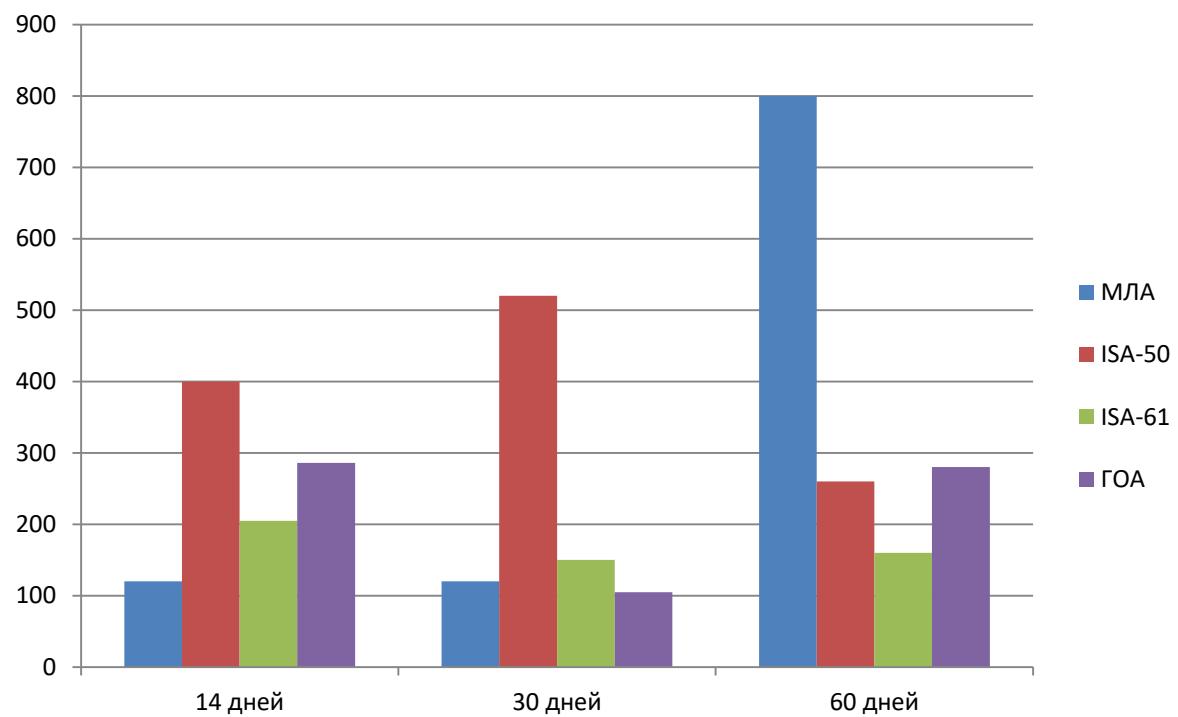


Рисунок 2 – Динамика титров антител против ПГ-3 у кроликов вакцинированных ассоциированной вакциной на основе различных адьювантов

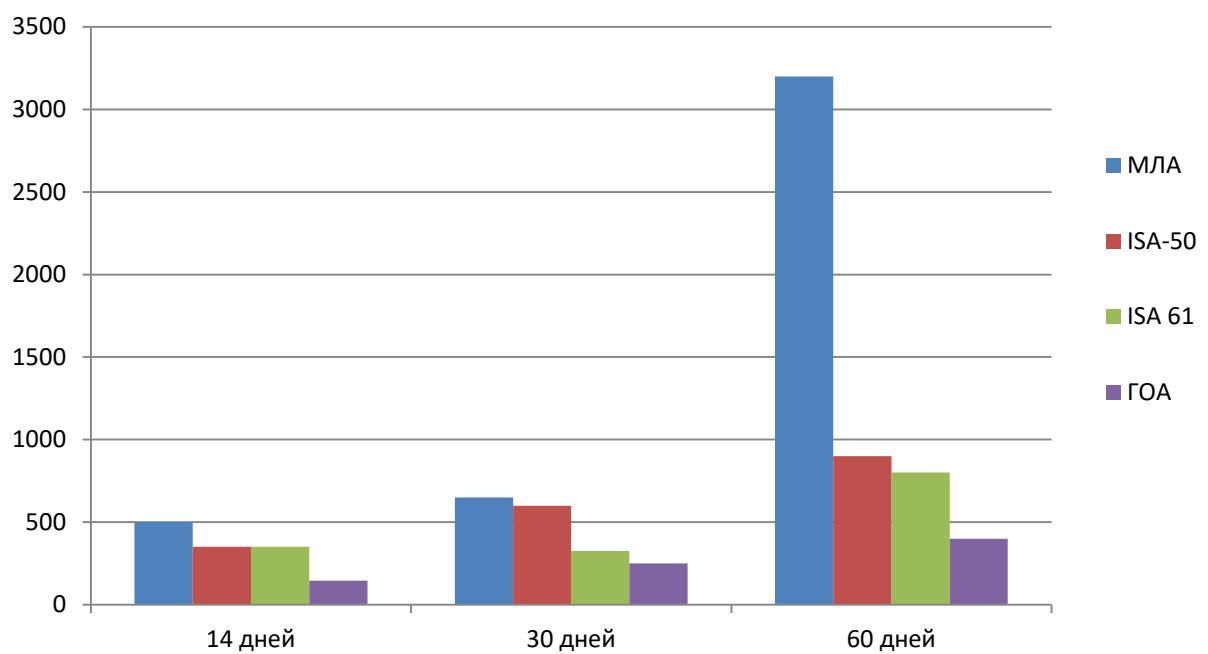


Рисунок 3 – Динамика титров антител против ИРТ у кроликов вакцинированных ассоциированной вакциной на основе различных адъювантов

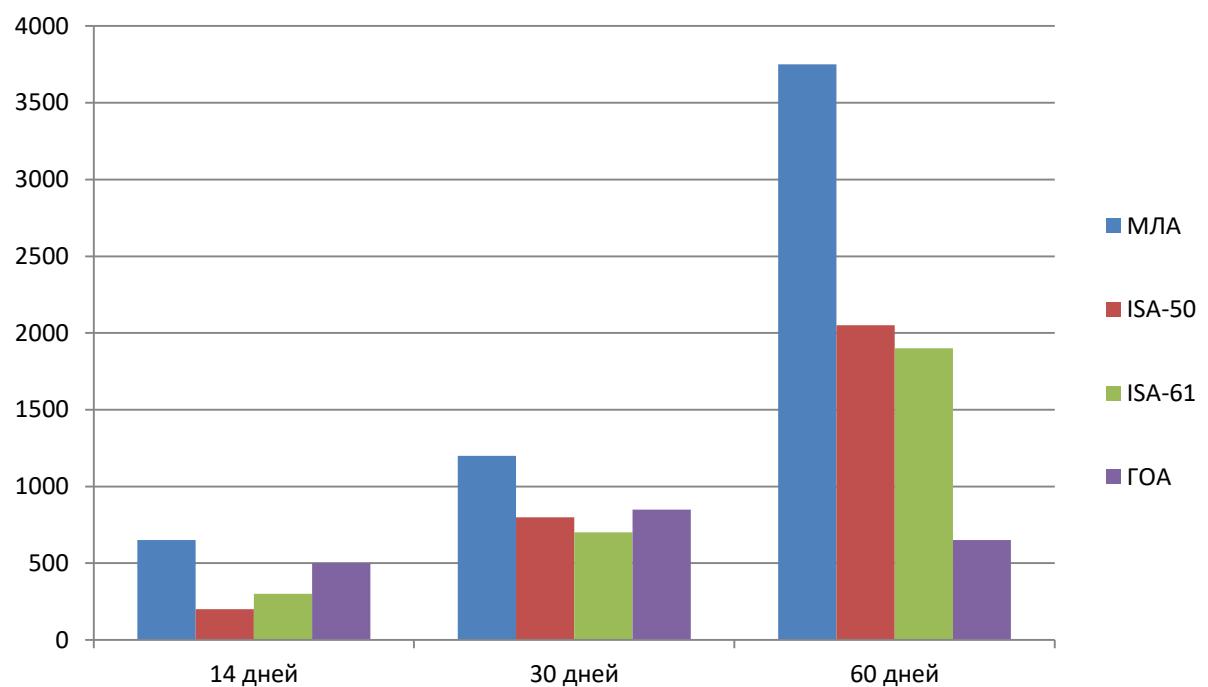


Рисунок 4 – Динамика титров антител против ВД-БС у кроликов вакцинированных ассоциированной вакциной на основе различных адъювантов

Антигенную активность и прививочную дозу ассоциированной вакцины против ИРТ, ВД-БС, ПГ-3 и хламидиоза определяли по титру специфических антител сыворотки крови животных в разные сроки после иммунизации.

Для опыта использовали 16 взрослых кроликов, с живой массой 2,5 – 3 кг из которых были сформированы, по принципу аналогов, 3 опытные группы и 1 контрольная, по 4 головы в каждой:

- 1-ая группа – кролики, вакцинированные в дозе 0,5 см³ подкожно;
- 2-ая группа – кролики, вакцинированные в дозе 1,0 см³ подкожно;
- 3-я группа – кролики, вакцинированные в дозе 2,0 см³ подкожно;
- 4-ая группа – (контрольная) не вакцинированные животные.

Через 14 дней, по 2 кролика, из каждой опытной группы, ревакцинировали в тех же дозах, с целью установления целесообразности ревакцинации для стимулирования выработки специфических антител.

Взятие крови у животных для серологических исследований проводили: перед вакцинацией, через 14 дней после (перед ревакцинацией), а также через 30 дней после первого введения вакцины.

Анализ результатов опыта показал, что у всех животных до вакцинации в сыворотке крови отсутствовали специфические антитела к антигенам вирусов ПГ-3, ИРТ, ВД-БС и к хламидийному антигену.

Анализ результатов, полученных на 14 день после первой вакцинации, показал (Таблица 9), что в крови у вакцинированных, в дозе 0,5 мл, кроликов появлялись специфические антитела к ПГ-3 в титрах 1:5 – 1:10, в среднем титре 1:6,25±0,24. К антигену ИРТ в этот период антитела у всех кроликов выявлялись в ИФА в титре 1:100±0,10. К хламидийному антигену антитела в РСК были выявлены в титрах 1:10 – 1:20, в среднем – 1:17±0,48. А к вирусу ВД-БС в это период специфических антител в ИФА обнаружено не было, что говорило о недостаточной дозе антигена в составе вакцины или о низкой его активности.

Таблица 9 – Уровень специфических антител в крови кроликов на 14 день после вакцинации

№ группы	Дозы, мл	№ № кроликов	Обратные величины титров антител к антигену				
			ПГ-3	ИРТ	ВД-БС	Хламидиоз	
			РТГА	ИФА	ИФА	РСК	
1.	0,5 мл	1	5	100	0	10	
		2	10	100	0	20	
		3	5	100	0	20	
		4	5	100	0	20	
Средний титр (M=m)			6,25±0,24	100±0,10	0	17±0,48	
2.	1,0 мл	5	10	100	0	80	
		6	10	200	200	40	
		7	10	1600	200	20	
		8	10	100	100	40	
Средний титр (M=m)			10±0,10	500±78,98	125±4,81	45±0,96	
3.	2,0 мл	9	320	3200	3200	40	
		10	10	100	100	20	
		11	5	100	100	20	
		12	10	100	100	20	
Средний титр (M=m)			86±14,76	875±149,15	875±149,15	25±0,96	
4. Контроль			13 - 16	0	0	0	

У животных, вакцинированных в дозе 1,0 мл, уровень специфических антител ко всем четырем антигенам был значительно выше и составлял в среднем к ПГ-3 – 1:10±0,10 к ИРТ – 1:500±78,98, к хламидийному антигену – 1:45±0,96. С антигеном ВД-БС реагировали 3 кролика из 4 в титрах 1:100 – 1:200, в среднем – 1:125±4,81.

Вакцинация ассоциированной вакциной в дозе 2,0 мл вызывала больший иммунный ответ, выражавшийся у кроликов в образовании специфических антител в средних титрах 1:86±14,76 – к антигену ПГ-3, 1:875±149,15 – к антигену ИРТ, 1:875±149,15 – к антигену ВД-БС и 1:25±0,96 – к хламидийному антигену.

Здесь следует отметить, что в этот период, через 14 дней после вакцинации, был выявлен максимальный титр антител к хламидийному антигену в группах животных, вакцинированных в дозе 1,0 и 2,0 мл.

Через 30 дней после первой вакцинации (Таблица 10) в группе двукратно вакцинированных животных выявлялись максимальные титры антител ко всем трем вирусным антигенам, но в каждой из трех доз они несколько отличались. Так, наиболее высокие титры наблюдались у животных, вакцинированных в дозе 2,0 мл ко всем антигенам: к ПГ-3 – 1:100, к ИРТ – 1:3200, к ВД-БС – 1:4800 и к хламидиям – 1:25.

Таблица 10 – Уровень специфических антител в крови кроликов на 30 день после вакцинации и ревакцинации

№ группы	Дозы, мл	№ ж-ых	Кратность вакцинации	Обратные величины титров антител к антигену			
				ПГ-3	ИРТ	ВД-БС	Хлам.
				РТГА	ИФА	ИФА	РСК
1.	0,5 мл	1	1-кратно	5	100	200	10
		2		5	100	200	20
		3	2-кратно	20	400	800	10
		4		10	400	1600	20
Средний титр (М)				5/15	100/400	200/1200	15/15
2.	1,0 мл	5	1-кратно	10	200	1600	10
		6		5	200	200	40
		7	2-кратно	40	1600	1600	10
		8		80	3200	1600	20
Средний титр (М)				7/60	200/2400	900/1600	25/15
3.	2,0 мл	9	1-кратно	10	1600	3200	20
		10		20	800	1600	10
		11	2-кратно	160	3200	3200	40
		12		40	3200	6400	10
Средний титр (М)				15/100	1200/3200	2400/4800	15/25
4. Контроль	13-16			0	0	0	0

Примечание: через дробь (/) указаны средние титры антител при однократной/двукратной вакцинации

Несколько ниже, были титры у кроликов, вакцинированных в дозе 1,0 мл: к ПГ-3 – 1:60, к ИРТ – 1:2400, к ВД-БС – 1:1600 и к хламидиям – 1:15, хотя они и находились на достаточно высоком по сравнению с первой, вакцинированной в дозе 0,5 мл, группе, титры антител в которой были ниже, чем в остальных и составили к ПГ-3 – 1:15, к ИРТ – 1:100, к ВД-БС – 1:200 и к антигену хламидий – 1:15.

При этом титры антител в группах однократно вакцинированных животных были ниже по сравнению с таковыми при двукратной вакцинации. Так, в группе кроликов иммунизированных в дозе 2,0 мл титры антител к вирусу ПГ-3 снизились с 1:86 на 14-ый день после вакцинации, до 1:15 на 30 день после введения вакцины. Аналогичная картина наблюдалась при ИРТ и ВД-БС. Несколько стабильный уровень антител был зафиксирован у животных к хламидийному антигену, где достоверной разницы между однократно и двукратно вакцинированными животными не наблюдалось.

В ходе опытов было установлено, что введение ассоциированной вакцины против ИРТ, ВД-БС, ПГ-3 и хламидиоза КРС инактивированной эмульсионной, подкожно, в дозах 1,0 и 2,0 мл вызывает у кроликов формирование высокого гуморального иммунитета выражющегося в образовании высокого уровня специфических антител ко всем четырем антигенам.

Наиболее высокий уровень антител к хламидийному антигену наблюдается на 14-ый день после введения вакцины в дозе 1,0 мл, а к вирусным антигенам пик антителообразования зафиксирован на 30 сутки после двукратной иммунизации в дозе 2,0 мл.

Анализируя данные по уровню специфических антител ко всем 4 изучаемым антигенам, в группах однократно и двукратно вакцинированных животных, можно констатировать, что ревакцинация кроликов с интервалом 14 дней во всех трех дозах оказывала стимулирующий эффект выражющийся ростом антител и подтвердила свою целесообразность.

Таким образом, была установлена высокая антигенная активность ассоциированной вакцины в отношении всех четырех антигенов, включенных в ее состав: ПГ-3, ИРТ, ВД-БС и хламидиоза при оптимальных прививочных дозах на кроликах объемом 1,0 и 2,0 мл соответственно к хламидийному и вирусным антигенам.

3.3.5 Изучение антигенной активности и иммуногенности «Ассоциированной вакцины против ИРТ, ВД-БС, ПГ-3 и хламидиоза крупного рогатого скота инактивированной эмульсионной» на телятах

Для проведения острого опыта в ООО «Среднее Девятое» Лайшевского р-на РТ были отобраны 5 телят 10 дневного возраста. Клинический осмотр телят не выявил у них наличия патологий. Исследования пробы сыворотки крови животных на наличие антител к вирусам ИРТ, ВД-БС, ПГ-3 и хламидийному антигену, дали отрицательный результат.

После этого, телят разделили на 2 группы: 3 гол. – опытная группа и 2 гол. – контрольная группа. Животные опытной группы были привиты «Ассоциированной вакциной против ИРТ, ВД-БС, ПГ-3 и хламидиоза крупного рогатого скота инактивированной эмульсионной» двукратно с интервалом 14 дней в дозе 1,0 см³ внутримышечно в область средней треть шеи. Контрольные телята не вакцинировались.

Клинические наблюдения, проводимые за телятами после вакцинации, не установили разницы между опытной и контрольной группами. Местной реакции на введение вакцины у телят также не наблюдалось.

В течение 27 дней после ревакцинации опытные и контрольные телята находились в хозяйстве, а затем - завезены в ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» и размещены в виварном помещении лаборатории вирусных и хламидийных инфекций.

В течение трех дней перед заражением проводили клинический осмотр и термометрию опытной и контрольной группы телят не выявивший у животных никаких патологий. Кроме этого, сыворотки крови телят были исследованы на наличие антител к антигенам хламидий и вирусов ПГ-3, ИРТ, ВД-БС. Установлено, что перед заражением у вакцинированных телят был выявлен высокий уровень антител ко всем 4-м антигенам, тогда как у контрольных телят антитела в пробах сывороток крови не выявлялись.

На третий день после завоза (30 дней после ревакцинации) животных опытной и контрольной групп заразили эпизоотическими штаммами

возбудителей ИРТ, ВД-БС, ПГ-З и хламидиоза крупного рогатого скота. Для заражения использовали следующие штаммы вирусов и хламидий:

- «КА-9» - эпизоотический штамм герпесвируса типа-1 КРС с инфекционным титром $6,25 \text{ Ig TЦД}_{50/\text{мл}}$;
- «АБА-13» - вирусный изолят ВД-БС КРС с инфекционным титром $6,0 \text{ Ig TЦД}_{50/\text{мл}}$;
- «ТМ-50» - вирусный изолят ПГ-З с инфекционным титром $5,5 \text{ (lg TЦД}_{50/\text{мл})}$;
- «МЗ» - возбудитель хламидиоза крупного рогатого скота с инфекционным титром $10^{-6,5} \text{ ЭЛД}_{50/0,3 \text{ мл}}$.

Инфекционный материал вводили интратрахеально - в дозе $5,0 \text{ см}^3$ и интраназально - в дозе $10,0 \text{ см}^3$

После экспериментального заражения у телят опытной группы не наблюдалось выраженной температурной реакции, в то время как у контрольных животных на 2-ой день после введения вирулентных штаммов вирусов и хламидий была выявлена гипертермия показавшая повышение ректальной температуры до $39,7\text{-}40,6^\circ\text{C}$.

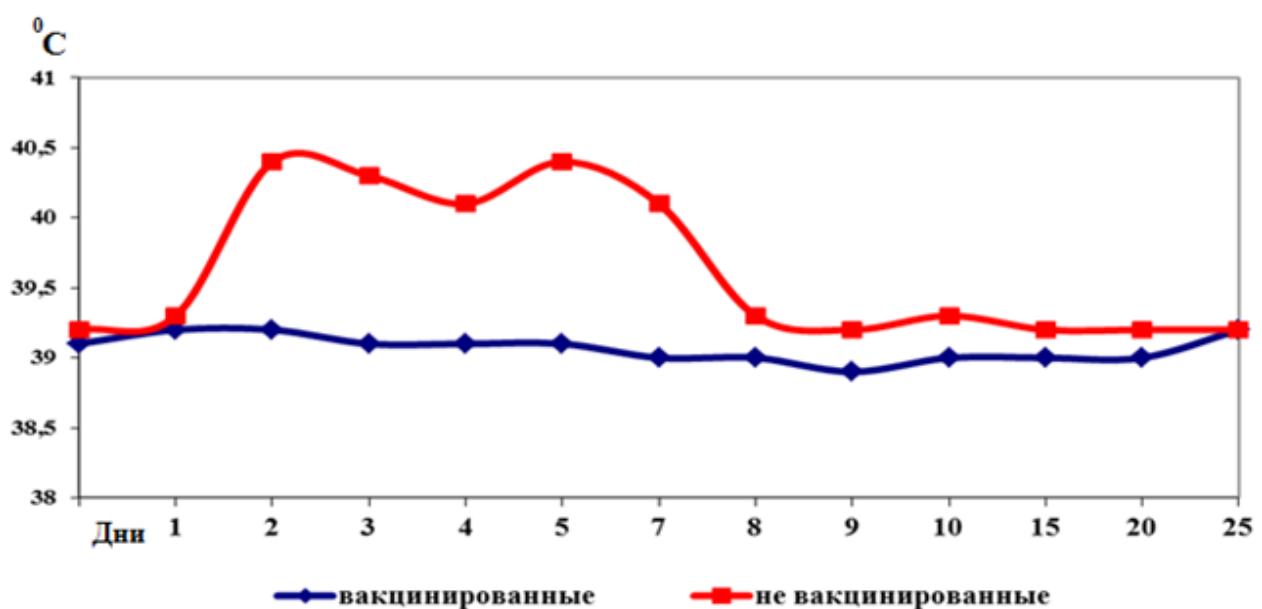


Рисунок 5 – Графическая кривая средней температуры у опытных телят после заражения

Такая тенденция сохранялась в течение 7-и суток с момента заражения. При этом у всех контрольных животных наблюдали ярко выраженные симптомы респираторно-кишечной патологии, которая характеризовалась отказом от корма, учащенным дыханием, сухим кашлем, слизисто-серозными истечениями из глаза и носа, эрозиями на носовом зеркальце и диареей. У вакцинированных животных в течение всего опыта клинических признаков инфекции не наблюдалось.

Анализ результатов серо-иммунологических исследований, проводимый в течение опыта, показал, что у всех телят до введения вакцины отсутствовали антитела к вирусам ПГ-3, ИРТ, ВД и хламидиям.

Далее, было установлено, что двукратное введение вакцины стимулировало у телят, через 30 дней после ревакцинации, рост титров специфических антител, которые регистрировались в пределах 1:1280-1:2560 к вирусу парагриппа-3 в РТГА, 1:1600-1:3200 к вирусу ИРТ в ИФА, 1:1600-1:12800 к вирусу вирусной диареи в ИФА и 1:10-1:80 к хламидийному антигену в РСК. Результаты представлены на рисунке 6.

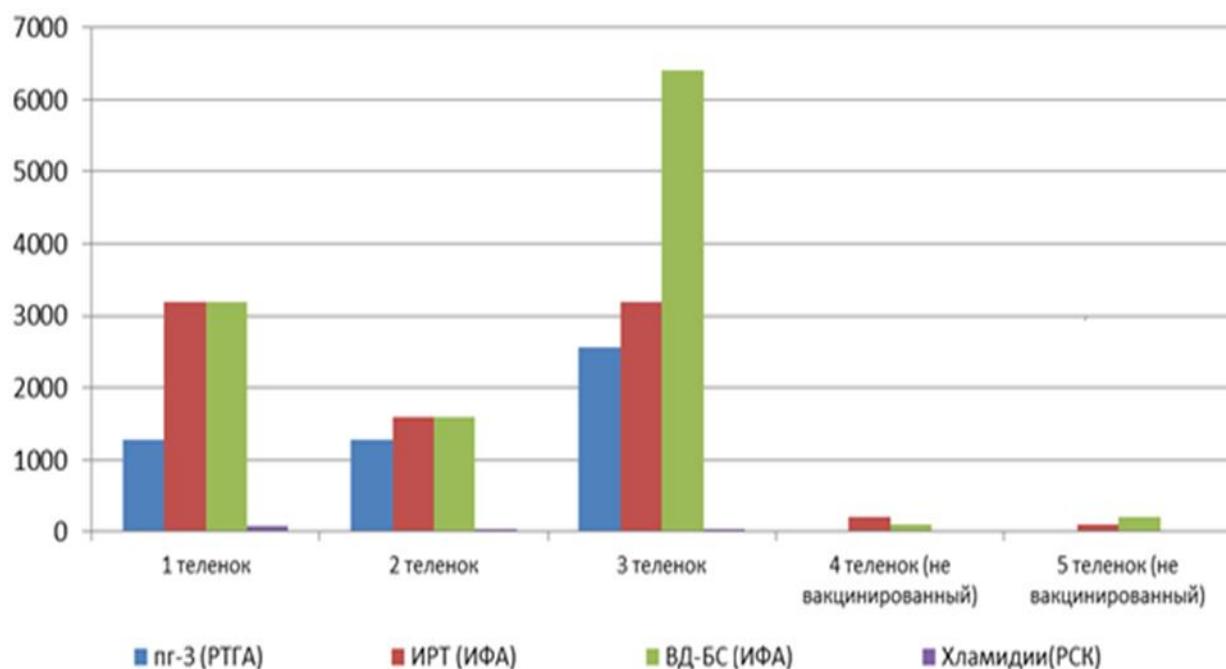


Рисунок 6 – Титры специфических антител после ревакцинации 30 дней (заражение)

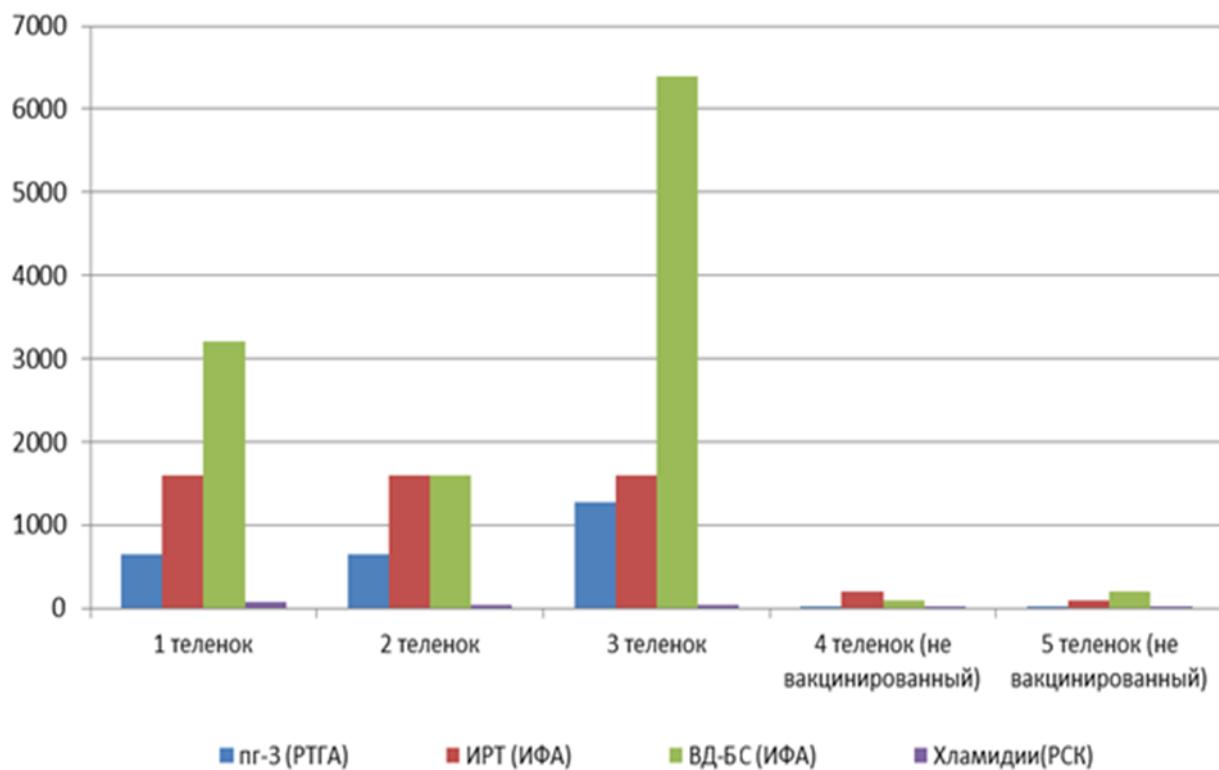


Рисунок 7 – Титры специфических антител на 7 день после контрольного заражения

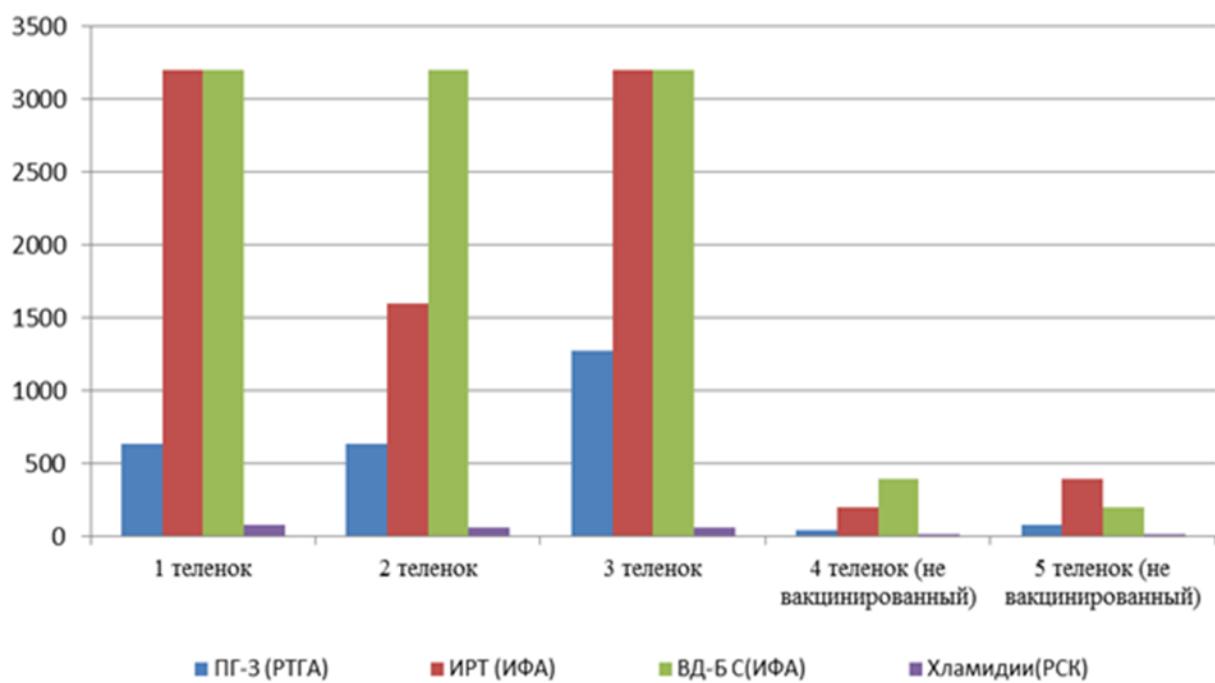


Рисунок 8 – Титры специфических антител на 25-й день после контрольного заражения

При исследовании сывороток крови опытных телят на 7-ой и 25-ый дни после заражения выявлено незначительное снижение титров поствакцинальных антител. Результаты представлены на рисунке 7 и 8.

У контрольных животных, как при первичном заборе крови, так и перед заражением, специфические антитела к искомым антигенам не выявлены. На 7 день после заражения наблюдался незначительный рост титров ко всем введённым инфекционным агентам и только на 25-й день в пробах сывороток крови контрольных животных были обнаружены постинфекционные специфические антитела в диагностических титрах: к ПГ-3 – 1:40-1:80; к ИРТ – 1:200-1:400; к ВД-БС – 1:400-1:200 и к хламидийному антигену – 1:10-1:20.

Таблица 11 – Результаты вирусологических и бактериологических исследований

№ групп	№ живот- ных	Штаммы вирусов и хламидий использованные для заражения	Дни исследования после заряжения						
			4	6	8	10	15	20	25
Опытные (вакцинированные) телята									
1	1	Вирусы ИРТ шт. «КА-9», ВД-БС шт. «АБА-13», ПГ- 3 шт. «ТМ – 50», хламидии шт. «МЗ»	–	–	–	–	–	–	–
	2		–	–	–	–	–	–	–
	3		–	–	–	–	–	–	–
Контрольные (не вакцинированные) телята									
2	4	Вирусы ИРТ шт. «КА-9», ВД- БС шт. «АБА-13», ПГ- 3 шт. «ТМ – 50», хламидии шт. «МЗ»	в	ив	вх	–	–	–	–
	5		ив	вп	и	–	–	–	–

Примечание: В – вирус вирусной диареи – болезни слизистых оболочек;

П – вирус парагриппа-3 крупного рогатого скота;

И – вирус инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота;

Х – возбудитель хламидиоза крупного рогатого скота;

Вирусологические и бактериологические исследования клинических материалов (носовые и глазные смывы), отобранные от телят из опытной группы через 4, 6, 8, 10, 15 и 25 дней после инфицирования, дали отрицательные результаты. В свою очередь, нами установлено, что все эпизоотические вирусные и хламидийные агенты, использованные для заражения контрольных животных, выделялись из проб носовых и глазных истечений в период клинического проявления респираторно-кишечной патологии. Так, на 4-8-е сутки после заражения от двух контрольных животных на культуре клеток и на куриных эмбрионах были выделены все исходные штаммы вирусов и штамм возбудителя хламидиоза КРС (Таблица 11).

Результаты гематологических исследований (Таблица 12), проводимые параллельно с серо-иммунологическими исследованиями на протяжении всего опыта, показали, что на 7-ой день после инфицирования у всех телят, как в опытных, так и в контрольной группах происходило снижение уровня гемоглобина, а также уменьшение количества эритроцитов в крови. На 25-ый день после заражения эти показатели вернулись к начальному уровню. Следует отметить, что у животных контрольной группы в течение всего опыта, после заражения, регистрировался лейкоцитоз.

Таким образом, лабораторные испытания на телятах ассоциированной вакцины против ИРТ, ВД-БС, ПГ-З и хламидиоза КРС показали, что биопрепарат ареактогенен и обеспечивает формирование иммунного ответа ко всем 4-м агентам, способного защитить телят от экспериментальной вирусно-хламидийной инфекций.

Таблица 12 - Гематологические показатели крови у подопытных животных

№ группы	№ животных	Штаммы вирусов и хламидий использованные для заражения телят	До заражения			На 7 день после заражения			На 25 день после заражения		
			Лейкоциты, 10^9 г/л	Гемоглобин, г/л	Эритроциты, 10^{12} г/л	Лейкоциты, 10^9 г/л	Гемоглобин, г/л	Эритроциты, 10^{12} г/л	Лейкоциты, 10^9 г/л	Гемоглобин г/л	Эритроциты, 10^{12} г/л
Опытные (вакцинированные) животные											
1	1947	Вирусы ИРТ шт. «КА-9», ВД-БС шт. «АБА-13», ПГ- 3 шт. «ТМ-50», хламидии «МЗ»	7,0	120	8,2	8,7	104	7,2	8,2	109	7,8
	1953		8,2	90	5,4	9,4	112	8,0	8,8	115	8,6
	1961		8,2	114	6,8	8,9	109	8,3	8,5	108	8,2
Контрольные (не вакцинированные) животные											
2	1963	Вирусы ИРТ шт. «КА-9», ВД-БС шт. «АБА-13», ПГ- 3 шт. «ТМ – 50», хламидии «МЗ»	7,3	98	8,1	7,9	98	6,3	10,1	97	7,0
	1967		7,5	106	6,5	8,1	108	7,9	8,7	108	8,2

3.3.6 Эффективность применения ассоциированной вакцины против ИРТ, ВД-БС, ПГ-З и хламидиоза крупного рогатого скота в условиях неблагополучного хозяйства

Результаты испытаний вакцины в лабораторных условиях на лабораторных животных и крупном рогатом скоте показали, что препарат является безвредным, слабо реактогенным, при этом он обладает выраженной антигенной активностью и иммуногенностью ко всем 4-м инфекционным агентам, входящим в ее состав.

На заключительном этапе, целью работы, явилось испытание разработанной вакцины в условиях неблагополучного по респираторно-кишечным инфекциям хозяйства. ЗАО «Акконд-АгроСибирь» Республики Чувашия.

С этой целью нами, в течение трех лет, в хозяйстве проводилась профилактическая обработка сухостойных коров и новорожденных телят экспериментальными сериями «Ассоциированной вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и хламидиоза крупного рогатого скота инактивированной эмульсионной».

Вакцину животным вводили внутримышечно в среднюю треть шеи двукратно с интервалом 14-20 дней, в дозах: телятам в возрасте от 3 дней до 6 месяцев – 1,0 см³, молодняку в возрасте старше 6 месяцев и взрослым животным – 2,0 см³. Ревакцинацию телят проводили через 6 месяцев однократно в дозе 2,0 см³. Стельных коров и нетелей вакцинировали за 1,5 – 2 месяца до отела в тех же дозах.

Вакцинировали только здоровых животных. Клинические наблюдения, проводимые после вакцинации, не выявили у животных местной и общей реакции на введение препарата.

О профилактической эффективности «Ассоциированной вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и хламидиоза крупного рогатого скота инактивированной эмульсионной» судили по фактическим данным ветеринарной отчетности в хозяйстве, фиксирующей количество случаев заболевания и падежа телят. Так, анализ

данных отчетности показал, что в течение трех лет применения вакцины в хозяйстве существенно снизился уровень заболеваемости телят и повысился процент их сохранности, что свидетельствовало об эффективности испытуемой ассоциированной вакцины.

Анализируя данные по годам видно, что в 1-м году применения вакцины в хозяйстве был получен 631 теленок из которых заболело 264 головы молодняка. От болезни органов дыхания и желудочно-кишечного тракта пало 33 животных, что составило 42% и 5,2% соответственно; во втором году из 711 народившихся телят заболел 171 теленок, а пало 19 голов, что составило 24% и 2,7% соответственно; за третий год из 847 полученных в хозяйстве телят заболело 82, а погибло от заболевания 16 телят, что соответственно составило 10% и 1,8%. Кроме этого, у стельных коров в хозяйстве ежегодно регистрировали аборты хламидийной этиологии. Так, в 2014 году, было 25(3,8%) абортов. В последующие годы, после вакцинации, их количество снижалось: в первом году было зарегистрировано 23(3,1%) абORTа; во втором году – 14(1,7%) случаев; в третьем году – 16(1,9%) абортов.

Данные по абортам у коров, а также заболеваемости и падежу телят, обобщены в таблице 13 и дополнительно представлены на рисунке 9.

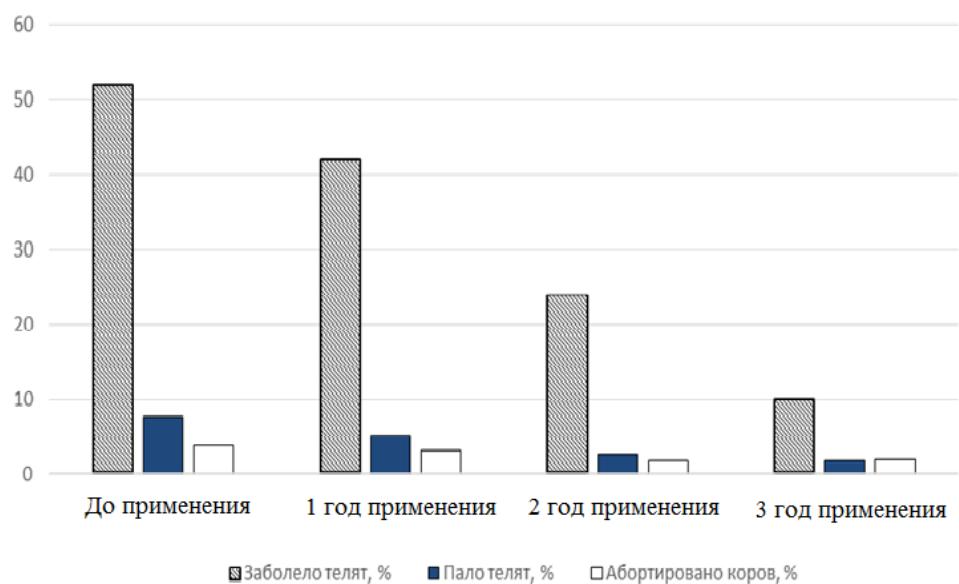


Рисунок 9 – Показатели заболеваемости, падежа телят и абортов у коров в хозяйстве до и после применения вакцины

Статистический анализ, проведенный за 3 года применения ассоциированной вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и хламидиоза крупного рогатого скота инактивированной эмульсионной показал, что сохранность молодняка достигла 97,9 %.

Благодаря сохранности молодняка, в данном хозяйстве увеличилось количество поголовья дойных коров и выход телят на 100 коров. Так, до применения вакцины в хозяйстве имелось 666 голов дойного стада, от которых, в течение года было получено 557 телят. Т.е. на 100 коров было получено 84 теленка.

В первом году, с началом лечебных и профилактических мероприятий, в хозяйстве насчитывалось 733 коровы от которых получили 631 теленка или 86 телят на 100 коров. Во-втором году в хозяйстве уже насчитывалось 806 коров от которых получили 711 телят или 88 телят на 100 коров. В третьем году, благодаря профилактической вакцинации, ситуация в хозяйстве кардинально изменилась, так от 840 коров было получено 847 телят, что составило 101 теленок на 100 коров в год.

Данные по ежегодному поголовью коров и получению приплода обобщены в таблице 13 и представлены на рисунке 10 .

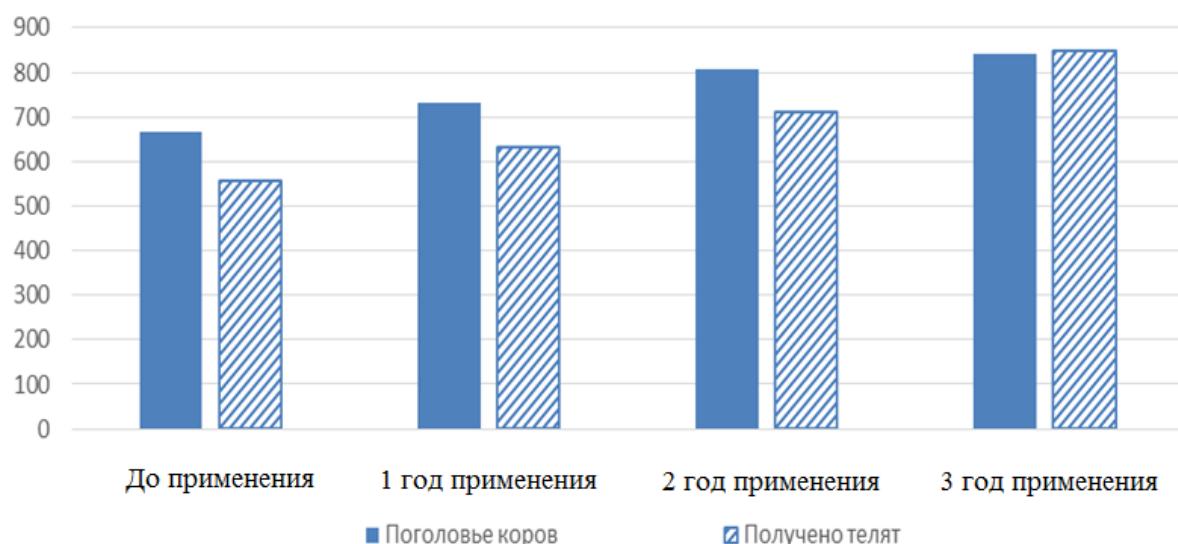


Рисунок 10 – Данные по количеству коров и получению приплода до и после применения вакцины

Таким образом, в течение 3 лет применения вакцины в хозяйстве в 1,5 раза увеличилось количество телят, а заболеваемость телят и их падеж уменьшились соответственно в 5 и 4,2 раза. Кроме этого, в 1,3 раза в хозяйстве увеличилось поголовье дойного стада, и получение телят на 100 коров выросло с 84 до 101 головы, что больше в 1,2 раза.

Таблица 13 –эффективность ведения животноводства в хозяйстве по годам после внедрения ассоциированной вакцины

Наименование показателей	Ед. измерения	Годы			Интерпретация результатов	
		До применения	После применения			
			1 год	2 год		
1. Поголовье дойных коров	Коровы	666	733	806	840	Увеличилось в 1,3 раза
2. Получено телят	голов	557	631	711	847	В 1,5 раза больше
3. Получено телят на 100 коров	голов	84	86	88	101	Увеличилось в 1,2 раза
4.Заболеваемость телят	голов	293	264	171	82	Уменьшилась в 5 раз
	%	52	42	24	10	
5. Падеж телят	голов	43	33	19	16	Уменьшился в 4,2 раза
	%	7,7	5,2	2,6	1,8	
6. Сохранность телят	%	92	94	97	98	Повысилась на 6%
7. Количество аборотов	голов	25	23	14	16	Уменьшилось в 2 раза
	%	3,8	3,1	1,7	1,9	

Из результатов проведенных в таблице данных видно, что внедрение вакцинации поголовья крупного рогатого скота ассоциированной вакциной против ПГ-3, ИРТ, ВД-БС и хламидиоза инактивированной эмульсионной способствовало постепенному уменьшению заболеваемости молодняка в неблагополучном хозяйстве, увеличению его рождаемости и сохранности, как следствие, произошло увеличение стада коров, что положительно отразилось на эффективности ведения животноводства в целом.

Следовательно, разработанная нами «Ассоциированная вакцина против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и хламидиоза крупного рогатого скота инактивированная эмульсионная» обуславливает формирование иммунитета после 2-кратного внутримышечного введения в дозах 1,0 см³ и 2,0 см³ напряженного иммунитета, обеспечивающего до 97,9% сохранность вакцинированных животных, при этом обладает высокой профилактической эффективностью и может быть рекомендована в ветеринарную практику для борьбы с хламидийными и вирусными респираторно-кишечными заболеваниями КРС.

4 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. В результате клинико-эпизоотологического мониторинга 46-ти хозяйств не благополучных по респираторно-кишечным инфекциям молодняка установлено, что этиологическими агентами заболеваемости телят, являются вирусы ПГ-3, ИРТ, ВД-БС, что послужило предпосылкой для усовершенствования ассоциированной вакцины, путем добавления в её состав соответствующего антигена.

2. Установлено, что чувствительность к вирусу ВД-БС была наиболее высокой у культуры клеток MDBK: оказывая интенсивное цитопатическое действие на монослой, вирус сохранял высокую инфекционную активность в дальнейших пассажах, что позволило использовать эту культуру в качестве основной биологической модели при наработке биомассы для изготовления ассоциированной вакцины.

3. Разработана эффективная методика роллерного культивирования вирусного штамма «ВК-1» (ВИЭВ) с использованием доступных компонентов (99% среда Игла МЕМ и 1% глутамина), а также определен оптимальный режим культивирования в роллере: температура $37\pm0,5^{\circ}\text{C}$, скорость вращения роллерных бутылей 8-10 об/час, продолжительность выращивания 36-48 часов, коэффициент заполнения бутылей 0,16-0,19.

4. Сравнительное испытание различных адьювантов (ISA 50, ISA 61, гидроокись алюминия и МЛА) в составе ассоциированной вакцины показало, что МЛА обладает более выраженной антигенной активностью: у кроликов, иммунизированных вакциной на основе МЛА наблюдался наиболее высокий титр антител ко всем 4-м антигенам, использованным в составе ассоциированной вакцины.

5. В опытах на лабораторных животных установлено, что разработанная ассоциированная вакцина на основе масло-ланолинового адьюванта безвредна, обладает выраженной антигенной активностью, обеспечивают формирование гуморального иммунного ответа у кроликов, а

также стабильно сохраняет все биологические свойства в течение срока хранения.

6. Испытание иммуногенности ассоциированной вакцины против ИРТ, ПГ-3, ВД-БС и хламидиоза КРС на телятах показало, что биопрепарат обеспечивает формирование иммунного ответа ко всем 4-м агентам, способного защитить опытных животных от экспериментальной вирусно-хламидийной инфекций.

7. В производственных опытах установлена эффективность разработанной ассоциированной вакцины против ИРТ, ВД-БС, ПГ-3 и хламидиоза КРС: в течение 3 лет применения вакцины в хозяйстве в 1,5 раза увеличилось количество телят, а их заболеваемость и падеж уменьшились соответственно в 5 и 4,2 раза. Кроме этого, в 1,3 раза в хозяйстве увеличилось поголовье дойного стада и получение телят на 100 коров выросло с 84 до 101, что больше в 1,2 раза.

5 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Материалы исследований по разработке и применению ассоциированной вакцины вошли в следующие нормативные документы:

- Технологический регламент на Ассоциированную вакцину против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и хламидиоза крупного рогатого скота инактивированной эмульсионной;
- Инструкция по применению вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и хламидиоза крупного рогатого скота инактивированной эмульсионной (Утвержденная 15.03.2016 г.)

6 СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АГ – антиген;

АТ – антитело

ВД-БС – вирусная диарея болезни слизистых

ВНК-21/13 – перевиваемая клеточная культура почки сирийского хомячка;

ВСЖ – вируссодержащая культуральная жидкость

ГА-активность – гемагглютинирующая активность

ГОА – гидроокиси алюминия

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИРТ – инфекционный ринотрахеит

ИПВ – инфекционный пустулезный вульвовагинит

ИФА – иммуноферментный анализ

КББ – карбонатно-бикарбонатный буфер

КК – культура клеток

КРС – крупный рогатый скот

КЭ – куриный эмбрион

ЛЭК – легкие эмбриона коровы

MDBK – культура перевиваемых клеток почки эмбриона коровы

МЛА – масляный-ланолиновый адьювант

МПА – мясопептонный агар

МПБ – мясопептонный бульон

ПГ-3 – парагрипп-3

ПЭГ – полиэтиленгликоль

РИФ – реакция иммунофлюоресценции

РН – реакция нейтрализации

РНГА – реакция непрямой гемагглютинации

РСК – реакция связывания комплемента

РТГА – реакция торможения гемагглютинации

ТЦД₅₀ – цитопатогенный эффект 50 % зараженных культур клеток

TR – перевиваемая культура клеток трахеи эмбриона коровы

ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности - Всероссийский научно-исследовательский ветеринарный институт»

ФСБ – фосфатно-солевой буфер

ЦПД – цитопатическое действие

ISA-50 – масляный адьювант фирмы «Seppic», Франция

ISA-61 – масляный адьювант фирмы «Seppic», Франция

7. СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Алексеев, А.Д. Особенности проявления острых респираторных вирусных инфекций крупного рогатого скота в современных условиях / А.Д.Алексеев, О.Г. Петрова, Л.И. Дроздова // Аграрный вестник Урала. – 2015. – № 6. – С. 38-40.
2. Ананчиков, М. А. Роль хламидий в этиологической структуре заболеваемости крупного рогатого скота/ М.А. Ананчиков, Е.Л.Красникова, Е.С. Ткалич, О.И. Гордиевская, Ю.И. Тяпша // Экология и животный мир. – 2019. – №. 2. – С. 13-17.
3. Ахметсафин, Р.Г. Усовершенствование средств диагностики и специфической профилактики смешанных респираторных инфекций телят / Р.Г. Ахметсафин // Автореф. дис.кан. вет. наук.- Казань.- 2005.- 19 с.
4. Басова, Н.Ю. Респираторные болезни телят / Н.Ю. Басова // Ветринария сельскохозяйственных животных. – 2007. - №3. – С.57-61.
5. Барашкин, М. И. Профилактика острых респираторных заболеваний крупного рогатого скота при промышленных технологиях содержания / М.И. Барашкин, О.Г. Петрова // Ветеринария Кубани. – 2014. – №. 3. – С. 9-11.
6. Бакулов, И.А. Рекомендации по методике эпизоотологического исследования / И.А. Бакулов, Г.Г. Юрков, А.П. Песковецкий. – Покров,-1979. –75 с.
7. Бортничук, В.А. Выделение хламидий от сельскохозяйственных животных и их идентификация./ В.А. Бортничук, Г.Г. Попович // Микробиологический журнал. –1981. – Т.432. – С.183-187.
8. Брылин, А.П. Инновационное решение борьбы с инфекционным ринотрахеитом, вирусной диареи, парагриппом-3 и респираторно-синцитиальной инфекцией крупного рогатого скота // Ветеринария. – 2013. – №. 9. – С. 14-16.

9. Верховская, А.Е. Особенности диагностики и профилактики вирусной диареи крупного рогатого скота / А.Е. Верховская, В.А. Сергеев, Т.И.Алипер, Е.В. Иванов // Ветеринария. – 2009. – № 8. – С.3-7.

10. Верховская, А.Е. Разработка и оценка эффективности вакцин Комбовак-Р и Комбова-К : автореферат дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03 / Верховская Анна Евгеньевна. – Владимир, 2008. – 27 с.

11. Вялых, И.В. Основные подходы к профилактике и ликвидации вирусной диареи крупного рогатого скота / И.В. Вялых., Е.Н.Шилова // Эколого-биологические проблемы использования природных ресурсов в сельском хозяйстве: материалы международной научно-практической конференции молодых ученых и специалистов. Екатеринбург, –2016. – С. 114–116.

12. Волкова, В.В. Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота / В.В. Волкова, О.Г. Петрова // Молодежь и наука. – 2018. – №. 3. – С. 5-5.

13. Гаффаров, Х.З. Инфекционные болезни рогатого скота хламидийной, микоплазменной и вирусной этиологии: разработка диагностических и лечебно-профилактических препаратов: автореф. дис. ... д-ра вет. наук: 16.00.03. / Гаффаров Харрис Зарифович – Казань, 1986. – 39 с.

14. Гаффаров, Х.З. Моно- и смешанные инфекционные диареи новорожденных телят и поросят: монография / Х.З. Гаффаров, А.В. Иванов, Е.А. Непоклонов, А.З. Равилов // Казань: ФЭН, 2002. – С. 592.

15. Глотов, А.Г. Роль вируса инфекционного ринотрахеита в патологии воспроизводства крупного рогатого скота / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова // Ветеринария. – 2018. – №. 3. – С. 3-9.

16. Глотов, А. Г. Вспышка заболевания крупного рогатого скота, вызванная вирусом диареи второго вида / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, А.В. Нефедченко, О.В. Семенова // Ветеринария. – 2019. – №. 3. – С. 3-8.

17. Глотов А.Г. Вирусная диарея – болезнь слизистых оболочек крупного рогатого скота (историческая справка, характеристика возбудителя,

особенности эпизоотологии, клиническое проявление и экономическое значение): рекомендации / А. Г. Глотов, Т.И. Глотова, А.В. Нефедченко, Ю.Н. Зайцев, В.А. Качанов. - РАСХН, Сиб. отд. ГНУ ИЭВСиДВ, Новосибирск, 2006. – 28 с.

18. Глотов, А.Г. Эпизоотологическая ситуация по респираторно-синцитиальной инфекции крупного рогатого скота в хозяйствах по производству молока / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, С.В. Котенева [и др.] // Ветеринария. – 2010. - № 7. – С. 21-25.

19. Глотов, А.Г. Этиология бронхопневмоний крупного рогатого скота на молочных комплексах / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова, О.В. Семенова, К.В. Войтова // Ветеринария. – 2014. – № 4. – С. 7-11.

20. Глотова, А.Г., Глотова Т.И. Вирусная болезнь слизистых оболочек крупного рогатого скота / А.Г. Глотов, Т.И. Глотова // Ветеринария. – 2008. №. 6. – С. 56-60.

21. Гумеров В.Г. Диагностика и специфика профилакта респираторных и желудочно-кишечных инфекций крупного рогатого скота: автореферат на дис...док. вет. наук: 06.02.02. / Гумеров Вали Галиевич. – Казань, 2016. – 39 с.

22. Гумеров, В.Г. Сероиммунологический мониторинг респираторных и желудочно-кишечных инфекций крупного рогатого скота // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. НЭ Баумана. – 2015. – Т. 222. – №. 2. – С. 79-82

23. Гумеров, В.Г. Этиологическая структура возбудителей респираторных и желудочно -кишечных инфекций крупного рогатого скота // Ветеринарный врач. – 2015. №. 3. – С. 12-17.

24. Гумеров, В.Г. Эпизоотологический и серологический мониторинг смешанных респираторно-кишечных инфекций крупного рогатого скота / В.Г. Гумеров, В. В. Евстифеев, Х.Н. Мakaев, А.К. Галиуллин, И.Г. Каримуллина, М.Н. Коннов // Ученые записки Казанской государственной

академии ветеринарной медицины им. НЭ Баумана. – 2019. – Т. 237. – №. 1. – С. 56-60.

25. Гумеров В.Г. Сравнительное изучение эффективности ассоциированной вакцины против ПГ-3, ИРТ ихламидиоза крупного рогатого скота / В.Г. Гумеров // Материалы Международной научной конф. Посвященю 125-летию КГАВМ. Часть 1. Казань, 1998. – С. 34-36.

26. Гутова, М.О. Анализ эпизоотической ситуации при респираторных заболеваниях инфекционной этиологии крупного рогатого скота в сельскохозяйственных предприятиях нижегородской области и разработка их профилактики / М.О. Гутова, Д.С. Ульянова, О.Г. Петрова // Мир Инноваций. – 2017. – №. 1. – С. 21-25.

27. Данилова, И.С. Хламидиозы сельскохозяйственных животных/ И.С. Данилова, О.В. Обуховская // Ветеринарна медицина. – 2012. – №. 96. – С. 212-214.

28. Донник, И.М. Острые респираторные заболевания крупного рогатого скота и проблемы профилактики в современных условиях промышленного производства / И.М. Донник, О.Г. Петрова, С.А. Марковская // Аграрный вестник Урала. – 2013. – №. 10 (116). – С. 25-27

29. Думова, В.В. Распространение вируса парагриппа-3 крупного рогатого скота у жвачных животных / В.В. Думова, В.А. Мищенко, А.В. Мищенко, М.Ю. Киселев, О.Ю. Черных // Ветеринария Кубани. – 2012. – № 6. – С. 10-12.

30. Евстифеев, В.В. Усовершенствование инактивированной эмульсионной вакцины против хламидиоза рогатого скота / В.В. Евстифеев, Д.И. Нигматуллина, Ф.М. Хусаинов, Л.А. Барбара // Ветеринарный врач. – 2014. – №. 1. – С. 38-42.

31. Евстифеев В.В. Специфическая профилактика хламидиоза сельскохозяйственных животных / В.В. Евстифеев, Ф.М.Хусаинов, Л.А. Барбара // Труды Междунар. науч.- практич. конф., псвящ. 50-летию ВНИИВВиМ «Проблемы профилактики и борьбы с особо опасными,

экзотическими и малоизученными инфекционными болезнями животных». - Покров, 2008. - Т 2. - С. 240-242.

32. Евстифеев, В.В. Разработка и усовершенствование биологических препаратов для диагностики и специфической профилактики хламидиоза животных: автореферат. дис... д-ра. био. наук: 06.02.02. / Евстифеев Виталий Валерьевич. – Казань. 2015.г – 47 с.

33. Евстифеев, В.В. Усовершенствование средств специфической профилактики хламидиоза крупного рогатого скота / В.В. Евстифеев // Достижения науки и техники АПК. – 2015. – Т. 29. – №. 3. – С. 54-55.

34. Евстифеев, В. В. Вирусная диарея-болезнь слизистых оболочек крупного рогатого скота / В.В. Евстифеев, М.Н. Коннов, Ф.М. Хусаинов, Г.И. Хусаинова, И.Р. Акбашев // Ветеринария. – 2019. – №. 10. – С. 19-25.

35. Елетина, О. С. и др. Оценка эпизоотической ситуации в условиях среднего Поволжья // Вестник Нижегородской государственной сельскохозяйственной академии. – 2018. – №. 3. – С. 28-32.

36. Елисеев, А.К. Инфекционная активность вируса парагриппа-3 в процессе хранения при различных температурах/ А.К Елисеев // Актуальные вопросы ветеринарной вирусологии (тезисы докладов научно-практической конференции молодых ученых). Владимир. 1990. –С.41-42.

37. Жидков, С.А. Вирусная диарея крупного рогатого скота / С.А. Жидков // Ветеринария. – 1989. – № 3. – С. 41-42.

38. Жидков С.А. Роль вирусной диареи в этиологии респираторных и желудочно-кишечных болезней телят / С.А. Жидков, А.И. Лебедев, М.М. Гоголев [и др.] // Вестн. Российской акад.сельскохозяйственных наук.1995. – №3. - С.50-53.

39. Зайцев, Ю.Н. Особенности проявления ассоциированных инфекций телят, обусловленных вирусами вирусной диареи, инфекционного ринотрахеита и бактерий рода *Pasteurella*: автореф. дис. ... канд. вет. наук: 16.00.03 / Зайцев Юрий Николаевич. – Новосибирск, 2007. – 17 с.

40. Закутский, Н.И. Опыт профилактики и борьбы с инфекционным ринотрахеитом (ИРТ) и парагриппа-3 (ПГ-3) крупного рогатого скота / Н.И. Закутский, В.И. Жестерев, Л.Д. Конакова и др. // Диагн., профилактика имеры борьбы с особо опасными, экзотич. и зооантропоноз. болезнями ж-ных. –Сб. статей Междунар. науч.-практ. конф., Покров, 2000. – С. 60-62.
41. Закирова, С.В. Профилактика и лечение инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота / С.В. Закирова, И.В. Маслеников, Е.В. Паньков // АгроЭкоИнфо. – 2018. – №. 4. – С. 40-40.
42. Закирова, С.В. Мониторинг массовых вирусных болезней крупного рогатого скота на территории Удмуртской Республики / С.В. Закирова, И.В. Маслеников, Е.В. Паньков // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2019. – №. 12. – С. 32-41.
43. Зоткин, Г. В. Проявление эпизоотического процесса при микст-инфекции ИРТ и ПГ-3 крупного рогатого скота /Г.В. Зоткин, З.Я. Косорлукова, И.В. Яшин, Н.А. Гладкова, П.И Блохин // Вопросы нормативно-правового регулирования в ветеринарии. – 2014. – №. 2. – С. 72-74.
44. Имбаби, Т. Профилактика инфекционного ринотрахеита и парагриппа-3 крупного рогатого скота / Т. Имбаби //роль инноваций в трансформации современной. – 2017. – 43 с.
45. Караваев, Ю.Д. Вакцинопрофилактика хламидиозного аборта овец / Ю.Д. Караваев, Н.И. Налетов // Тр. ВИЭВ. – 1981. –№. 53. – 95 с.
46. Каримуллина И. Г. Оптимизация технологии культивирования вирусов парагриппа-3, инфекционного ринотрахеита и хламидий при разработке ассоциированной вакцины : дис. – Б. м. : Всерос. н.-и. вет. ин-т, 2004.
47. Клепцина, А.В. Парамиксовирусные инфекции крупного рогатого скота. Патогенез и диагностика (обзор) /А.В. Клепцина, А.П. Порываева //БИО. – 2019. – №. 1. – С. 30-34.

48. Клепцина, А.В. Парагрипп типа 3 крупного рогатого скота. Этиология, клиника, лабораторная диагностика (обзор литературы) //эколого-биологические проблемы использования природных ресурсов в сельском хозяйстве. – 2018. – С. 202-208.
49. Ковалев, В.Л. Пневмоэнтериты молодняка крупного рогатого скота в контексте ведения животноводства в крыму / В.Л. Ковалев //Труды Крымской Академии наук. – 2019. – С. 91-96.
50. Кольберг, Н.А. Анализ эпизоотической ситуации при респираторных заболеваниях крупного рогатого скота инфекционной этиологии в предприятиях Уральского региона / Н.А. Кольберг, О.Г. Петрова, С.А. Марковская // Аграрная наука Евро-Северо-Востока. – 2013. – №. 6 (37).– С. 46-51
51. Конопаткин, А.А. Эпизоотологические проблемы смешанных инфекций в современном животноводстве / А.А. Конопаткин // Патология органов дыхания и пищеварения сельскохозяйственных животных. М.: Изд-во МВ А, - 1983. - С. 3-9.
52. Концевая, Н.Н. Разработка вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной-диареи, рота-, коронавирусной болезней и leptospiroza крупного рогатого скота. дис... кан. вет. наук: 06.02.02. /Концевая Наталья Николаевна. – Москва. 2016.г – 147с.
53. Костыркин, Ю.А. Эффективность инактивированной вакцины при факторных респираторных болезнях телят / Ю.А. Костыркин, В.А. мищенко, В.В. Думова, В.В. Лисицын, Т.Б. Никешина, О.В.Кухаркина А.В. кононов // Ветеринарная патология. – 2005. –№.3. – С. 72-75
54. Красиков, А.П. Ассоциативные инфекционные болезни телят: монография / А.П. Красиков, В.И. Афанасенко. - Омск: Изд-во ФГОУ ВПООмГАУ, 2008. – 275 с.
55. Красиков, А.П. Комплексная диагностика инфекционных болезней крупного рогатого скота / А.П. Красиков, И.Г. Алексеева

//Электронный научно-методический журнал Омского ГАУ. – 2015. – №. 1 (1). – С.53-59.

56. Красочко, П.А. Анализ степени инфицированности крупного рогатого скота и овец вирусами парагриппа-3 и диареи / П.А. Красочко, Т.П. Помирко // Современные аспекты профилактики инфекционных болезней молодняка, Кишинев 1989. – С. 52-55.

57. Кротов, С.А. Хламидиозы: эпидемиология, характеристика возбудителя, методы лабораторной диагностики, лечение генитальной хламидиоза. / С.А. Кротов, В.А. кротова, С.Ю. Юрьева. Методическое пособие для врачей. – Новосибирск, 1997. – 62 с.

58. Крысенко, Ю.Г Клинико-эпизоотологические особенности и специфическая профилактика хламидиоза и смешанных респираторных инфекций крупного рогатого скота в Удмуртской Республике : автореферат дис. ... канд. вет. наук : 03.00.07, 16.00.03 / Крысенко Юрий Гаврилович - Казань, 2003. –22 с.

59. Курбонбекова, З.Д. Эпизоотическая ситуация по респираторно-кишечным болезням молодняка крупного и мелкого рогатого скота в центральных районах Таджикистана: Автореф. дис. . канд. вет. наук. М., 2007. – 20 с.

60. Курбанов, И.А. Диагностика и меры борьбы и профилактика хламидийныхabortов крупного рогатого скота / И.А. Курбанов, Ф.З. Авзалов, Л.Ф. Лабутина [и др.] – Казань, –1982. –29 с.

61. Лукьянова, И.А. Клинико-патоморфологические особенности течения вирусно-бактериальных респираторно-кишечных инфекций у телят / И.А. Лукьянова, Т.В. Ермакова, В.И. Плещакова // Вестник Алтайского государственного аграрного университета, 2012. - № 4 (90). – С. 49-51.

62. Лягина, Е.А. Хламидийная инфекция КРС–угроза воспроизводству стада / Е.А. Лягина, В.С. Маланина, Н.Ю. Терентьева // Международный студенческий научный вестник. – 2016. – №. 4-3. – С. 331-332.

63. Манжурина, О.А Эtiологическая структура пневмоэнтеритов телят в хозяйствах центрального региона Российской Федерации / О.А. Манжурина, Ю.С. Пархоменко, И.С. Перепелкина и др // Ветеринарный фармакологический вестник, 2020 - №1 (10). – С. 96-100.

64. Мильштейн, И.М. Роль хламидий крупного рогатого скота при болезнях легких / И.М. Мильштейн, О.Г. Петрова // Ветеринария сельскохозяйственных животных. – 2016. – №. 10. – С. 32-38.

65. Митрофанов, П.М. Клиника и патогенез хламидиоза. — Ветеринария – 1980. – № 6. – С. 37-39.

66. Митрофанов, П.М., Гомбоев, Д.Д. Генитальный хламидиоз быков-производителей и меры борьбы с ним. Метод, реком.: - Новосибирск, 1986. –40 с.

67. Митрофанов, П.М. Хламидиоз крупного рогатого скота и меры борьбы с ним / П.М. Митрофанов, В.А. Семенова, Р.Х. Хамадеев – Чебоксары: РИЦ «Гранит», 2001. – 54с.

68. Мищенко, В.А. Смешанное течение респираторных инфекций у молодняка КРС / В.А. Мищенко, А.М. Рахманов // Акт. проблемы патологии сельскохозяйственных животных. – Минск – 2003. – С. 186-188.

69. Мищенко, В.А. Особенности массовых ассоциированных респираторных заболеваний взрослого КРС / В.А .Мищенко, В.В. Думова, О.Ю. Черных // Ветеринария Кубани. – 2011. – №. 3. – С. 13-15.

70. Мищенко, В.А. Проблема респираторной патологии новорожденных телят / В.А. Мищенко, А.В. Мищенко, О.В. Черных // Ветеринария Кубани. – 2013. – № 6. – С. 19-20.

71. Мищенко, В.А. Распространение вируса инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота у жвачных животных / В.А. Мищенко, В.В. Думова, М.Ю. Киселев, А.А. Нестеров, А.В. Мищенко, И.Н. Бакунов // Ветеринария. –2011. - № 9. – С. 22-25.

72. Мищенко, В.А. Проблема респираторных смешанных инфекций молодняка крупного рогатого скота / В.А. Мищенко // Матер. межд. науч.

конф «Актуальные проблемы инфекционной патологии животных» 30-31 октября. – Владимир. – 2003. – С.73-77.

73. Мищенко, В.А. Ассоциативное течение респираторных инфекций у молодняка КРС / В.А. Мищенко., А.М. Рахманов., П.К. Аянов //Зб. наук. праць Луганського держ. аграр. ун-ту. – 2003. – №. 27/39. – С. 374-378.

74. Мищенко, В.А. Особенности вакцинопрофилактики инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота / В. А. Мищенко, В.В. Лисицын, Ю.А. Костыркин, Ю.Е. Ручнов, О.И. Гетманский // Матер. межд. науч. конф «Актуальные проблемы инфекционной патологии животных» 30-31 октября. – Владимир. – 2003. – С. 82-84.

75. Мищенко, В.А. Эпизоотический мониторинг парагриппа-3 крупного рогатого скота / В.А. Мищенко, Н.А Яремченко, О.И. Сухорев, Ю.Е. Ручнов, О.И. Гетманский // Ветеринария. – 2000. – №. 9. – С. 5-6.

76. Морозов, А.Г. Эффективность способа профилактики вирусных кишечных и острых респираторных (ОРВИ) инфекций молодняка крупного рогатого скота / А.Г. Морозов, А.А. Грицын // Ветеринарная патология. – 2011. – №. 1-2. – С. 49-52.

77. Музычин, С.И. Выделение и изучение некоторых свойств вируса парагриппа крупного рогатого скота / С.И. Музычин, В.А. Летецкий // Ветеринарная наука производству. – 1988. – Т. 26. – С. 3-7.

78. Наumenkov, B.I. Изучение взаимодействия вируса парагриппа-3 с бактериями / В.И Наumenkov // Современные аспекты профилактики инфекционных болезней молодняка, Кишинев. 1989. – С.46-48.

79. Осянин, К.А. Мультиплексная ПЦР для индикации и дифференциации возбудителей респираторных вирусных инфекций крупного рогатого скота / Осянин К.А, Р.Р. Лартон, А.М. Алимов, Т.Х. Фаизов // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. 2020. – Т. 244. – № 4. – С. 111-115.

80. Петрова, О.Г. Меры профилактики и борьбы с острыми респираторными заболеваниями крупного рогатого скота в племенных

хозяйствах / О.Г. Петрова, Ю.А. Кирсанов, В.С. Мымрин // Аграрный вестник Урала.– 2011. - №2. – С. 18-19.

81. Петрова, О. Г. Острые респираторные заболевания крупного рогатого скот / О.Г. Петрова, И. А. Рубинский // Москва.- изд. «Лит. Рес.».- 2012. – 370 с.

82. Петрова, О.Г. Острые респираторные заболевания крупного рогатого скота и проблемы профилактики на региональном уровне /О.Г. Петрова, М.И. Барашкин //Аграрный вестник Урала. – 2014. – №. 6. – С. 40-42.

83. Петрова, О.Г. Распространение респираторных заболеваний у крупного рогатого скота и наносимый экономический ущерб / О.Г. Петрова, А.Д. Алексеев // Аграрное образование и наука. – 2015. – №. 1. – С. 10.

84. Петрова, О.Г. Обоснование тактических особенностей профилактики ОРВИ крупного рогатого скота при промышленных технологиях содержания / О.Г. Петрова, М.И. Барашкин // Аграрный вестник Урала. – 2014. – №.11. – С.32-35.

85. Петрова, О.Г. Эпизоотологический мониторинг респираторных заболеваний у крупного рогатого скота и наносимый экономический ущерб / О.Г. Петрова, М.И. Барашкин, И.М. Мильштейн //Теория и практика мировой науки. – 2020. – №. 4. – С. 53-57.

86. Племяшов К.В. Хламидиоз крупного рогатого скота в племенных хозяйствах / К.В. Племяшков, А.А. Крутикова //Ветеринария. – 2018. – №. 6. – С. 28-30.

87. Пирюшова, А.Н. Инфекционный ринотрахеит КРС / А.Н. Пирюшко., Ю.А. Журавкова //Актуальные проблемы инфекционной патологии и биотехнологии: материалы VIII Международной студенческой научной конференции. 22-23 апреля 2015 г.-Ульяновск: УГСХА им. ПА Столыпина, 2015.-Том I. – УГСХА им. ПА Столыпина, 2015. С. – 243-251

88. Пчельников, А.В. Анализ рисков заноса ИРТ на территорию России с импортным скотом / А.В. Пчельников, С.В. Алекссенкова, К.П. Юров // Ветеринария и кормление. – 2019. – №. 3. – С. 38-40.
89. Равилов, А.З. Хламидиоз животных. / А.З. Равилов, Х.З. Гаффаров, Р.Х. Равилов – Казань: Изд-во «Фэн», 2004. – 368 с.
90. Решетников, Т.И. Этиология респираторной патологии сельскохозяйственных животных в условиях промышленного содержания / Т.И. Решетников // Научно обоснованные технологии интенсификации сельскохозяйственного производства: материалы Международной научно-практической конференции. 14-17 февраля 2017 года, г. Ижевск. В 3 т. – Ижевск: ФГБОУ ВО Ижевская ГСХА, 2017. –303 с. – 2017. – С.47
91. Садиков, В.Е. Профилактика инфекционных болезней крупного рогатого скота / В.Е. Садиков – Москва: Россельхозиздат, 1982. – 175с.
92. Семенова, О.В. Особенность циркуляции BVDV и его этиологическая роль в репродуктивных проблемах крупного рогатого скота в молочно-товарных хозяйствах закрытого типа / О.В. Семенова, С.В. Котенова, Т.И. Глотова, А.Г. Глотов //Российский ветеринарный журнал. – 2017. – №. 7. – С. 9-12
93. Сергеев, О.В Иммунобиологические и патогенетические особенности вирусной диареи крупного рогатого скота / О.В. Сергеев // Ветеринария с/х животных. –2011. –№5. – С.16-21.
94. Синицина, И.В. Диагностика, лечение, профилактика и меры борьбы с желудочно-кишечными болезнями молодняка крупного рогатого скота: рекомендации / И.В. Синицина, П.А. Кросочки, Н.Г. Гравиченко и др. / - Витебск: ВГАВМ, 2019. – 68 с.
95. Сисягина, Е.П. Методы профилактики респираторных болезней телят / Е.П. Сисягина, Г.Р. Реджепова, Ю.Б. Юлдашев, И.В. Убитина // Главные эпизоотологические параметры популяции животных. – 2015. – С. 112-117.

96. Сухарев, О.И. Особенности проявления инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота / О.И Сухарев, В.В, Гугенков, В.В. Сюрин // Вестник сельскохозяйственной науки. – 1981. – №.2. – С. 7-12.
97. Схатум, А.К. Этиологическая структура респираторных болезней молодняка крупного рогатого скота вирусной этиологии / А.К. Стакум //Международный научно-исследовательский журнал. – 2016. – №. 3-3 (45). – С. 42-44.
98. Сюрин, В.Н. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин и др.- М.: ВНИТИБП, 1998. – 928 с.
99. Ульянов, Д.С. Инфекционный ринотрахеит крупного рогатого скота / Д.С. Ульянов, О.Г. Петрова //Вестник биотехнологии. – 2017. – №. 4. – С. 5-5.
100. Фомченко, И.В. Некоторые эпизоогологические данные хламидиоза крупного рогатого скота / И.В. Фомиченко //Ученые записки Витебской академии нет, медицины. Витебск, 1998. Т. 38. – С. 176–178.
101. Фомченко, И. В. Проявление хламидиозного эндометрита у крупного рогатого скота. / И.В. Фомиченко // Ученые записки Витебской государственной академии ветеринарной медицины. Витебск, 2008, Т. 44, вып. 2, ч. 1. – С. 125-128.
102. Хазипов Н.З. Хламидиозы сельскохозяйственных животных / Н.З. Хазипов., А.З. Равилов // М.: Колос.-1984. – 223с.
103. Хамадеев, Р.Х. Методы лабораторной диагностики / Р.Х. Хамадеев // Хламидиозы сельскохозяйственных животных. – М., «Колос». – 1984. – С. 152-193.
104. Хамадеев, Р.Х. Хламидиозы рогатого скота и свиней: автореф. дис. докт. вет. наук: 16.00.03 / Хамадеев Рифнур Хазиевич – Казань, 1991. - 40 с.
105. Хамадеев Р.Х. Основные факторы эпизоотического процесса и разработка средств специфической профилактики хламидиоза /

Р.Х.Хамадеев, Ф.М. Хусаинов, В.В, Евстифеев, Л.А. Барбарова, А.З. Равилов // Ж. Сельхоз. биол. – 2004. – №.6. – С. 70-77.

106. Хакимова, Э. Н. Меры профилактики и борьбы с острыми респираторными заболеваниями КРС и обоснование иммунокоррекции / Хакимова Э.Н. //Молодежь и наука. – 2017. – №. 4.1. – С. 64-64.

107. Хакимова, Д. Р. Клинический случай: острые респираторные заболевания крупного рогатого скота / Хакимова Д.Р. //Консервативное и хирургическое лечение распространенных заболеваний животных. – 2020. – С. 74-77.

108. Хусаинов, Ф.М. Иммунобиологические свойства хламидий, разработка и усовершенствование средств лабораторной диагностики и специфической профилактики хламидиозов сельскохозяйственных животных: дис. ... докт. вет. наук: 16.00.03. / Хусаинов Фидаиль Миннигалеевич. – Казань, 2007. – 323 с.

109. Черницкий, А. Е. Методическое пособие по прогнозированию и ранней диагностике респираторных болезней у телят / ГНУ ВНИВИПФиТ. – Воронеж: издательство «Истоки», 2013. – 48 с.

110. Шабунин, С.В. Бактериальные и вирусные инфекции в патологии воспроизводительной функции у коров / С.В. Шабунин, А.Г. Шахов, А.Г. Нежданов // Ветеринария. 2012. – № 10. – С. 3-8.

111. Шарабрин, И.Г. Методические указания по комплексной диспансеризации крупного рогатого скота //И.Г.Шарабрин, М.Х. Шайхаманов., И.П. Кондрахин – М.: Агропром СССР. 1988. –34 с.

112. Шахов, А.Г. Актуальные проблемы болезней молодняка в современных условиях / Шахов А.Г. // Ветеринарная патология. – 2003. – №. 2. – С.6-7.

113. Шилова, Е.Н. Острые респираторные вирусные болезни крупного рогатого скота / Е.Н. Шилова, Е.В. Печура, О.Г. Петрова, К.П. Юров // БИО. – 2019. – №. 4. – С. 30-33.

114. Шилова, Е.Н. Клиническое проявление инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота в племенных организациях уральского региона / Е.Н. Шилова, И.М. Донник, М.В. Ряпосова // Аграрный вестник Урала. – 2011. – №. 6. – С. 24-25

115. Юров, К.П. Вакцина «ТРИВАК» против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи - болезни слизистых оболочек и парагриппа-3 крупного рогатого скота / К.П Юров, А.Ф. Шуляк, А.Г. Глотов, В.И. Заерко // Ветеринария. – 2015. – № 12. – С. 17-21.

116. Юров, Г.К. Антигенные свойства нецитопатогенных штаммов вируса диареи КРС / Г.К. Юров, С.В. Алексеенкова, К.А. Диас Хименес, М.П. Неустроев, К.П. Юров / РВЖ. СХЖ. – 2013. – № 2. – С. 24-26.

117. Ackermann, M. Round table on infectious bovine rhinotracheitis / infectious pustular vulvovaginitis virus infection diagnosis and control / M. Ackermann, S. Belak, V. Bitsch // Veter. Microbiol. - 1990.- V.23.- №114.-P. 361-363.

118. Al-Hammadi M. A. Serological Surveillance of Infectious Bovine Rhinotracheitis virus, Bovine viral diarrhea virus and Bovine Parainfluenza-3 virus in Saudi Arabia //Alexandria Journal for Veterinary Sciences. – 2016. – Т. 51. – №. 1.

119. Anderews A.H. Respiratory disease / A.H. Andrews, R. Blowey, H. Boyd // Bovine Medicine: Disease and Husbandry of Cattle / R. Eddy (eds). - Blackwell Scientific Publications; Oxford. - 2004. - P. 286- 293.

120. Asmare K. et al. Serological evidence of Bovine herpesvirus-1, Bovine Viral Diarrhea virus and Schmallenberg virus infections in relation to reproductive disorders in dairy cattle in Ethiopia //Acta tropica. – 2018. – Т. 178. – P. 236-241.

121. Babi Y. The Chlamydia and its identification // Livestok Adsiver.- 1987, 12.- P.41

122. Baccili C. C. et al. Immune response in holstein calves vaccinated at six months of age //Acta Scientiae Veterinariae. – 2015. – Т. 43. – P. 1310.

123. Baker J.C. The clinical manifestations of bovine viral diarrhea infection / J.C. Baker // Veterinary Clinical of North America Food Animal Practice. - 1995. - Vol. 11. - P. 425-445.
124. Barati S. et al. The role of zoonotic chlamydial agents in ruminants abortion //Iranian Journal of Microbiology. – 2017. – T. 9. – №. 5. – C. 288.
125. Benavides B. et al. Development of a quantitative risk assessment of bovine viral diarrhea virus and bovine herpesvirus-1 introduction in dairy cattle herds to improve biosecurity //Journal of dairy science. – 2020. – T. 103. – №. 7. – P. 6454-6472.
126. Booth, R.E. A phylogenetic analysis of Bovine Viral Diarrhoea Virus (BVDV) isolates from six different regions of the UK and links to animal movement data / R.E. Booth et al. // Veterinary Research. — 2013. —Vol. 44. — pp. 43-57.
127. Brok K.V. Diagnosis of bovine viral diarrhea virus infection// Vet. Clin.N. Am. Food Anim. Pract.-1995.-V.ll.-P.549-561.
128. Brownline J.,Nobiron II,Thompson I.,Collins M.E. Bovine virus (BVDV). Pathogenesis and vaccines.||2nd Int.Vet.Vaccines and Diagn.conf.- Oxford, 2000.-P.39.
129. Caldow, G., Geraghty T., Mason C., Carty H. , Wilson D. Bovine herpesvirus 1 infection in cattle: a discussion on vaccination and control // Livestock. 2018. Vol. 23. No. 3. Pp. 110–115.
130. Chen C. et al. Evaluation of protection against bovine viral diarrhea virus type 2 after vaccination of the calves with bovine viral diarrhea virus type 1 combo inactivated vaccine //Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. – 2020. – T. 72. – №. 3. – P. 655-663.
131. Deregt D. Bovine viral diarrhea virus: biotypes and disease / D. Deregt, K.G. Loewen // Can. Vet. J. – 1995. – Vol. 36(6). – P. 71-78.
132. Durham, P.J.K. Prevalence of antibodies to infectious bovine rhinotracheitis, parainfuenza-3, bovine respiratory syncytial, and bovine viral

diarrhea viruses in 238 cattle in Saskatchewan and Alberta / P.J.K. Durham, L.E. Hassard // J. Canad. Vet. –1990. –v. 31. – P. 815-820.

133. Donachie W. Bacteriology of bovine respiratory disease / W. Donachie // Cattle Practice. – 2000. – Vol. 8. – P. 5-7.

134. El-Bagoury G. F. et al. Antibody responses by calves after vaccination with commercial and enhancedpotency inactivated pneumo-3 vaccines //Benha Veterinary Medical Journal. – 2015. – T. 28. – №. 1. – P. 247-254.

135. Fulton R. W. et al. Bovine herpesvirus-1: Genetic diversity of field strains from cattle with respiratory disease, genital, fetal disease and systemic neonatal disease and their relationship to vaccine strains //Virus research. – 2016. – T. 223. – P. 115-121.

136. Gham A., Reddy P.G., Morrill J.L. et al. Bovine herpesvirus-1 and parainfluenza-3 virus interactions: clinical and immunological response in calves.||Canad.J. of Vet.Res.-1989.V.53.1.-P.62-67.

137. Gham A. Neutralizing antibodies to bovine herpesvirus 1 (BHV - 1) and bovine parainfluenza - 3 (PI - 3) viruses in cattle in Tunisia Arch. / A. Gham, H.C. Minocha // Inst. Pasteur. Tunis. - 1990. - Vol. 67. - № 1-2. - p. 25-31.

138. Gupta P. K. Bovine Herpesvirus //Recent Advances in Animal Virology. – 2019. – P. 37.

139. Hage J.J. Population dynamics of bovine herpesvirus 1 infection in a dairy herd / J.J. Hage, Y.H. Schukken, H.W. Barkema et al. // Vet. Microbiol. - 1996.- Vol. 53, № 1-2. P. 1690 - 1800.

140. Houe H. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhoea (BVDV) infections / H.Houe // Veter. Microbiol.- 1999.- Vol. 64, №2/3. – P. 89-107.

141. Huch R.A., Miller P.L., Ross A., Evans D.N., Stablis J.W. Rinoposthitis associated with infections bovine rhinotraheitis (infections postular vulvovaginitis IBR-IPV) virus in a Itud of bulles. // Vet. Rec. - 1971. - Vol. 88. - № 12. - P. 292-297.

142. Jericho K. W. Pneumonia in calves produced with aerosols of bovine herpesvirus-1 and *Pasteurella haemolytica* / K.W. Jericho, E.V. Langford // Can. J. Comp. Med. 1978. - №42. - P. 269-277.
143. Kästner J., Saluz H. P., Hänel F. Identification of in vivo-induced bacterial protein antigens during calf infection with chlamydia psittaci //International Journal of Medical Microbiology. – 2015. – T. 305. – №. 3. – P. 310-321.
144. Kaur G., Chandra M. Herpesvirus in Bovines: Importance of Bovine Herpesvirus Type 1 //Herpesviridae. – 2016. – C. 219.
145. . Kapil S. Infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza-3, and respiratory coronavirus / S. Kapil, R.J. Basaraba // Vet Clin North Am Food Anim Pract. – 1997. – Vol. 13, № 3. – P. 455–69.
146. Klatt, E. Serologisch diagnostische Untersuchungen zur Beteiligung der bovinen Corona-, Parvo-, Rota-, BVD-, Parainfluenzavirus Typ 3- und IBR/IRVVirusinfektionen bei der Rindergruppe / E. Klatt // Diss. Giessen. - 1988. - 84 p.
147. Kovacs B., Belalc S., Varga J. Parainfluenza-3 virus oktani szerepe egy gazdasag borjainak legzoszervi megbetege-desciben.-Magyar allatorv.Lapja, 1983,B.3 8,1 , -s. 14-17.
148. Kuo C. C. et al. Chlamydia //Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria. – 2015. – P. 1-28.
149. Kuotsu K., Kuotsu N., Kipu K. Bovine herpes virus-1 (BoHV-1) in cattle-a review with emphasis on epidemiological parameters influencing the prevalence of bovine herpes virus-1 in cattle in India. – 2019.
150. Li J. et al. Chlamydia pecorum is the endemic intestinal species in cattle while *C. gallinacea*, *C. psittaci* and *C. pneumoniae* associate with sporadic systemic infection //Veterinary microbiology. – 2016. – T. 193. – P. 93-99.
151. Lindberg A.L.E. Bovine viral diarrhea virus infections and its control. A review / A.L.E. Lindberg // Veterinary Quarterly. – 2003. – Vol. 5, № 1. – P. 1-16.

152. Ludwig H., Gregersen J.P. Infectious bovine rhinotracheitis infectious pustular vulvovaginitis: BHV-1 infection // Rev. Sci. et Techn. Off. Int. Epizoot. - 1986. - Vol. 5, № 4. - P. 869 - 878.
153. Mao L. et al. Primary surveys on molecular epidemiology of bovine viral diarrhea virus 1 infecting goats in Jiangsu province, China //BMC Veterinary Research. – 2016. – T. 12. – №. 1. – P. 1-8.
154. Moennig V., Becher P. Control of bovine viral diarrhea //Pathogens. – 2018. – T. 7. – №. 1. – P. 29.
155. Nettleton P., Russell G. Update on infectious bovine rhinotracheitis //In Practice. – 2017. – T. 39. – №. 6. – P. 255-272.
156. Newcomer B. W., Chamorro M. F., Walz P. H. Vaccination of cattle against bovine viral diarrhea virus //Veterinary microbiology. – 2017. – T. 206. – P. 78-83.
157. Newcomer B. W., Givens D. Diagnosis and control of viral diseases of reproductive importance: infectious bovine rhinotracheitis and bovine viral diarrhea //Veterinary Clinics: Food Animal Practice. – 2016. – T. 32. – №. 2. – P. 425-441.
158. Perez-Martinez, J.A. Chlamydial infection in cattle / J. A. Perez-Martinez, J. Storz // P. 1. Mod. Vet. Pract. - 1985. - V. 66. - № 8. - P. 17-522.
159. Perino L.J. Bovine respiratory disease / L.J. Perino, M.Apley // Current Veterinary Therapy / J.L. Howard, A.Smith (eds). W.B. Saunders, Philadelphia.- 1999. – P. 446-455.
160. Queiroz-Castro V. L. D. et al. Detection of bovine herpesvirus 1 in genital organs of naturally infected cows //Theriogenology. – 2019. – T. 130. – P. 125-129.
161. Radostits O.M. The control of infectious disease of the respiratory and digestive tract of cattle / O.M. Radostits // Can. Vet. J. – 1991. – Vol. 21. – P. 111-114.

162. Rago C. Infectious bovine rhinotracheitis, parainfluenza-3, and respiratory Coronavirus / C. Rago // Vet. Clin. iMorth. Am. Food Anim. Pract.- 1997 - Vol. 13, № 3. - P. 455-469.
163. Riley J. M. et al. Invited Review: Economic consequences of beef cow-calf disease mismanagement: Bovine viral diarrhea virus //Applied Animal Science. – 2019. – T. 35. – №. 6. – P. 606-614.
164. Rossi P. S. et al. The effect of bovine vaccines against respiratory viruses administered either intranasal or intramuscular on broncho-alveolar fluid cells of heifers //Veterinary Quarterly. – 2020. – P. 1-11.
165. Rypuła, K., Płoneczka-Janeczko, K., Kita, J., Kumala, A., & Żmudziński, J. F. Seroprevalence of BHV-1 (bovine herpesvirus type 1) among non-vaccinated dairy cattle herds with respiratory disorders / K. Rypuła [et al.] // Pol J Vet Sci. – 2012. – Vol. 15, № 3. – P. 561–563.
166. Schubach K., Cooke R. F., Brandao A., Schumaher T., Souza O., Bohnert D., Marques R. Altering the time of vaccination against respiratory pathogens enhanced antibody response and health of feedlot cattle // Journal of Animal Science. 2019. Vol. 97. No. 1. Pp. 39–40. DOI: 10.1093/jas/skz053.089.
167. Spilki F. R. 7 Bovine Parainfluenza Virus Type 3 //Mononegaviruses of Veterinary Importance: Molecular Epidemiology and Control. – 2016. – T. 2. – P. 98.
168. Straub O.C. Infectios bovine rhinotracheitis virus./ O.C. Straub //Virus Infectios of Rhinotracheitis. -Amsterdam, 1990.-V.9. – P.71-108.
169. Straub O.C. BHV1 infections: relevance and spread in Europe / O.C. Straub // Cotp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 1991, – № 14. – P. 175-186.
170. Theurer M. E., Larson R. L., White B. J. Systematic review and meta-analysis of the effectiveness of commercially available vaccines against bovine herpesvirus, bovine viral diarrhea virus, bovine respiratory syncytial virus, and parainfluenza type 3 virus for mitigation of bovine respiratory disease complex in cattle //Journal of the American Veterinary Medical Association. – 2015. – T. 246. – №. 1.

171. Villaamil F. J. et al. A survey of biosecurity measures and serological status for bovine viral diarrhoea virus and bovine herpesvirus 1 on dairy cattle farms in north-west and north-east Spain //Veterinary record open. – 2020. – T. 7. – №. 1. – P. e000399.
172. Walker E. et al. Chlamydia pecorum infections in sheep and cattle: a common and under-recognised infectious disease with significant impact on animal health //The Veterinary Journal. – 2015. – T. 206. – №. 3. – P. 252-260.
173. Walz P. H. et al. Evaluation of reproductive protection against bovine viral diarrhea virus and bovine herpesvirus-1 afforded by annual revaccination with modified-live viral or combination modified-live/killed viral vaccines after primary vaccination with modified-live viral vaccine //Vaccine. – 2017. – T. 35. – №. 7. – P. 1046-1054.
174. Walz P. H. et al. Comparison of reproductive protection against bovine viral diarrhea virus provided by multivalent viral vaccines containing inactivated fractions of bovine viral diarrhea virus 1 and 2 //Vaccine. – 2018. – T. 36. – №. 26. – P. 3853-3860.
175. Wheelhouse N., Longbottom D., Willoughby K. Chlamydia in cases of cattle pneumonia in Scotland //The Veterinary Record. – 2013. – T. 172. – №. 4. – P. 110.
176. Wheelhouse N., Longbottom D. Chlamydia-related organisms: infection in ruminants and potential for zoonotic transmission //Current Clinical Microbiology Reports. – 2015. – T. 2. – №. 1. – P. 1-9.
177. Wilson K. et al. Seroprevalence of chlamydial infection in cattle in Ireland //The Veterinary Journal. – 2012. – T. 193. – №. 2. – P. 583-585.
178. Zhang H. et al. Abortion and various associated risk factors in dairy cow and sheep in Ili, China //Plos one. – 2020. – T. 15. – №. 10. – C. e0232568.
179. Zhou Y. et al. Phylogenetic analysis and characterization of bovine herpesvirus-1 in cattle of China, 2016–2019 //Infection, Genetics and Evolution. – 2020. – C. 104416.

8. ПРИЛОЖЕНИЯ

УТВЕРЖДАЮ:

Зам директора по НИР

ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», д.б.н.

Чернов А.Н.

2015 г.



комиссионной проверки определения оптимальной прививочной дозы вакцины против ИРТ, ВД-БС, ПГ-З и хламидиоза крупного рогатого скота инактивированной эмульсионной на кроликах.

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе: зав. отделом биобезопасности профессора, Юсупов Р.Х. (председатель), зав. лаб. биотехнологии, в.н.с., к.в.н. Хузина Д.А. и исполнителей: в.н.с., к.в.н., Гумерова В.Г., зав. лаб., к.в.н. Евстифеева В.В., в.н.с., д.в.н. Хусаинова Ф.М. с.н.с., к.б.н. Каримуллиной И.Г., в.н.с., к.в.н. Барбаровой Л.А., м.н.с. Курбановой З.Б. и лаб. исследователь Акбашева И.Р. составили настоящий акт о комиссионном проведении определения оптимальной прививочной дозы ассоциированной инактивированной вакцины на лабораторных животных.

1. Объекты исследований

В работе, в качестве объектов исследований, использовали: вакцину против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и хламидиоза крупного рогатого скота инактивированную эмульсионную; кроликов, массой 2,5 – 3,0 кг.

2. Схема проведения опыта

По принципу аналогов были сформированы 3 опытные группы кроликов по 4 животных в каждой:

- 1-ая группа – кролики, вакцинированные в дозе 0,5 см³ подкожно;
- 2-ая группа – кролики, вакцинированные в дозе 1,0 см³;
- 3-ья группа – кролики, вакцинированные в дозе 2,0 см³;
- 4-ая группа – (контрольная) не вакцинированные животные.

Через 14 дней по 2 кролика из опытных групп ревакцинировали в вышеуказанных дозах.

Взятие крови у животных для серологических исследований проводили: перед вакцинацией, через 14 дней (ревакцинация), а также через 1 месяц после первого введения вакцины.

Следует также отметить, что самые низкие титры антител ко всем антигенам выявлены у однократно вакцинированных животных.

4. Заключение

На основании сравнительного анализа полученных результатов, была доказана целесообразность двукратной вакцинации животных ассоциированной вакциной против ПГ-3, ИРТ, ВД-БС и хламидиоза КРС, что значительно повышало уровень гуморальных антител в крови иммунизированных кроликов ко всем определяемым антигенам.

Наиболее высокие титры антител у вакцинированных кроликов ко всем четырем антигенам наблюдались при иммунизации в дозах 1,0 и 2,0 см³.

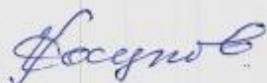
Таким образом, в ходе опыта было установлено, что оптимальными прививочными дозами, при вакцинации кроликов «Ассоциированной вакциной против ПГ-3, ИРТ, ВД-БС и хламидиоза крупного рогатого скота инактивированной эмульсионной», при подкожном введении, являются объемы препарата 1,0 см³ и 2,0 см³ при двукратном введении с интервалом 14 дней.

Подписи:

Председатель:

Зав. отделом биобезопасности,

профессор



Юсупов Р.Х.

Член комиссии:

Зав. лаб. биотехнологии, в.н.с., к.в.н.,



Хузин Д.А.

Исполнители:

В.н.с., к.в.н.

Гумеров В.Г.

Зав. лаб. к.в.н.

Евстифеев В.В.,

В.н.с., д.в.н.

Хусаинов Ф.М.

С.н.с., к.б.н.

Каримуллина И.Г.

В.н.с., к.в.н.

Барбарова Л.А.

М.н.с.

Курбанова З.Б.

Лаб. исследователь

Акбашев И.Р.

МИНСЕЛЬХОЗ РОССИИ
ДЕПАРТАМЕНТ НАУЧНО-ТЕХНОЛОГИЧЕСКОЙ
ПОЛИТИКИ И ОБРАЗОВАНИЯ
ФГБНУ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ,
РАДИАЦИОННОЙ и БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ЖИВОТНЫХ»

ПРИКАЗ

№ 29-п

От «20» 02 2017 г

«О проведении комиссионного испытания «Ассоциированной вакцины против ИРТ, ВД-БС, ПГ-3 и хламидиоза КРС инактивированной эмульсионной»

Согласно тематического плана НИР ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» на 2017 год в лаборатории вирусных и хламидийных инфекций запланировано проведение опыта по испытанию иммуногенности разработанной ранее «Ассоциированной вакцины против ИРТ, ВД-БС, ПГ-3 и хламидиоза КРС инактивированной эмульсионной». В связи с этим приказываю:

1. Создать комиссию в составе:
 - зам. директора по НИР ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» д.б.н. Чернова А.Н. (председатель);
 - зав. отделом биобезопасности ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ», д.в.н., профессора Макаева Х.Н.;
 - зав. лаб. биохимии, д.б.н., профессора Фаизова Т.Х.;
 - зав. лабораторией биотехнологии, д.б.н. Хузина Д.А.
2. Комиссионный опыт провести в период с 1 по 30 марта 2017 года в выварном корпусе №12;
3. Контроль за соблюдением санитарного режима во время проведения острого опыта с заражением животных вирулентными возбудителями возложить на зав. сектором ветеринарного режима Глухова К.Н.
4. Объектом исследования определить телят, иммунизированных «Ассоциированной вакциной против ИРТ, ВД-БС, ПГ-3 и хламидиоза КРС инактивированной эмульсионной» (Серия №4, Контроль №4, Дата изготовления: декабрь, 2016 г.), а также аналогичных интактных животных.

5. Испытание провести в соответствии с «Программой проведения опыта по изучению иммуногенности «Вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и хламидиоза крупного рогатого скота» утвержденной директором ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ».

6. Организацию и проведение комиссионных испытаний возложить на исполнителей рабочей программы зав. лабораторией №14 Евстифеева В.В., в.н.с. лаборатории №14 Гумерова В.Г., с.н.с. лаб. №14 Каримуллину И.Г., с.н.с. лаб. №14 Хусаинову Г.И., аспиранта лаб. №14 Акбашева И.Р.

7. Результаты испытаний обобщить и представить в виде акта.

8. Контроль за выполнением настоящего приказа возложить на зам. директора по НИР ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» Чернова А.Н.

Директор ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»

Никитин А.И.

СОГЛАСОВАНО
Зам. директора по НИР
ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»
Чернов А.Н.
«26» 02 2017 г.



ПРОГРАММА
проведения опыта по изучению иммуногенности «Ассоциированной вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и хламидиоза крупного рогатого скота инактивированной эмульсионной» на телятах.

Согласно приказа директора ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» № 29-п от «20» февраля 2017 года в виварном корпусе №12 с 1 по 30 марта планируется проведение комиссионного опыта по изучению антигенной и иммуногенной активностей «Ассоциированной вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и хламидиоза крупного рогатого скота инактивированной эмульсионной» на телятах.

Опыт будет включать в себя 4 последовательных этапа:

1. Подготовительный этап. Для проведения опыта в ООО «Среднее Девятое» Лайшевского р-на РТ будут отобраны 5 телят: 3 гол. – опытная группа и 2 гол. – контрольная группа. Животные опытной группы в 10-дневном возрасте будут привиты «Ассоциированной вакциной против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и хламидиоза крупного рогатого скота инактивированной эмульсионной» (Серия №4, Контроль №4, Дата изготовления: декабрь, 2016 г.) двукратно с интервалом 14 дней в дозе 1,0 см³.

Два контрольных телёнка вакцинироваться не будут.

В течение 30-45 дней после ревакцинации опытные и контрольные телята будут находиться в хозяйстве. По истечении этого срока все

серологическим реакциям между животными опытной и контрольной групп.

Также, по результатам опыта, планируется установить корреляцию между антигенной активностью и иммуногенностью испытуемой вакцины, что в дальнейшем позволит разработать методы лабораторного контроля производственных серий вакцины.

По окончании опыта и анализа полученных результатов будет составлен акт комиссионных испытаний.

Научный руководитель:

Зав. лабораторией вирусных
и хламидийных инфекций, д.б.н.



Евстифеев В.В.

Отв. исполнитель:

Вед. научный сотрудник лаб. вирусных
и хламидийных инфекций д.в.н.



Гумеров В.Г.

Исполнители:

С.н.с. лаб. вирусных
и хламид. инфекций к.б.н.



Каримуллина И.Г.

С.н.с. лаб. вирусных
и хламидийных инфекций к.б.н.



Хусаинова Г.И.

Аспирант лаб. вирусных
и хламидийных инфекций



Акбашев И.Р.

УТВЕРЖДАЮ:
Директор
ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»
Некитин А.И.
2017 г.



А К Т
комиссионной проверки иммуногенности «Ассоциированной вакцины
против ИРТ, ВД-БС, ПГ-3 и хламидиоза крупного рогатого скота
инактивированной эмульсионной» на телятах

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе: зам. директора по НИР, д.б.н. Чернова А.Н. (председатель), зав. отделом биобезопасности, профессора Макаева Х.Н., зав. лаб. биохимии, профессора Фаизова Т.Х., зав. лаб. биотехнологии, д.б.н. Хузина Д.А. и исполнителей: зав. лаб. вирусных и хламидийных инфекций, д.б.н., доцента Евстифеева В.В., в.н.с., д.в.н. Гумерова В.Г., с.н.с., к.б.н. Каримуллиной И.Г., с.н.с., к.б.н. Хусаиновой Г.И. и аспиранта Акбашева И.Р. составили настоящий акт о проведении комиссионной оценки иммуногенности «Ассоциированной вакцины против ИРТ, ВД-БС, ПГ-3 и хламидиоза крупного рогатого скота инактивированной эмульсионной» на телятах.

Вакцина была разработана в лаборатории вирусных и хламидийных инфекций отдела биобезопасности ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» в 2014-2017 годы, согласно тематического плана НИР Центра.

Для проведения опыта в ООО «Среднее Девятое» Лайшевского р-на РТ были отобраны 5 телят 10-дневного возраста. Клинический осмотр телят не выявил у них каких-либо патологий. Также, были взяты пробы сыворотки крови, для анализа на наличие антител к вирусам ИРТ, ВД-БС, ПГ-3 и хламидийному антигену, давшие отрицательный результат (см. Приложение, таблица №2).

После этого, телят разделили на 2 группы: 3 гол. – опытная группа и 2 гол. – контрольная группа. Животные опытной группы были привиты «Ассоциированной вакциной против ИРТ, ВД-БС, ПГ-3 и хламидиоза крупного рогатого скота инактивированной эмульсионной» (Серия №4, контроль №4, дата изготовления: 12. 2016 г.) двукратно с интервалом 14 дней в дозе 1,0 см³. Контрольных телят не вакцинировали.

Наблюдениями, проводимые за телятами после вакцинации, не установлено никаких отклонений от физиологической нормы. Местной реакции на введение вакцины у телят также не наблюдали.

В течение 27 дней после ревакцинации опытные и контрольные телята находились в хозяйстве, а затем – завезены в ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» и размещены в виварном помещении лаборатории вирусных и хламидийных инфекций.

«Ассоциированной вакцины против ИРТ, ВД-БС, ПГ-З и хламидиоза КРС инактивированной эмульсионной» телятам в дозе 1,0 см³ вызывает у них формирование высокого уровня специфических антител и способно защитить животных от развития экспериментальной вирусно-хламидийной инфекции, что указывает на высокую антигенную активность и иммуногенность испытуемого биопрепарата;

3. Сопоставление результатов изучения антигенной активности и иммуногенности вакцины позволяет сделать вывод, что если на 30 день после ревакцинации у телят формируется гуморальный иммунитет, в титрах, как минимум: в РСК с хламидийным антигеном - 1:10; к ПГ-З в РТГА – 1:1280; к ИРТ в ИФА – 1:1600 и к ВД в ИФА – 1:1600, то вакцина способна защитить вакцинированных животных от экспериментальной вирусно-хламидийной инфекции и, следовательно, является иммуногенной. Установление корреляции между антигенной активностью и иммуногенностью позволяет, в дальнейшем, судить о иммуногенности производственных серий вакцины по титрам постvakцинальных антител, не прибегая к контрольному заражению.

Заключение

Таким образом, в результате комиссионного опыта, установлено, что «Ассоциированная вакцина против ИРТ, ВД-БС, ПГ-З и хламидиоза КРС инактивированная эмульсионная» обладает высокой иммуногенностью.

Подписи:

Председатель:

Зам. директора по НИР ФГБНУ
«ФЦТРБ-ВНИВИ», д.б.н.



Чернов А.Н.

Члены комиссии:

Зав. отделом биобезопасности,
профессор



Макаев Х.Н.

Зав. лабораторией биохимии,
профессор



Фаизов Т.Х.

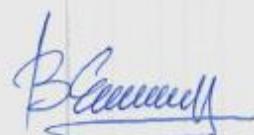
Зав. лабораторией биотехнологии,
д.б.н.



Хузин Д.А.

Исполнители:

Зав. лабораторией вирусных и
хламидийных инфекций, д.б.н.,
доцент



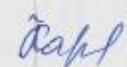
Евстифеев В.В.

В.н.с. лаборатории вирусных и
хламидийных инфекций, д.в.н.,



Гумеров В.Г.

С.н.с. лаборатории вирусных и
хламидийных инфекций, к.б.н.,



Каримуллина И.Г.

С.н.с. лаборатории вирусных и
хламидийных инфекций, к.б.н.,



Хусаинова Г.И.

Аспирант лаборатории вирусных и
хламидийных инфекций



Акбашев И.Р.

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Департамент научно-технологической политики и образования
ФГБУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и
биологической безопасности»
(ФГБУ «ФЦТРБ-ВНИИ»)



РАБОЧАЯ ПРОГРАММА
научно-исследовательской работы на 2015 год

Тема 3.2. Разработка и усовершенствование технологий изготовления вакцин нового поколения против бруцеллеза мелкого рогатого скота; ИРТ, ПГ-3, ВД-БС и хламидиоза крупного рогатого скота; анаэробной энтеротоксемии и эшерихиозной диареи телят.

Этап 3.2.1. Разработать вакцину против ИРТ, ВД-БС, ПГ-3 и хламидиоза крупного рогатого скота инактивированную.

Сроки выполнения: начало – январь 2015 года
окончание – декабрь 2015 года

Научный руководитель:
Зав. лаб. вирусологии и хламидийных
инфекций к.в.н.

Евстafeв В.В.

Казань – 2015 г

1

продолжение Приложение 5

ответственный исполнитель:

В.Н.С., К.В.Н.

В.Г. Гумеров

исполнители:

д.б.н., в.н.с.

Ф.М. Хусаинов

к.б.н., с.и.с.

И.Г. Каримуллина

в.н.с., к.в.н.

Л.А. Барброва

с.и.с., к.б.н.

А.И. Самсонов

с.и.с.

Д.И. Нигматуллина

м.н.с.

З. Б. Курбанова

лаб. исследователь

И.Р. Акбашев

СОГЛАСОВАНО:

Начальник Главного управления
ветеринарии КМ РТ


А.Г. ХИСАМУТДИНОВ
«15» июня 2016 г.

УТВЕРЖДАЮ:

Вр.и.о. директора
ФГБНУ «Федеральный центр
токсикологической, радиационной
и биологической безопасности»


А.И. НИКИТИН
«15» июня 2016 г.

ИНСТРУКЦИЯ

по применению вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной
диареи, парагриппа-3 и хламидиоза крупного рогатого скота
инактивированной эмульсионной

(Организация-разработчик: ФГБНУ «Федеральный центр
токсикологической, радиационной и биологической безопасности, г.Казань»)

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Торговое наименование: «Вакцина против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и хламидиоза крупного рогатого скота инактивированная эмульсионная».

Международное непатентованное наименование: «Вакцина против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и хламидиоза крупного рогатого скота инактивированная эмульсионная».

2. Лекарственная форма: эмульсия для инъекции. Вакцина изготовлена из инактивированных 0,2%-ным раствором формалина концентрированных антигенов вирусов инфекционного ринотрахеита штамм «ТК-А (ВИЭВ)-В2», вирусной диареи-болезни слизистых оболочек штамм «ВК-1», парагриппа-3 штамм «ПТК-45/86» и возбудителя хламидийного аборта коров штамм «250» эмульгированных в равных соотношениях в масляном адьюванте .

По внешнему виду вакцина представляет собой эмульсию светло-серого цвета. При длительном хранении допускается незначительное расслоение эмульсии, восстановливающейся при взбалтывании.