

**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

**АВТОРЕФЕРАТ**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата ветеринарных наук

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» (ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»), г. Казань

<b>Научный руководитель</b>	<b>Евстифеев Виталий Валерьевич</b> – доктор биологических наук, доцент
<b>Официальные оппоненты</b>	<b>Глотова Татьяна Ивановна</b> – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории биотехнологии - диагностический центр Института экспериментальной ветеринарии Сибири и Дальнего Востока СФНЦА РАН  <b>Еремец Владимир Иванович</b> – доктор биологических наук, профессор, зам. директора по научной работе и качеству ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности»
<b>Ведущее учреждение</b>	федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный центр охраны здоровья животных»

Защита диссертации состоится «17» июня 2021г. в 15<sup>00</sup> часов на заседании диссертационного совета Д 220.034.01 при ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» по адресу: 420029, г. Казань, ул. Сибирский тракт, 35.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО «Казанская государственная академия ветеринарной медицины имени Н.Э. Баумана» и на сайте <https://kazanveterinary.ru>

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2020 г. и размещен на сайтах <http://www.vak.ed.gov.ru> и <https://kazanveterinary.ru>.

Ученый секретарь  
диссертационного совета  
д.б.н., профессор

Асия Мазетдиновна Ежкова

## 1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Массовые заболевания новорожденных телят с симптомами гастроэнтерита, конъюнктивита, поражения верхних и нижних дыхательных путей представляют наиболее серьезную проблему для животноводческих хозяйств во многих регионах Российской Федерации (А.Г. Голотов 2018; А.Г. Голотов и др., 2019; С.В. Закирова и др., 2019; О.А. Манжурина и др., 2020; О.Г. Петрова и др., 2020; А.В. Пчельников и др., 2019). Несмотря на то что, в инфекционном процессе могут принимать участие большое число микроорганизмов различной природы, главная роль принадлежит нескольким возбудителям: ПГ-3, ИРТ, ВД-БС, а также хламидиям (А.Д. Алексеев и др., 2015; О.Г. Петрова и др., 2020). Учитывая вышеизложенное, становится очевидно, что профилактика заболеваний, вызываемых данными инфекционными агентами должна проводиться с использованием ассоциированных вакцин (В.Г. Гумеров, 2015; Н.Н. Концевая, 2016; К.П. Юров, 2015; Р.Н. Walz et al, 2018).

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, возбудители которых способны длительное время персистировать в организме животных на иммунном фоне (В.Г. Гумеров, 2016; В.В. Евстифеев, 2014).

Ранее, в лаборатории вирусных и хламидийных инфекций разработана, испытана с положительными результатами и зарегистрирована в РФ «Ассоциированная вакцина против парагриппа-3, инфекционного ринотрахеита и хламидиоза крупного рогатого скота инактивированная эмульсионная». Препарат прошёл широкие производственные испытания и применяется в хозяйствах многих регионов Российской Федерации. При этом была установлена его высокая эффективность для профилактики респираторных и желудочно-кишечных инфекций КРС (В.Г. Гумеров, 1998; И.Г. Каримуллина, 2004).

Однако, в связи с завозом в РФ импортного поголовья КРС, предположительно повлекшее за собой проникновение на территорию страны 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 КРС (А.В. Клепцина, 2019; F.J. Villaamil, 2020; J.M. Riley, 2019).

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-иммунологический 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 крупномасштабного 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 много информации о природе и степени распространенности вирусных и хламидийных инфекций в животноводческих хозяйствах РФ, а так же и в странах зарубежья, которые вызывают заболевания различных систем органов у всех половозрастных групп КРС.

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 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», «КОМБОВАК-Р» 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 (Ю.Д. Караваев, 1981; Х.З. Гаффаров, 1986; Р.Х. Хамадеев 1993; Ф.М. Хусаинов, 2007; В.В. Евстифеев, 2015).

Так, Ю.Д. Караваевым (1981) была разработана и внедрена в производство инактивированная эмульсионная вакцина против хламидиоза КРС.

Кроме этого, исследования в данном направлении проводили ученые в ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ» (Р.Х. Хамадеев, Х.З. Гаффаров, В.В. Евстифеев, Ф.М. Хусаинов, А.З. Равилов, Р.Х. Равилов, В.Г. Гумеров и др.). Ими, в конечном итоге, была разработана полиштаммовая вакцина против хламидиоза КРС, которая с успехом 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», которую с успехом применяли в неблагополучных животноводческих хозяйствах РФ (В.Г. Гумеров, 2017).

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

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

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

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

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

Результатами производственных испытаний доказана эффективность применения разработанной вакцины для профилактики заболеваемости в условиях неблагополучных по пневмоэнтеритам и заболеваниям репродуктивных органов животных 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 (вирусовыделение, 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 вирусного штамма ВК-1(ВИЭВ) 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. Киришина («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 – в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 2 статьи – в изданиях, включенных в международные базы цитирований 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 антигенной 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 парагриппа-3, инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и хламидиоза крупного рогатого скота в производственных условиях.

**Структура и объем диссертации.** Диссертация изложена 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 180 источников, из них 63 зарубежных), список иллюстрированного материала и приложения. Диссертация содержит 13 таблиц и 10 рисунков.

## **2. СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **2.1 Материалы исследований**

Работа выполнена в период с 2014 по 2020 гг. в лаборатории вирусных и хламидийных инфекций федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности» («ФЦТРБ-ВНИВИ», г. Казань) согласно тематическому плану НИР.

**Штаммы.** В процессе выполнения работы были использованы следующие штаммы вирусов и хламидий: вакцинный штамм «ТК-А (ВИЭВ)-В-2» вируса ИРТ; эпизоотический штамм «КА-9» вируса ИРТ; референтный штамм «ПТК-45/86» вируса ПГ-3; эпизоотический штамм «ТМ-50» вируса ПГ-3; вакцинный штамм «ВК-1»(ВИЭВ) вируса ВД-БС; эпизоотический штамм «АКА-13» вируса ВД-БС; производственный штамм «250» возбудителя хламидийного аборта крупного рогатого скота; эпизоотический штамм «МЗ» возбудитель хламидиоза крупного рогатого скота.

**Животные.** В опытах использовали лабораторных и естественно-восприимчивых животных: 200 белых мышей живой массой 16-20 г; 20 кроликов живой массой 2,0-2,5 кг; 1571 крупного рогатого скота разных возрастных групп и пород.

**Культура клеток и куриные эмбрионы:** перевиваемая культура клеток почки эмбриона кролика, линии (MDBK); перевиваемая культура клеток легких 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). Кроме того, для культивирования хламидий использовали 6-11-и суточные куриные эмбрионы (КЭ).

**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 «ФЦТБ-ВНИВИ» (г. Казань); «Набор для диагностики парагриппа-3 крупного рогатого скота» (ФКП «Курская биофабрика – фирма «БИОК»)

**Питательные среды, реактивы, растворы и сыворотки:** 0,5% раствор гидролизата лактоальбумина (ГЛА) на растворе Хенкса; среда Игла МЭМ (pH 7,5-7,6) с глутамином (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; ISA-50, ISA-61 – масляный адьювант фирмы «Serpic» (Франция); ГОА-адьювант; масляно-ланолиновый адьювант.

## 2.2 Методы исследований

**Клинико-эпизоотологический анализ.** Проводили согласно «Методическим указаниям по эпизоотологическому исследованию» (И.А. Бакулов, 1979) и «Методическим указаниям по комплексной диспансеризации крупного рогатого скота» (И.Г. Шарабрин, 1988)

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

**Определение оптимальных условия для репродукции ВД-БС** проводили на культурах клеток. Заражение 2-3 суточной культуры клеток (после формирования монослоя) вакцинным штаммом «ВК-1» дозе  $6,75 \lg \text{ТЦД}_{50/\text{см}^3}$  проводили после смены ростовой среды на поддерживающую. Инфицированные культуры клеток инкубировали при температуре  $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$  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 культивирования, температура культивирования, продолжительность выращивания, количество пассажей клеток и вирусов.

**Очистка и концентрация вирусного антигена.** Очистку вирусных частиц от клеточного дебриса осуществляли центрифугированием (3 тыс. об/мин - 20 минут) после 3-х кратного замораживания и оттаивания. После этого надосадочную жидкость смешивали с ПЭГ-6000 в концентрации 7% и оставляли на контакт в течение 14-18 ч при  $+4..8^\circ\text{C}$ .



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

**Оценка антигенной активности ассоциированной вакцины против ИРТ, ПГ-3, ВД-БС и хламидиоза** проводили на 20 кроликах, которых разделили на 5 групп (по 4 головы). Для их иммунизации использовали 4 варианта ассоциированной инактивированной вакцины против ПГ-3, ИРТ, ВД-БС 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 – гидроокись алюминия (ГОА). Вакцины вводили кроликам подкожно в дозах 1,0 см<sup>3</sup>, за исключением ГОА-вакцины, которую вводили в дозе 2,0 см<sup>3</sup>.

Повторную вакцинацию опытных кроликов проводили на 14-ые сутки и последних двух кроликов на 21-е сутки в вышеуказанных дозах.

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 суток (ревакцинация), а также через 30 и 60 суток после первого введения вакцины.

**Определение антигенной активности и иммуногенности ассоциированной вакцины против ИРТ, ВД-БС, ПГ-3 и хламидиоза КРС инактивированной эмульсионной** проводили на 5-ти телятах 10-ти суточного возраста. С этой целью 3 теленка (опытная группа) были привиты ассоциированной инактивированной вакциной против ИРТ, ВД-БС, ПГ-3 и хламидиоза КРС двукратно с интервалом 14 суток в дозе 1,0 см<sup>3</sup> в области средней трети шеи. Два контрольных телёнка (не вакцинированные) были подвергнуты обработке полиспецифической сывороткой против выше указанных возбудителей с интервалом 10-15 суток в дозе 0,5 см<sup>3</sup> на 1 кг массы животных. В течение 60 суток опытные и контрольные телята находились в хозяйстве (ООО «Среднее Девятово» Лаишевского 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-3 и хламидиоза крупного рогатого скота.

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

Взятие крови на серологические, биохимические и гематологические исследования проводили до заражения, на 7-ые и 21-ые сутки после инфицирования эпизоотическими штаммами.

**Испытания ассоциированной вакцины против ИРТ, ПГ-3, ВД-БС и хламидиоза КРС в производственных условиях** проводили в

неблагополучных по респираторно-кишечным заболеваниям хозяйствах Приволжского федерального округа. Эффективность ассоциированной инактивированной вакцины оценивали по сохранности животных до и после использования препарата в неблагополучных по респираторно-кишечным и репродуктивным заболеваниям КРС в хозяйствах.

## 2.3 Результаты исследований

### 2.3.1 Клинико-эпизоотологическое обследование и серо-иммунологический 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, в течение трех лет, с 2015 по 2017 годы включительно, проводили клинико-эпизоотологическое обследование и сероиммунологический мониторинг на основные вирусные и хламидийную инфекции.

Всего, в течение 3-х лет, была исследована 1571 проба сывороток крови, полученных от не вакцинированного против респираторно-кишечных инфекций поголовья крупного рогатого скота из 46 современных скотоводческих хозяйств 9 областей и республик Приволжского Федерального округа и некоторых других регионов РФ.

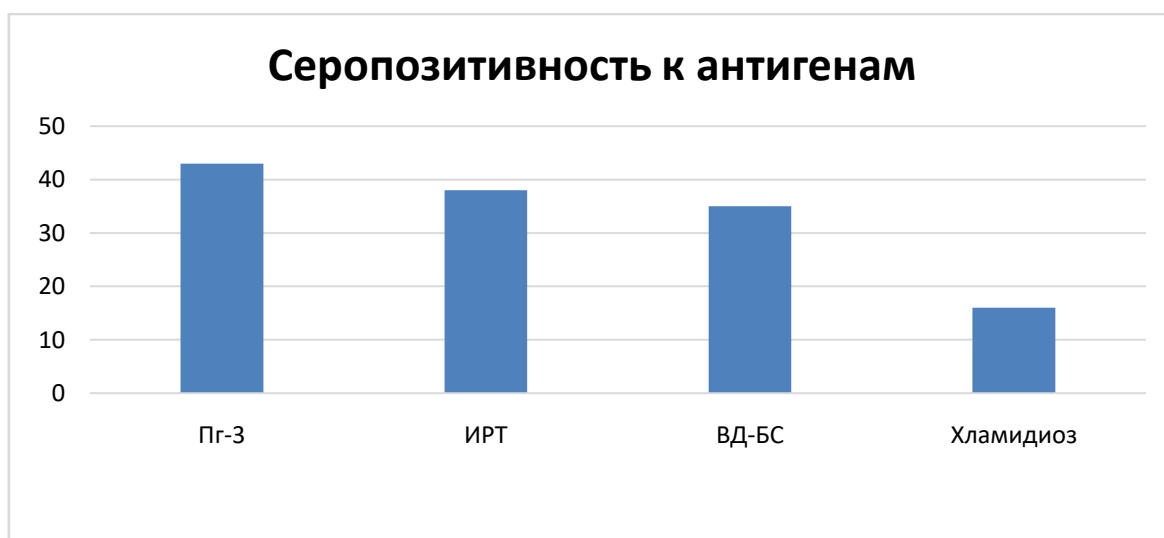


Рисунок 1 – Показатели серопозитивности животных в неблагополучных по респираторно-кишечным инфекциям КРС к вирусным антигенам

При этом была установлена высокая серопозитивность животных к антигенам вирусов ПГ-3 (43,2 %), ИРТ (38,6 %), ВД-БС (35,2 %) и к хламидиям (16,2%) (Рисунок 1). Положительно реагирующих животных регистрировали в каждом из обследованных регионов. Серопозитивность к различным вирусным и к хламидийному антигенам по регионам варьировала в довольно широких диапазонах.

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

Была изучена чувствительность перевиваемых линий культуры клеток MDBK, ЛЭК, ВНК-21/18, TR и Vero к штамму «ВК-1(ВИЭВ)» вируса ВД-БС.

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

Культуру клеток выращивали стационарным методом в матрасах объемом 1500 см<sup>3</sup>.

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<sup>0</sup>С. 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 использовали пробы с наибольшим титром инфекционной активности. Полученные данные представлены в таблице 1.

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

Культура клеток	Титр вируса, lg ТЦД <sub>50/мл</sub> (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	7,00±0,20	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
ВНК-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	6,20±0,20	6,10±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.

Проведенными исследованиями установлена высокая чувствительность культуры клеток MDBK, ЛЭК и ВНК-21/13 к вирусу ВД-БС: оказывая интенсивное цитопатическое действие на монослой, вирус сохранял высокую инфекционную активность в дальнейших пассажах.

### 2.3.3 Определение факторов, влияющих на репродукцию вируса ВД-БС 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 приступить к разработке масштабной технологии получения вирусной биомассы. В связи с этим, были 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. Результаты исследований представлены в таблице 2.

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 антигена для конструирования инактивированной вакцины.

Таблица 2 – 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 <sup>3</sup> )	110
3	Возраст культуры клеток (сутки)	2 – 3
4	Доза заражения (lg ТЦД <sub>50</sub> /клетка)	0,3
5	pH среды культивирования	7,2±0,2
6	Продолжительность выращивания (час)	36 – 48
7	Температура культивирования (°C)	37±0,5
8	Питательная среда	Игла MEM 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	0,16 – 0,19
11	Инфекционная активность вируса (lgТЦД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> )	6,5 – 8,0

#### **2.3.4 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.

Для определения оптимальной дозы инактиватора, в качестве которого использовали формальдегид, испытывали различные его концентрации: 0,05%, 0,1%, 0,2%, 0,5%, и 1%. Процесс инаktivации проводили при температуре  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ , время экспозиции 48 ч.

Установлено, что формальдегид, в концентрации 0,2% при экспозиции 48 ч и температуре  $37^{\circ}\text{C}$  надежно инаktivирует вирус штамма «ВК-1».

Для получения концентрированного вирусного антигена, трижды размороженную вирусосодержащую 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  $4^{\circ}\text{C}$ .

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

Вирусный материал, концентрированный в 100 раз по объему, разливали во флаконы по  $50\text{--}100\text{ см}^3$  и оставляли при  $-40^{\circ}\text{C}$  для хранения и дальнейшего использования при изготовлении ассоциированной вакцины.

Анализ результатов исследований показал, что применение ПЭГ-6000 позволяет концентрировать вирусную биомассу ВД-БС на  $1,64\text{--}3,14\text{ lg ТЦД}_{50}/\text{см}^3$  по сравнению с исходной вирусной суспензией.

Стандартизацию антигена вируса диареи осуществляли путем определения концентрации белка в полуфабрикате антигена. Для этого измеряли оптическую плотность раствора антигена на спектрофотометре СФ-46 и доводили концентрацию антигена до оптимальной путем добавления фосфатно-солевого буфера.

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

Антигенная активность и иммуногенность создаваемых вакцин напрямую зависит от концентрации используемых в ее составе антигенов. Обычно иммуногенность напрямую зависит от концентрации антигенов, однако высокие концентрации антигена обуславливают реактогенность препаратов, что неприемлемо. Поэтому, для определения оптимальной концентрации антигена вирусной диареи в составе ассоциированной были проведены опыты на кроликах, которых иммунизировали с применением вирусного антигена ВД-БС в дозе  $0,5\text{ см}^3$  подкожно, в области холки. При этом были использованы различные концентрации белка в одной иммунизирующей дозе антигена: 1,4-1,6; 1,6-1,8; 1,8-2,0 мг/мл.

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 суткам. Наиболее оптимальной оказалась концентрация белка в антигене равная 1,6-1,8 мг/мл.

После этого было проведено испытание различных адъювантов в составе ассоциированной вакцины.

Антигенную активность 4-х вариантов вакцины против ИРТ, ПГ-3, ВД-БС и хламидиоза КРС изучали на кроликах, результаты опыта представлены на рисунках 2, 3, 4, 5.

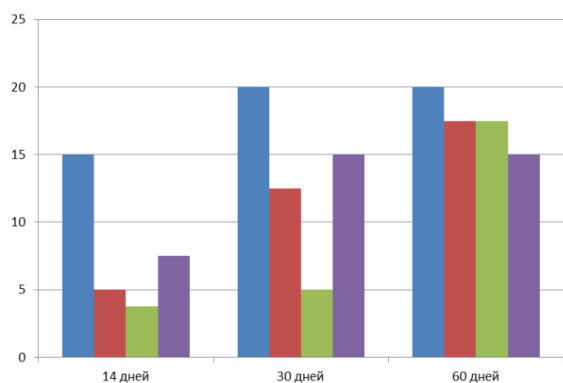


Рисунок 2 – Динамика титров противохламидийных антител

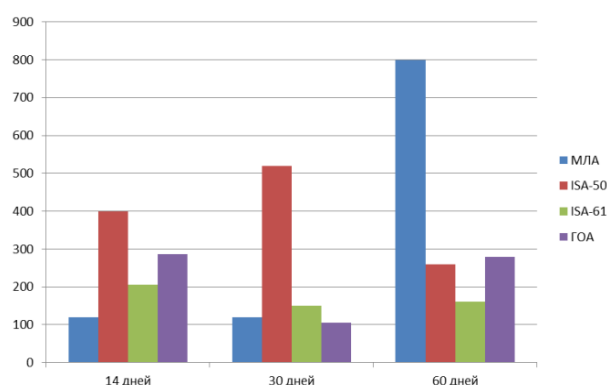


Рисунок 3 – Динамика титров антител против ПГ-3

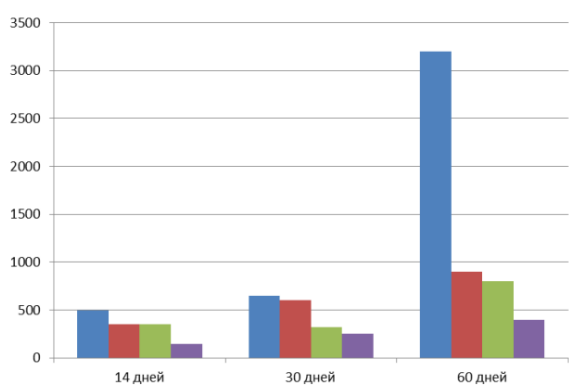


Рисунок 4 – Динамика титров антител против ВД-БС

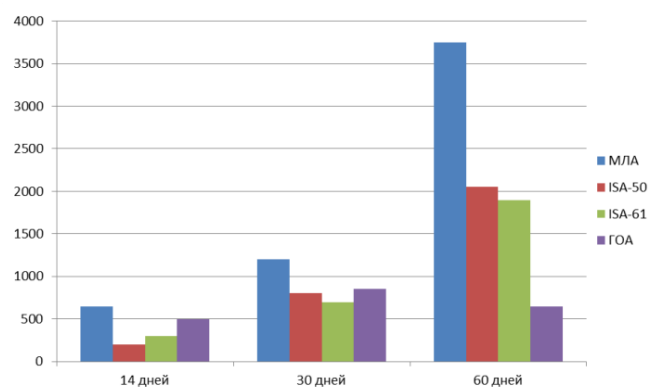


Рисунок 5 – Динамика титров антител против ИРТ

Во всех группах животных, вакцинированных различными вариантами ассоциированной вакцины, на различных сроках исследования выявлялись специфические антитела к ИРТ, ПГ-3, ВД-БС и хламидийному антигену, что позволяло сделать заключение о высокой антигенной активности всех 4-х вариантов вакцины. Установлено, что вакцина на основе МЛА обладает более высокой иммуногенной активностью, чем вакцины на основе ISA50, ISA61 и ГОА адъювантов.

### **2.3.6 Определение антигенной активности и иммуногенности ассоциированной вакцины против ИРТ, ВД-БС, ПГ-3 и хламидиоза КРС инактивированной эмульсионной на телятах**

Иммуногенность разработанной ассоциированной вакцины проверяли в остром опыте на 10-суточных телятах. Кинический осмотр телят не выявил у них наличия патологий. Были взяты пробы крови для анализа на наличие

антител к вирусам ИРТ, ПГ-3, ВД-БС и хламидийному антигену, давшие отрицательный результат.

Клинические наблюдения, проводимые за телятами после вакцинации, не установили разницы между животными опытной и контрольной групп. Местной реакции на введение вакцины у телят не наблюдали.

После экспериментального заражения у телят опытной группы не наблюдали температурной реакции, в то время как у контрольных животных на 2-ые сутки после введения вирулентных штаммов вирусов и хламидий была выявлена гипертермия показавшая повышение ректальной температуры до 39,7-40,6<sup>0</sup>С.

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 ИРТ, ПГ-3, ВД-БС и хламидиям.

При исследовании сывороток крови у телят, через 30 суток после ревакцинации, отмечали рост титров специфических антител, которые регистрировались в пределах 1:1280-1:2560 к вирусу ПГ-3 в РТГА, 1:1600-1:3200 к вирусу ИРТ в ИФА, 1:1600-1:12800 к вирусу ВД-БС в ИФА и 1:10-1:80 к хламидийному антигену в РСК.

У 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.

Вирусологические и бактериологические исследования клинических материалов (носовые и глазные смывы), отобранные от телят из опытной группы через 4, 6, 8, 10, 15 и 25 суток после инфицирования, дали отрицательные результаты. На 4-8-ые 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.

Результаты гематологических исследований, проводимые параллельно с серо-иммунологическими исследованиями на протяжении всего опыта, показали, что на 7-ые сутки 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-ые сутки после заражения эти показатели вернулись к начальному уровню. Следует отметить, что у животных контрольной группы после заражения регистрировали лейкоцитоз.

Результаты лабораторных опытов на телятах ассоциированной вакцины против ИРТ, ПГ-3, ВД-БС и хламидиоза КРС показали, что биопрепарат ареактогенен после введения, обеспечивает формирование иммунного ответа ко всем 4-м агентам и способный защитить телят от экспериментальной вирусно-хламидийной инфекций.

### **2.3.7 Эффективность применения ассоциированной вакцины против ИРТ, ВД-БС, ПГ-3 и хламидиоза крупного рогатого скота в условиях неблагополучного хозяйства**

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

С этой целью в течение трех лет в хозяйстве проводили профилактическую обработку сухостойных коров и новорожденных телят экспериментальными сериями «Ассоциированной вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и хламидиоза крупного рогатого скота инактивированной эмульсионной» Результаты исследований представлены в таблице 3.

Таблица 3 – Различные показатели эффективности ведения животноводства в хозяйстве по годам после внедрения ассоциированной вакцины

Наименование показателей	Ед. изм.	Годы				Интерпретация результатов
		До приме нения	После применения			
			1 год	2 год	3 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.Заболеваемост ь 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 абортов	голов	25	23	14	16	Уменьшилось в 2 раза
	%	3,8	3,1	1,7	1,9	

Из результатов проведенного анализа видно, что внедрение вакцинации поголовья КРС способствовало постепенному уменьшению заболеваемости молодняка, увеличению его рождаемости и сохранности и, как следствие,



произошло увеличение стада коров, что положительно отразилось на эффективности ведения животноводства в целом.

### 3 ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании выполненных исследований были сделаны следующие выводы:

1. В результате клинико-эпизоотологического мониторинга 46-ти не благополучных по респираторно-кишечным инфекциям молодняка КРС хозяйств установлено, что этиологическими агентами заболеваемости телят, наряду с вирусами ПГ-3, ИРТ и хламидиями является вирус 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 MEM и 1% глутамин), а также определен оптимальный режим культивирования в роллере: температура  $37 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , скорость вращения роллерных бутылей 8-10 об/час, продолжительность выращивания 36-48 часов, коэффициент заполнения бутылей 0,16-0,19.
4. Сравнительное испытание различных адъювантов (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-ланOLIиного адъюванта 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.

#### **4 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ**

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

- Технологический регламент «Ассоциированная вакцина против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и хламидиоза крупного рогатого скота инактивированная эмульсионная»;
- Инструкция по применению вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и хламидиоза крупного рогатого скота инактивированной эмульсионной (Утвержденная 15.03.16).

#### **5 СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. Акбашев, И. Р. Серологический и иммунологический мониторинг респираторных и желудочно-кишечных заболеваний крупного рогатого скота в хозяйствах Приволжского федерального округа / И.Р. Акбашев // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2016. – Т. 226 – № 2. – С. 13-16.\*

2. Гумеров, В. Г. Определение оптимальной прививочной дозы вакцины против ПГ-3, ИРТ, ВД-БС и хламидиоза крупного рогатого скота инактивированной эмульсионной на кроликах / В.Г. Гумеров, А.И. Никитин, Л.А. Барбарова, Г.И. Хусаинова, И.Г. Каримуллина, И.Р. Акбашев, В.В. Евстифеев // Ветеринария и кормление. – 2016. – №2. – С.58-60.\*

3. Евстифеев, В.В. Производственное испытание ассоциированной вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и хламидиоза КРС в условиях хозяйства / В.В. Евстифеев, В.Г. Гумеров, И.Р. Акбашев, Г.И. Хусаинова, М.Н. Коннов // Ученые записки учреждения образования Витебская ордена Знак почета государственная академия ветеринарной медицины. – 2018. – Т. 54. – № 4. – С. 44-48.

4. Евстифеев, В.В. Результаты производственного испытания ассоциированной вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и хламидиоза крупного рогатого скота инактивированной эмульсионной / В.В. Евстифеев, В.Г. Гумеров, И.Р. Акбашев, И.Г. Каримуллина, М.Н. Коннов, Г.И. Хусаинова, М.И. Кляцкий // Труды Федерального центра охраны здоровья животных. – 2018. – Т. 16. – С. 236-246.

5. Акбашев, И.Р. Изучение антигенной активности вакцины против ИРТ, ВД-БС, ПГ-3 и хламидиоза КРС на лабораторных животных / И.Р. Акбашев, В.В. Евстифеев, В.Г. Гумеров, И.Г. Каримуллина, Г.И. Хусаинова // Ветеринарный врач. – 2018. – № 1. – С. 29-33.\*

6. Евстифеев, В.В. Эффективность применения ассоциированной вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3 и

хламидиоза КРС в производственных условиях / В.В. Евстифеев, В.Г. Гумеров, Ф.М. Хусаинов, И.Р. Акбашев, М.И. Кляцкий // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2018. – Т. 235 (III). – С. 65-71.\*

7. Хусаинова, Г.И. Этиологическая роль хламидий в респираторно-кишечных заболеваниях молодняка и патологии репродуктивных органов взрослого поголовья КРС / Г.И. Хусаинова, И.Р. Акбашев, И.Р. Фазулзянов, Ф.М. Хусаинов, В.В. Евстифеев // В сборнике: Актуальные проблемы ветеринарной медицины Материалы международной научно-практической конференции посвященной 90-летию со дня рождения профессора В.А. Киршина, 2018. – С. 273-277.

8. Гумеров, В.Г. Клинико-эпизоотологический мониторинг респираторно-кишечных инфекций молодняка крупного рогатого скота / В.Г. Гумеров, В.В. Евстифеев, Х.Н. Макаев, И.Г. Каримуллина, А.К. Галиуллин, И.Р. Акбашев // В сборнике: Актуальные проблемы ветеринарной медицины Материалы международной научно-практической конференции посвященной 90-летию со дня рождения профессора В.А. Киршина, 2018. – С. 220-223.

9. Евстифеев, В.В. Эффективность специфической профилактики с использованием ассоциированной вакцины против парагриппа-3, инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и хламидиоза КРС / В.В. Евстифеев, В.Г. Гумеров, М.Н. Коннов, И.Р. Акбашев, М.И. Кляцкий // Ветеринария, зоотехния и биотехнология. – 2019. – № 1. – С. 11-16.\*

10. 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.\*

11. Евстифеев, В.В. Анализ эпизоотической ситуации по респираторным и желудочно-кишечным инфекциям крупного рогатого скота / В.В. Евстифеев, Ф.М. Хусаинов, Г.И. Хусаинова, И.Г. Каримуллина, М.Н. Коннов, И.Р. Акбашев // КАЗНИВИ, Алматы, – 2019. – №65. – С. 35-39.

12. Евстифеев, В.В. Разработка ассоциированной вакцины против ИРТ, ПГ-3, ВД-БС и хламидиоза крупного рогатого скота / В.В. Евстифеев, В.Г. Гумеров, Ф.М. Хусаинов, И.Г. Каримуллина, И.Р. Акбашев, С.И. Яковлев, Р.Х. Равилов // Ветеринарный врач. – 2020. – № 6. – С. 21-27.\*

13. Evstifeev, V.V. Improvement of an oil adjuvant vaccine against chlamydia for cattle in Kazan city Russia / V.V. Evstifeev, A.I. Nikitin, A.N. Chernov, H.N. Makaev, F.M. Khusainov, G.N. Spiridonov, I.R. Akbashev // Indian Veterinary Journal. – 2018. - Т. 95. - № 7. – С. 26-28.\*\*

14. Evstifeev, V.V. Development of associated vaccine against Piv-3, Ibr, Bvd and clamidiosis of cattle / V.V. Evstifeev, I.R. Akbashev, S.I. Yakovlev, M.I. Klyatskiy, I.G. Galimzyanov // BIO Web Conf. – 2020. – Vol. – P.00149\*\*

\* – статьи в изданиях, рекомендованные ВАК Минобрнауки РФ;

\*\* – статьи в изданиях, входящих в базы данных Scopus и Web of Science.