

КОНЦЕВАЯ НАТАЛЬЯ НИКОЛАЕВНА

**РАЗРАБОТКА ВАКЦИН ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННОГО  
РИНОТРАХЕИТА, ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ, РОТА-, КОРОНАВИРУСНОЙ  
БОЛЕЗНЕЙ И ЛЕПТОСПИРОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА**

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

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата ветеринарных наук

Москва – 2016

Работа выполнена в Автономной некоммерческой организации «Научно-исследовательский институт диагностики и профилактики болезней человека и животных».

Научный руководитель:

Лауреат Государственной премии Российской Федерации в области науки и техники, доктор биологических наук **Соболева Галина Леонидовна**

Официальные оппоненты:

**Сусский Евгений Владимирович**, доктор биологических наук, Лауреат государственной премии правительства в области науки и техники, ФГУП «Армавирская биофабрика», директор

**Ананьина Юлия Васильевна**, доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, заведующая лабораторией

Ведущая организация:

ФГБОУ ВО «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии - МВА им. К.И. Скрябина»

Защита диссертации состоится «\_\_\_»\_\_\_\_\_ 2016 года в «\_\_\_» часов на заседании диссертационного совета Д 006.033.02 при ФГБНУ Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии им. Я.Р. Коваленко по адресу: 109428, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, к. 1, тел. (495)970-03-67.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ ВИЭВ. Диссертация опубликована на официальном сайте ФГБНУ ВИЭВ – <http://www.viev.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_»\_\_\_\_\_ 2016 года

Ученый секретарь

Диссертационного совета

доктор биологических наук

И.Ю. Ездакова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

*Актуальность темы.* Интенсификация молочного животноводства и повышение молочной продуктивности коров часто сопровождается нарушением обмена веществ, что снижает резистентность организма, способствуя развитию иммунодефицитов, повышающих восприимчивость животных к инфекционным болезням (А.Г. Шахов и соавт., 2000; Ю.Н. Федоров, 2006).

Добиться полной ликвидации тех или иных инфекционных болезней крупного рогатого скота (КРС) в настоящее время не представляется возможным, особенно это касается природно-очаговых заболеваний. Контролировать же развитие эпизоотического процесса, снижать его интенсивность, предупреждать потери от инфекционных болезней вполне возможно, используя знание закономерностей развития эпизоотического процесса каждой болезни.

Особую опасность среди инфекционных болезней представляют инфекционный ринотрахеит - пустулезный вульвовагинит (ИРТ-ИПВ), вирусная диарея (ВД) крупного рогатого скота, ротавирусная (РВИ) и коронавирусная (КВИ) инфекции и их ассоциации с лептоспирозом и рядом других болезней, протекающих нередко, латентно, не выявляемых своевременно, а потому бесконтрольно распространяющихся (P.P. Pastoret et al., 1982).

Вирусы инфекционного ринотрахеита (ИРТ) и вирусной диареи (ВД) крупного рогатого скота (КРС) занимают особое место в связи с многообразием клинических проявлений и тяжестью течения вызываемых ими болезней (Н.Н. Крюков, 1984; W.D.G. Yates, 1984; К.П. Юров с соавт., 2003; A.L.E. Lindberg, 2003; R.W. Fulton et al., 2004).

Вирусная диарея, инфекционный ринотрахеит, ротавирусная, коронавирусная инфекции и лептоспироз широко распространены во всем мире и опасны, в основном, для новорожденных телят. Смертность и выбраковка переболевших телят достигают 40-50% (L.L. Myers et al., 1982, X.З. Гафаров, 2002).

Лептоспироз, вирусная диарея и инфекционный ринотрахеит, кроме того,

являются абортотенными факторами, вызывающими аборт у КРС.

Величина экономического ущерба при этих заболеваниях, складывающаяся из падежа телят, снижения мясной и молочной продуктивности, уменьшения привесов, выбраковки животных, убытка от абортов, бесплодия и т.д., огромна, а терапевтические меры борьбы с уже возникшим заболеванием отсутствуют или малоэффективны. Поэтому в комплексе противозооотических мер борьбы с вирусными инфекциями, такими как ИРТ, ВД, РВИ, КВИ, а также лептоспирозом КРС специфическая профилактика является ведущей. При лептоспирозе, кроме того, следует акцентировать внимание и на эпидемическом аспекте.

В изучении эпизоотологии, эпидемиологии, методов диагностики и средств специфической профилактики лептоспироза достигнуты значительные успехи. Несмотря на это, лептоспироз все еще остается серьезной экономической и социальной проблемой, наносит значительный материальный ущерб животноводству и постоянно угрожает здоровью и жизни человека. Подтверждением этого являются заболевания лептоспирозом людей в Москве (1992-1993), Алтайском крае (1998), Краснодарском и Ставропольском краях (1998-2002), Ростовской области (1998-2002) и других регионах России (Ю.А. Малахов, 2000; И.А. Болоцкий, 2003; В.М. Усольцев, 2003; Ю.В. Ананьина, 2004 и др.).

В связи с ростом числа известных сероваров лептоспир и значительным импортом скота обязательным условием для успешной борьбы с лептоспирозом является необходимость постоянного мониторинга за состоянием и изменением этиологической структуры лептоспироза в каждом регионе (Ю.А. Малахов с соавт., 2000; Г.Л. Соболева, 2001).

Целесообразность создания инактивированных комбинированных вакцин против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусных болезней и лептоспироза крупного рогатого скота обусловлена тем, что практически во всех регионах страны выявлены животноводческие хозяйства

неблагополучные по этим болезням.

**Цель работы.** Разработка и оценка эффективности инактивированных комбинированных вакцин против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусной инфекций и лептоспироза (вакцины КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л), предназначенных для профилактики абортов инфекционной этиологии у крупного рогатого скота и создания колострального иммунитета у потомства.

**Основные задачи исследований:**

1. Изучить распространенность и этиологическую структуру лептоспироза крупного рогатого скота в РФ.

2. Определить состав вакцин и соотношение вирусных компонентов и лептоспир в вакцинах.

3. Отработать иммунизирующую дозу вакцин для крупного рогатого скота:

а) определить напряженность и продолжительность иммунитета у животных в разные сроки после вакцинации;

б) определить оптимальные сроки вакцинации крупного рогатого скота;

в) определить превентивную активность к лептоспирам сыворотки крови коров и телят, взятой на разных сроках после вакцинации.

4. Изготовить и испытать опытно-промышленные серии вакцин на лабораторных и естественно-восприимчивых животных:

а) разработать методы контроля вакцин и нормативную документацию;

б) провести испытания экспериментальных вакцин против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусной инфекций и лептоспироза крупного рогатого скота в производственных условиях.

**Научная новизна работы.** С учетом распространенности и этиологической структуры лептоспироза разработаны два новых вакцинных препарата против основных инфекционных агентов, вызывающих аборты у крупного рогатого скота и заболевания различной степени тяжести у молодняка, различающиеся по антигенному составу. Определены совместимость и

оптимальные соотношения вирусных и бактериального компонентов в составе препаратов. Вакцины предназначены для специфической профилактики инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и лептоспироза (вакцина КОМБОВАК 2+Л, патент РФ №015612), инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусной болезней и лептоспироза крупного рогатого скота (вакцина КОМБОВАК 4+Л, патент №015619). ФГУ «Федеральный институт промышленной собственности Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам» внес вакцины по данным патентам в реестр «Перспективные изобретения».

***Практическая значимость исследований.*** Научно обоснованы принципы изготовления и биологического контроля инактивированных комбинированных вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л. Экспериментально установлена иммунизирующая доза препаратов, сроки вакцинации крупного рогатого скота, показана их эффективность и возможность оценки на лабораторных и естественно-восприимчивых животных. Опытным путем установлена высокая иммуногенная активность препаратов для коров при иммунизации за 2-3 недели до осеменения и глубокостельных коров. Установлено, что в экспериментальных и производственных условиях вакцинация данными препаратами обеспечивает выраженный протективный эффект у взрослого крупного рогатого скота и позволяет создать колостральный иммунитет у телят. На вакцины и штаммы разработана и утверждена нормативная документация.

***Основные положения, выносимые на защиту.***

Полученные данные позволяют вынести на защиту следующие основные положения:

- изучение этиологической структуры лептоспироза;
- схема изготовления и контроля инактивированных комбинированных вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л;
- результаты исследований по изучению антигенных свойств компонентов,

входящих в состав вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л, на лабораторных и естественно-восприимчивых животных;

- эффективность применения разработанных инактивированных комбинированных вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л в качестве средств специфической профилактики абортос у крупного рогатого скота и защиты молодняка против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусной болезней и лептоспироза крупного рогатого скота.

**Апробация работы.** Основные положения диссертационной работы доложены на Московской Международной научно-практической конференции по лептоспирозу «Диагностика, профилактика и лечение лептоспироза людей и животных» (г. Москва, 2007); европейской встрече по лептоспирозу «Евролепто 2012» (г. Дубровник, 2012); десятом Международном конгрессе специалистов ветеринарной медицины (Украина, 2012); научно-производственных совещаниях ООО «Ветбиохим», АНО «НИИ ДПБ» (г. Москва, 2009 – 2015 гг.).

**Публикации.** По материалам диссертации опубликованы 6 научных работ, в том числе 3 работы в изданиях по перечню ВАК РФ.

**Личный вклад соискателя.** Работа выполнена соискателем самостоятельно. Автор приносит глубокую благодарность руководству за возможность выполнения диссертационной работы, научному руководителю Лауреату Государственной премии Российской Федерации в области науки и техники, доктору биологических наук Соболевой Г.Л. за научно-методическое руководство в организации и проведении исследований, выражает искреннюю признательность доктору ветеринарных наук, профессору Алиперу Т.И., Заслуженному деятелю науки РСФСР, доктору ветеринарных наук, профессору Сергееву В.А., доктору ветеринарных наук, профессору Орлянкину Б.Г., доктору ветеринарных наук, профессору Верховскому О.А. за консультационную помощь, всем сотрудникам за поддержку и помощь в работе.

**Объем и структура диссертации.** Диссертационная работа изложена на 147 стр. компьютерного текста и состоит из введения, обзора литературы,

материалов и методов исследований, собственных результатов исследований и их обсуждения, выводов, практических предложений, списка литературы и приложений. Материалы диссертации иллюстрированы 26 таблицами и 4 рисунками. Список литературы включает 195 источников (102 отечественных и 93 зарубежных авторов).

## **СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

### **1. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ**

**Культуры клеток и питательные среды.** Вирусы размножали в перевиваемой культуре клеток почки телят (MDBK). В качестве ростовой среды для культур клеток использовали питательную среду Игла MEM с добавлением 10% сыворотки крови крупного рогатого скота; поддерживающей - среду Игла MEM без сыворотки. Поддерживающие среды для рота- и коронавируса содержали трипсин в концентрации 5 мкг/мл от объема питательной среды.

**Вирусы.** В работе использовали следующие вакцинные штаммы: штамм «Т» вируса ИРТ, штамм «Т-04» вируса ВД, штамм «К-88» ротавируса крупного рогатого скота и штамм «КВ-90» коронавируса крупного рогатого скота.

**Бактерии.** Использовали вакцинные штаммы лептоспир: «ВГНКИ-1» серологической группы *Grippotyphosa*, «ВГНКИ-4» серологической группы *Tarassovi*, «ВГНКИ-6» серологической группы *Romona* и «Hardjo» серологической группы *Sejroe*.

**Культивирование вирусов.** Вирусы ИРТ, ВД, КВ и РВ выращивали в перевиваемой культуре клеток MDBK. Накопление вирусов в культуре клеток оценивали по цитопатическому эффекту, КВ также по гемагглютинирующей активности с использованием эритроцитов белой мыши. Титр вируса вычисляли по методу Рида и Менча и выражали в  $Ig$  ТЦД<sub>50</sub>/мл и в гемагглютинирующих единицах (ГАЕ) для КВ.

**Инактивация вирусов.** Для инактивации вирусов использовали формалин, содержащий не менее 37% формальдегида. Полноту инактивации вирусов оценивали по отсутствию их размножения в чувствительной культуре клеток в

течение четырех пассажей.

**Культивирование лептоспир.** Лептоспиры культивировали в жидкой сывороточной питательной среде, состоящей из фосфатного буфера – 93-95 % и инактивированной сыворотки крови барана – 5-7%.

**Адьюванты.** В качестве адьювантов при производстве вакцин использовали 6%-ный гель гидрата окиси алюминия (ГОА).

**Экспериментальные животные.** Оценку безвредности, антигенной и иммуногенной активности экспериментальных серий вакцин, подбор оптимальной иммунизирующей дозы и сроков вакцинации каждой вакцины проводили на лабораторных (белые мыши, морские свинки, кролики породы шиншилла, крольчата 5-8 суточного возраста, золотистые хомячки) и естественно-восприимчивых животных (нетели, стельные коровы, телята), сформированных в группы по принципу аналогов. Материалом для исследований служила сыворотка крови лабораторных и продуктивных животных, в которой определяли содержание антител в различных серологических тестах.

**Реакция нейтрализации (РН).** РН ставили микрометодом в 96-луночных планшетах (Nunc, Denmark) по стандартной методике с рабочей дозой соответствующего вируса (30-300 ТЦД<sub>50</sub>/100 мкл). Для постановки РН с РВ и КВ в поддерживающую среду добавляли трипсин. Вируснейтрализующий титр антител в сыворотках крови лабораторных и продуктивных животных выражали как предельное ее разведение, ингибирующее развитие ЦПД вируса в 50% зараженных культур клеток.

**Реакция гемагглютинации (РГА) и реакция торможения гемагглютинации (РТГА).** РГА использовали для обнаружения КВ, РТГА - выявления специфических антител к КВ в сыворотке крови морских свинок и крупного рогатого скота. Реакцию ставили микрометодом в полистироловых планшетах с U-образным дном с использованием эритроцитов белой мыши.

**Реакция микроагглютинации (РМА).** РМА использовали для выявления в сыворотке крови специфических антител к лептоспирам различных серогрупп. В

качестве антигена в РМА использовали вакцинные или диагностические (в зависимости от вида работы) штаммы лептоспир. РМА ставили микрометодом в полистироловых планшетах с U-образным дном. За титр антител принимали предельное разведение сыворотки, в котором агглютинировало не менее 50% лептоспир в поле зрения.

**Определение превентивной активности сыворотки крови.** Превентивные свойства сыворотки крови вакцинированных животных определяли на золотистых хомячках, которым вводили по 0,5 мл сыворотки крови, с последующим их внутрибрюшинным заражением 10 LD<sub>50</sub> вирулентного штамма лептоспир. Результаты опыта учитывали через 10 дней после гибели контрольных животных. Считали, что вакцинированный крупный рогатый скот защищен от инфицирования лептоспирами до тех пор, пока сыворотка крови животных предохраняет от гибели не менее 40% хомячков, зараженных смертельной дозой лептоспир (Ю.А. Малахов, В.С. Соловьева, 1977).

**Вирулентность штаммов лептоспир.** Вирулентность лептоспир определяли по величине 50%-ной летальной дозы (LD<sub>50</sub>) для золотистых хомячков.

Расчет LD<sub>50</sub> проводили по методу Кербера в модификации Ашмарина.

**Статистическая обработка результатов.** Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с использованием программы Excel для Windows.

## **2. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **2.1. Распространенность и этиологическая структура лептоспироза крупного рогатого скота в РФ.**

Нами подвергнуты статистической обработке данные отчетности областных, краевых, республиканских лабораторий всех регионов Российской Федерации о проведенных исследованиях на лептоспироз крупного рогатого скота за период с 1996 по 2011 гг.

За 16 лет обследовано на лептоспироз серологическим методом по России почти 9,5 млн. крупного рогатого скота. В среднем инфицированность составляла

19,3%. В динамике по годам в период с 1996 по 2001 гг. инфицированность составляла 23-25%. К 2011 г. наметилась четкая тенденция к снижению распространенности лептоспироза КРС, инфицированность с 20,6% в 2002 г снизилась соответственно до 9,4%.

В этиологической структуре лептоспироза КРС в РФ максимальное количество положительных реакций приходится на лептоспиры серологических групп Sejroe (21,0%) и Hebdomadis (20,5%). На долю лептоспир Grippotyphosa, Tarassovi и Pomona приходится соответственно 7,1%, 7,0% и 5,7%. По отдельным регионам количество положительных реакций с лептоспирами данных серогрупп может варьировать, как в сторону увеличения, так и в сторону уменьшения.

Таким образом, наиболее часто у КРС обнаруживались антитела в РМА к лептоспирам серогрупп Hebdomadis, Sejroe, Grippotyphosa, Tarassovi и Pomona. Достаточно большой процент животных имели антитела одновременно к лептоспирам двух или более серогрупп, в связи, с чем целесообразно включать в состав комбинированных вакцин штаммы лептоспир нескольких серогрупп.

## **2.2. Разработка состава вакцин, технологической схемы и оптимального соотношения компонентов.**

С 1996 г в РФ выпускается вакцина инактивированная комбинированная против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной, рота- и коронавирусной болезнью крупного рогатого скота «КОМБОВАК» (В.А. Сергеев с соавт.), которая хорошо зарекомендовала себя на практике. Однако наука и практика не стоят на месте и арсенал средств специфической профилактики пополнился вакцинами КОМБОВАК-К и КОМБОВАК-Р (А.Е. Верховская, 2008).

Анализ литературных данных на современном этапе показал высокую инфицированность КРС вирусами ИРТ, ВД, РВ, КВ (М.И. Гулюкин, 2007; В.А. Мищенко, 2008; А.Е. Верховская, 2009; А.Г. Глотов, 2015 и др.)

По данным собственных исследований количество положительных реакций

с вирусом ИРТ составляло 65,5%, с ВД – 90,0%, РВ – 81,4%, КВ – 85,5%, с лептоспирами – 66,2% (рис 1 и 2), что подтвердило актуальность разработки вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л.

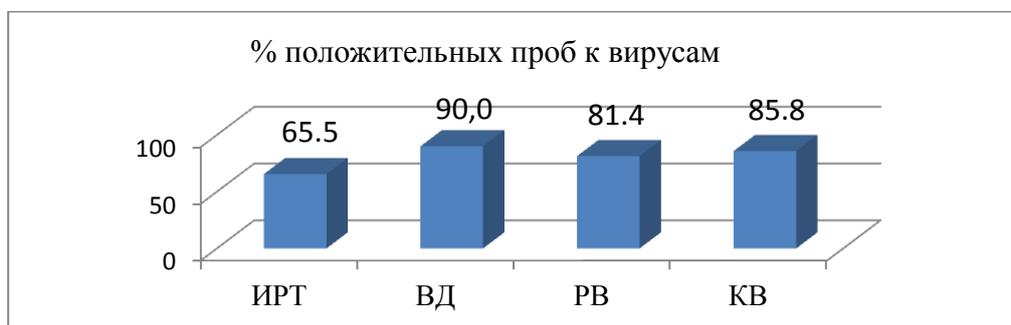


Рисунок 1. Процент положительных проб к вирусам ИРТ, ВД, РВ и КВ у крупного рогатого скота от числа обследованных до проведения опыта в хозяйстве

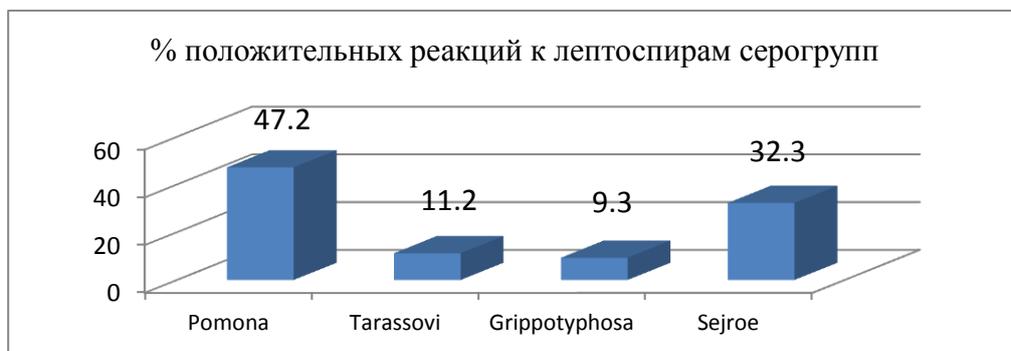


Рисунок 2. Процент положительных реакций к лептоспирам разных серогрупп до вакцинации

Компонентный состав вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л представлен в таблице 1 и 2.

Таблица 1

Состав вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и лептоспироза крупного рогатого скота (КОМБОВАК 2+Л)

Компонент	Титр, Ig ТЦД <sub>50</sub> /мл	Содержание компонентов, об. %			
		Вариант 1	Вариант 2	Вариант 3	Вариант 4
Вирус ИРТ	7,5-8,0	-	-	40	-
	8,0-8,5	30	-	-	30
	8,5-9,0	-	20	-	-
Вирус ВД	7,5-8,0	-	40	-	-
	8,0-8,5	30	-	20	30
Лептоспиры	-	20	20	20	10
ГОА (6%-й гель)	-	20	20	20	30

Антигенную активность вирусных компонентов (вирус ИРТ, ВД, РВ и КВ) определяли в опыте на морских свинках, лептоспир – на кроликах. Животных

Таблица 2

Состав вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусной болезней и лептоспироза крупного рогатого скота (КОМБОВАК 4+Л)

Компонент	Титр, lg ТЦД <sub>50</sub> /мл	Содержание компонентов, об.%		
		Вариант 1	Вариант 2	Вариант 3
Вирус ИРТ	7,5-8,5	15	20	-
	8,5-9,0	-	-	10
Вирус ВД	7,5-8,5	15	20	-
	8,5-9,0	-	-	10
Ротавирус	7,5-8,0	-	-	20
	8,0-8,5	15	10	-
Коронавирус	6,5-7,0	-	-	20
	7,0-7,5	15	10	-
Лептоспиры	-	20	20	10
ГОО (6%-й гель)	-	20	20	30

формировали в группы по принципу аналогов, используя по 10 морских свинок и 5 кроликов на каждый вариант вакцины. Морским свинкам вакцину вводили однократно подкожно в дозе 0,5 мл, кроликам однократно внутривенно из расчета в дозе 15 млн микробных клеток лептоспир каждой серогруппы. В качестве контроля использовали не вакцинированных животных.

Кровь у вакцинированных животных брали через 21 день и сыворотку крови исследовали в соответствующих серологических реакциях – к вирусам ИРТ, ВД, РВ – в РН, к КВ – в РТГА, к лептоспирам – в РМА. Результаты исследований представлены в таблице 3 и 4.

Таблица 3

Антигенная активность вакцины КОМБОВАК 2+Л с разным количественным составом компонентов в опыте на лабораторных животных

Вариант вакцины	Титр антител* в сыворотке крови экспериментальных животных к					
	вирусам, М±m		лептоспирам серогрупп			
	ИРТ	ВД	Pomona	Tarassovi	Grippotyphosa	Sejroe
1	64,2±8,7	124,0±12,5	1580±213	1428±125	1243±112	1415±132
2	73,3±12,2	132,0±14,2	1562±189	1516±194	1325±124	1495±130
3	68,8±10,1	118,0±8,9	1623±209	1813±202	1301±118	1501±182
4	52,0±8,4	74,0±15,8	1468±174	1315±116	1021±106	1101±112

контроль	-	-	-	-	-	-
----------	---	---	---	---	---	---

\*- здесь и далее в таблицах титр антител представлен в обратных величинах

Таблица 4

Антигенная активность вакцины КОМБОВАК 4+Л с разным количественным составом компонентов в опыте на лабораторных животных

Вариант вакцины	Титр антител в сыворотке крови морских свинок к вирусам, M±m				Титр антител в сыворотке крови кроликов к лептоспирам
	ИРТ	ВД	РВ	КВ	
1	68,0±5,4	110,2±8,8	112,0±13,4	84,0±8,6	1632±142
2	85,4±10,2	134,0±12,5	128,0±15,9	108,4±10,2	2032±196
3	64,5±8,3	105,2±10,3	92,0±10,4	98,2±15,1	1424±148
контроль	-	-	-	-	-

Таким образом, все варианты вакцин обладали высокой антигенной активностью, как к вирусным компонентам, так и к лептоспирам. Антигенная активность первых трех вариантов вакцины КОМБОВАК 2+Л была практически одинаковой в отношении всех компонентов. У четвертого варианта вакцины антигенная активность была ниже, как к вирусному компоненту, так и к бактериальному, что мы связываем с увеличением гидрата окиси алюминия до 30%. Антигенная активность вакцины КОМБОВАК 4+Л была достаточно высокой по отношению ко всем компонентам во всех трех вариантах.

На основании полученных данных был сделан вывод об отсутствии интерференции между вирусными (вирус ИРТ, ВД, РВ, КВ) и бактериальным (лептоспиры) компонентами в составе данных ассоциаций. Оптимальной концентрацией гидрата окиси алюминия в вакцине считали 20%.

### 2.3. Изготовление и методы биологического контроля вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л

Для выполнения поставленной задачи изготовили по 3 серии инактивированных комбинированных вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л.

Все серии вакцин проверяли на стерильность, безвредность, полноту

инактивации вирусов и лептоспир, антигенную активность. Вакцины были стерильными, безвредными, не вызывали местных реакций и все животные оставались клинически здоровыми в течение срока наблюдения. Вирусы и лептоспиры в вакцине были полностью инактивированы.

Антигенную активность вакцин проверяли на кроликах (лептоспиры) и морских свинок (вирусы). Морских свинок, сформированных в группы по принципу аналогов (n=10 в каждой группе), иммунизировали подкожно однократно в дозах 0,25 мл, 0,5 мл и 1,0 мл, а кроликов (n=5) однократно внутривенно по 0,3 мл. В качестве контроля использовали чистых животных и животных, вакцинированных поливалентной вакциной ВГНКИ против лептоспироза животных (кролики) и вакциной «КОМБОВАК» (морские свинки), приготовленными нами из того же сырья по технологии коммерческих препаратов, доза и способ введения их предусмотрены соответствующими нормативными документами. Взятие крови проводили на 21-е сутки после вакцинации. Сыворотку крови морских свинок исследовали в РН (к КВ - в РТГА), кроликов - в РМА (табл. 5 и 6).

Таблица 5

Антигенная активность вакцины КОМБОВАК 2+Л  
на экспериментальных моделях

Номер серии	Доза препарата, мл	Титр антител к вирусам, М±m		Титр антител к лептоспирам
		ИРТ	ВД	
1	0,25	29,4±7,2	72,8±8,2	1024±268
2	0,5	84,6±6,4**	116,8±14,5**	1600±190**
3	1,0	60,5±5,8	90,5±9,4	1393±185
ВГНКИ	0,75	-	-	1838±202
Комбовак	1,0	89,8±6,2	110,5±15,4	-
контроль	-	0	0	0

Примечание: \*\* - здесь и далее в таблицах статистическая достоверность различий по отношению к контрольной группе, P < 0,05.

Таблица 6

Антигенная активность вакцины КОМБОВАК 4+Л  
на экспериментальных моделях

Номер серии	Доза препарата, мл	Титр антител к вирусам, М±m				Титр антител к лептоспирам
		ИРТ	ВД	РВ	КВ	
1	0,25	38,6±7,2	68,4±9,0	72,4±14,5	68,2±9,4	1436±152

2	0,5	89,5±9,4**	126,6±15,8**	140,2±20,5**	106,5±14,8**	1783±208**
3	1,0	72,4±5,8	102,5±10,4	110,4±16,5	94,2±13,4	1642±176
ВГНКИ	0,75	-	-	-	-	1887±246
Комбовак	1,0	94,6±12,2	124,5±14,8	135,5±17,2	108,4±15,6	-
контроль	-	0	0	0	0	0

Из данных таблицы 5 и 6 видно, что доза 0,25 мл является недостаточной для образования антител к вирусам ИРТ, ВД, РВ и КВ. Дозы 0,5 мл и 1,0 мл вызывают образование антител, примерно на одном уровне. Использование дозы 1,0 мл считаем нецелесообразно, так как это приводит к перенасыщению организма животных антигенами. Оптимальные результаты, по нашему мнению, получены при введении вакцины морским свинкам в дозе 0,5 мл.

По отношению к лептоспирам у всех серий препаратов отмечали достаточно высокий титр антител в сыворотке крови кроликов.

Полученные результаты позволили предложить метод контроля антигенной активности вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л, основанный на однократной вакцинации морских свинок и кроликов в дозах соответственно 0,5 мл и 0,3 мл с последующим взятием крови и исследовании сыворотки в серологических реакциях. Метод позволяет получить стабильный гуморальный иммунный ответ у животных, что отражает антигенную активность изучаемых препаратов, как к вирусным, так и к бактериальному компонентам.

#### **2.4. Контроль антигенной активности вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л в процессе хранения**

Приготовленные и проверенные по всем показателям образцы опытных серий вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л хранили в течение 24 месяцев при температуре 2<sup>0</sup>С – 8<sup>0</sup>С. Ежемесячно проводили визуальный контроль вакцин на предмет регистрации изменений внешнего вида и разбиваемости осадка.

Антигенную активность испытуемых вакцин определяли сразу после изготовления и в процессе хранения образцов в динамике через каждые 6 месяцев по уровню антител в сыворотке крови иммунизированных лабораторных животных, в качестве которых использовали морских свинок и кроликов.

Полученные результаты позволили установить, что наиболее оптимальным

сроком хранения вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л следует считать 18 месяцев с момента изготовления.

## **2.5. Оценка активности вакцины КОМБОВАК 2+Л на естественно-восприимчивых животных**

Поголовье крупного рогатого скота хозяйства было разделено по принципу аналогов на группы животных (n=30), которых вакцинировали внутримышечно двукратно с интервалом 14 суток в дозах 2,0 мл и 3,0 мл вакциной КОМБОВАК 2+Л за 2-3 недели до осеменения, во время осеменения и в период 1-3 месяцев стельности.

Кровь у животных брали в динамике после второй вакцинации через 1, 2, 4, 6, 8, 10 месяцев, получали сыворотку крови, которую исследовали на наличие антител в РН к вирусам ИРТ, ВД, РВ, в РТГА - к КВ, в РМА к лептоспирам, входящим в состав вакцины. Кроме того, по отношению к лептоспирам исследовали превентивные свойства сыворотки крови вакцинированных животных для золотистых хомячков.

У всех животных был выраженный иммунный ответ на введение вакцины, несмотря на достаточно высокий уровень вируснейтрализующих антител ко всем вирусам до вакцинации. При анализе полученных результатов учитывали прирост антител в два и более раз. Это позволило установить, что оптимальная доза вакцины по отношению к вирусным компонентам должна составлять 3,0 мл.

Оценка превентивной активности сыворотки крови вакцинированного крупного рогатого скота для золотистых хомячков к лептоспирам показала высокую степень защиты животных вакциной КОМБОВАК-2+Л на протяжении всего срока исследования. Более высокие результаты защиты были при использовании дозы 3,0 мл.

Несмотря на позитивность полученных результатов, мы решили отказаться от вакцинации животных во время осеменения и в период 1-3 месяцев стельности

в связи с наличием данных о возможности аборт, вызванных лептоспирами серовара hardjio, начиная с 4-х месяцев стельности коров (W.A. Ellis, 1985). Сдерживающим фактором применения вакцин в период 1-3 месяцев стельности является также наличие данных о преодолении плацентарного барьера вирусами ИРТ и ВД с последующей персистенцией у плода (Pactorett P.P., 1982, Miller J.M., 1986, Ноуе Н., 1996, Сергеев В.А., Верховский О.А., 2006).

Полученные результаты дают основание рекомендовать с целью профилактики абортов вирусной и лептоспирозной этиологии проводить вакцинацию коров двукратно внутримышечно с интервалом 14 суток за 2-3 недели до осеменения в дозе 3,0 мл.

## **2.6 Оценка гуморального иммунного ответа у глубокоостельных коров, иммунизированных вакцинами КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л, и телят**

Для определения антигенной активности и дозы вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л иммунизировали по 2 группы глубокоостельных коров (n=10) внутримышечно двукратно первый раз за 50-60 суток до предполагаемого отела, второй – через 2-3 недели, но не позднее 30 суток до отела в дозах 2,0 мл и 3,0 мл. Особо следили за прохождением отелов и своевременной, не позднее двух часов после отела, выпойкой молозива.

Кровь у коров брали до вакцинации и сразу после отела, у телят кровь брали на 7, 14, 30 и 45 сутки после рождения. Контролем служили телята аналогичного возраста, полученные от не вакцинированных коров.

Полученный материал исследовали на наличие антител к вирусам ИРТ, ВД, РВ - в РН, к КВ - в РТГА, к лептоспирам - в РМА, и к лептоспирам, кроме того, по превентивной активности сыворотки крови коров и телят для золотистых хомячков, зараженных 10 LD<sub>50</sub> вирулентного штамма лептоспир (табл. 7).

Из данных таблицы 7 следует, что при введении вакцин глубокоостельным коровам в дозе 2,0 мл и 3,0 мл отмечали иммунный ответ ко всем антигенам, входящим в состав вакцин. Наиболее высокий уровень антител и превентивной активности отмечали при введении вакцин в дозе 3,0 мл.

Таблица 7

**Антигенная и превентивная активность сыворотки крови стельных коров  
после иммунизации вакцинами КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л**

Сыворотка крови до/после вакцинации и в дозе	КОМБОВАК 2+Л				КОМБОВАК 4+Л					
	Титр антител к:			Превент. акт-ть, %	Титр антител к:					Превент. акт-ть, %
	вирусу ИРТ	ВД	лепто-спирам		вирусу ИРТ	ВД	РВ	КВ	лепто-спирам	
До вакц.	32	51	10	10	81	32	64	32	17	-
После (2,0 мл)	102	161	192	70	128	128	181	108	127	80
До вакц.	91	81	10	20	91	51	45	76	15	10
После (3,0 мл)	203	256	366	100	256	256	323	512	372	100

Результаты оценки колострального иммунитета у телят, полученных от стельных коров, иммунизированных вакцинами КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л, представлены в таблице 8 и 9.

Таблица 8

**Оценка колострального иммунитета у телят  
при использовании вакцины КОМБОВАК 2+Л**

Возраст телят, недель	Титр антител к вирусам при дозе вакцины (мл)				Превентивная активность сыворотки крови телят, % при дозе вакцины (мл)	
	ИРТ		ВД			
	2,0	3,0	2,0	3,0	2,0	3,0
Опытная группа**						
1	194,5±20,2	222,2±12,6	335,9±26,8	384,6±20,4	90	100
2	167,4±26,6	198,6±10,9	202,5±16,8	228,6±12,7	60	80
4	94,2±15,7	100,8±8,9	84,2±12,6	112,4±10,6	50	50
6	30,5±8,4	56,6±5,9	42,5±8,7	45,2±10,3	30	40
Контрольная группа						
1	32,6±7,4	38,9±8,6	34,5±6,2	64,0±10,8	0	0
2	15,8±4,2	12,2±2,6	18,7±5,8	10,7±5,7	0	0
4	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0

Наличие колострального иммунитета у телят, своевременно получавших молозиво от коров, иммунизированных в период стельности вакцинами

КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л, подтверждается высокими титрами специфических антител к вирусным компонентам и превентивной активностью к лептоспирам, которые сохранялись на протяжении всего срока наблюдения. Наиболее высокие

показатели отмечены при введении вакцин стельным коровам в дозе 3,0 мл.

Таблица 9

**Оценка колострального иммунитета у телят  
при использовании вакцины КОМБОВАК 4+Л**

Возраст телят, недель	Титр антител к вирусам при дозе вакцины 3,0 мл				Превентивная активность сыворотки крови телят, % при дозе вакцины (мл)	
	ИРТ	ВД	РВ	КВ	2,0	3,0
Опытная группа**						
1	406,2±36,0	256,0±36,8	361,2±26,4	866,2±41,1	80	90
2	362,4±28,5	81,6±22,5	162,5±22,8	521,3±34,2	60	70
4	161,1±25,6	68,3±12,4	128,0±18,4	64,0±22,1	40	60
6	62,5±21,9	36,2±10,6	62,3±16,4	32,0±15,6	20	40
Контрольная группа						
1	16,2±8,5	26,6±12,6	20,3±10,1	24,3±8,9	0	20
2	10,2±4,6	12,1±4,2	8,3±5,5	10,7±5,7	0	0
4	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0

На основании проведенных исследований установлена зависимость между содержанием специфических колостральных антител в сыворотке крови телят и титром специфических антител в сыворотке крови вакцинированных матерей, причем данная зависимость подтверждена ко всем компонентам вакцины.

**2.7 Определение иммунизирующей дозы вакцин  
КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л для телят**

Телят в возрасте 40-45 суток, рожденных от не вакцинированных матерей, формировали в 3 группы по 20 голов в каждой, из них 2 группы опытных животных и 1 – контрольная (не вакцинированные телята). Телятам опытных групп исследуемые вакцины вводили внутримышечно двукратно с интервалом 20-25 суток в дозе 1,0 мл и 2,0 мл.

Перед введением препарата и через 21 сутки после первой и второй

вакцинации у всех животных брали кровь и определяли уровень специфических антител в сыворотке крови в РН (к КВ - в РТГА) и превентивную активность сыворотки крови вакцинированных телят для золотистых хомячков.

Полученные результаты показали, что иммунизация телят вакцинами КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л приводит к формированию выраженного иммунного ответа и статистически достоверному приросту антител и повышению превентивной активности сыворотки крови вакцинированных животных.

Наиболее высокие титры вируснейтрализующих антител и превентивная активность сыворотки крови выявляются у телят на 21-е сутки после второй вакцинации при введении вакцины в дозе 2,0 мл.

## **2.8 Применение вакцин КОМБОВАК-2+Л и КОМБОВАК-4+Л в производственных условиях**

Изучение эффективности инактивированных комбинированных вакцин провели в одном из хозяйств Московской области, неблагополучном по ИРТ, ВД, РВИ, КВИ и лептоспирозу. Вакцинация в хозяйстве против указанных инфекций в предшествующие работе несколько лет не проводилась.

Нашей задачей было оценить уровень защитных вируснейтрализующих антител в сыворотке крови и молозиве вакцинированного крупного рогатого скота, в сыворотке крови телят, полученных от иммунизированных коров. Для выполнения данной задачи вакцинировали стельных коров (n=30 на каждый препарат) внутримышечно двукратно в дозе 3,0 мл – первый раз за 50-60 суток до отела, второй раз через 3 недели после первой иммунизации, но не позднее 30 суток до отела. Кровь и молозиво у коров брали сразу после отела, а у телят (n=30) через 7-14 суток после рождения. В качестве контроля использовали телят (n=10), рожденных от не вакцинированных животных (рис. 3 и 4).

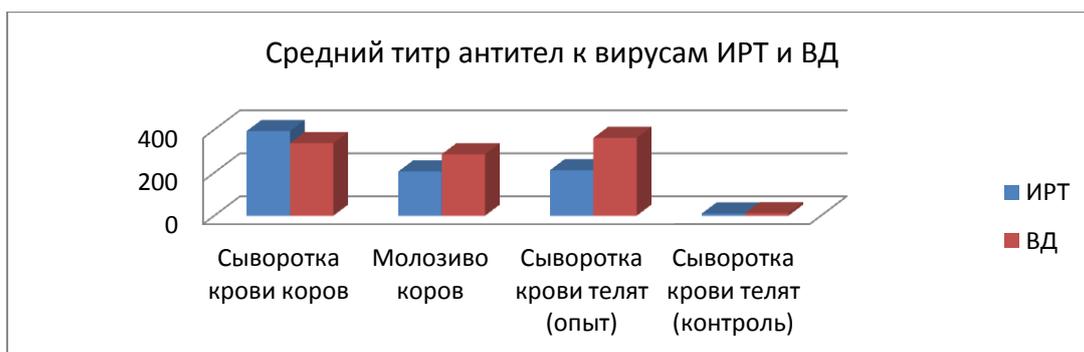


Рисунок 3. Уровень антител в сыворотке крови и молозиве коров, вакцинированных вакциной КОМБОВАК 2+Л, и в сыворотке крови их телят.

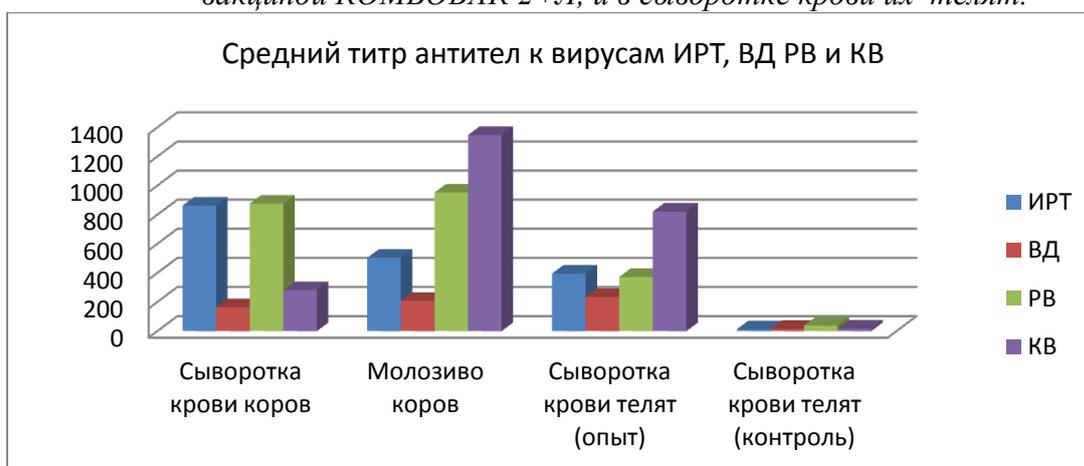


Рисунок 4. Уровень антител в сыворотке крови и молозиве коров, вакцинированных вакциной КОМБОВАК 4+Л, и в сыворотке крови их телят.

На рисунке 3 и 4 видно, что в сыворотке крови и молозиве вакцинированных коров после отела отмечен высокий уровень защитных вируснейтрализующих антител. У телят, рожденных от иммунизированных коров, уровень защитных антител к соответствующим возбудителям, входящим в состав вакцин был в 9-41 раз выше, чем у телят, полученных от не иммунизированных животных, что еще раз подтверждает высокий иммунный статус вакцинированных коров.

Превентивная активность сыворотки крови телят, полученных от коров, иммунизированных вакцинами КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л, составляла 100%, тогда как сыворотка крови телят от не вакцинированных коров защищала только 20% хомячков, что говорит о возможности инфицирования телят лептоспирами с последующим лептоспиросительством.

### 3. ВЫВОДЫ

1. Мониторинг распространенности и этиологической структуры лептоспироза крупного рогатого скота на территории Российской Федерации за период с 1996 по 2011 гг. показал, что лептоспироз распространен во всех регионах РФ. Этиологическая структура лептоспироза КРС в РФ представлена лептоспирами серологических групп Sejroë (21,0%), Hebdomadis (20,5%), Grippotyphosa (7,1%), Tarassovi (7,0%) и Pomona (5,7%).

2. Инфицированность крупного рогатого скота по РФ составила 19,3%. Отмечена четкая тенденция к снижению инфицированности лептоспирозом крупного рогатого скота с 25,1% в 1996 г до 9,4% в 2011 г.

3. Определен состав вакцины для профилактики абортос инфекционной этиологии у крупного рогатого скота и создания колострального иммунитета у телят - КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л на основе двух (вирусы ИРТ, ВД) – четырех (вирусы ИРТ, ВД, РВ, КВ) вирусов и лептоспир серологических групп Grippotyphosa, Tarassovi, Pomona и Sejroë.

4. Экспериментальным путем подобраны оптимальные соотношения вирусных и бактериального компонентов в вакцинах КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л, которые исключают процессы интерференции между антигенами. Отработана схема изготовления вакцины. В качестве адъюванта использован гидрат окиси алюминия.

5. В опытах на лабораторных животных установлено, что разработанные вакцины безвредны, обладают выраженной антигенной и иммуногенной активностью и обеспечивают формирование гуморального иммунного ответа у морских свинок и кроликов, а также стабильно сохраняют все биологические свойства в течение срока хранения.

6. В опытах на естественно-восприимчивых животных разработаны схемы применения, сроки вакцинации и оптимальная иммунизирующая доза инактивированных комбинированных вакцин КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л. Иммунизирующая доза для коров составила 3,0 мл, а для телят – 2,0 мл.

7. С целью профилактики и предотвращения абортосиндромов инфекционной этиологии у коров вакцину КОМБОВАК 2+Л применяют двукратно с интервалом 14 суток за 2-3 недели до осеменения. С целью создания колострального иммунитета у потомства вакцинируют глубокопородистых коров вакцинами КОМБОВАК 2+Л и КОМБОВАК 4+Л двукратно за 50-60 суток до отела. Уровень специфических антител в 9-41 раз выше у телят, полученных от вакцинированных коров, чем у телят, полученных от не иммунизированных животных. Также у телят от вакцинированных коров высокий уровень превентивной активности сыворотки крови.

#### **4. ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ**

Материалы исследований по разработке и применению инактивированных комбинированных вакцин вошли в следующие нормативные документы:

- внесены изменения в Технологический регламент на «Вакцины инактивированные против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота- и коронавирусной болезнью крупного рогатого скота (КОМБОВАК)»;

- СТО «Вакцины инактивированные против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота- и коронавирусной болезнью крупного рогатого скота (КОМБОВАК)»;

- Инструкцию по применению вакцины инактивированной комбинированной против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и лептоспироза крупного рогатого скота (КОМБОВАК 2+Л);

- Инструкцию по применению вакцины инактивированной комбинированной против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусных болезнью и лептоспироза крупного рогатого скота (КОМБОВАК 4+Л);

- СТО «Штаммы производственные вирусов инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиального, рота- и коронавируса крупного рогатого скота»

- СТО «Производственные штаммы лептоспир».

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

1. Концевая Н.Н. Новые препараты для специфической профилактики лептоспироза крупного рогатого скота / Н.Н. Концевая // Материалы конференции «Диагностика, профилактика и лечение лептоспироза людей и животных». – Москва, 2007. – с. 30-31.

2. Концевая Н.Н. Специфическая профилактика абортос у крупного рогатого скота / Н.Н. Концевая // Десятый Международный конгресс специалистов ветеринарной медицины – Украина (4-5 октября 2012) – с. 100-101.

3. Kontsevaya N.N. Specific prophylaxis of abortion in cattle / Kontsevaya N.N., Soboleva G.L. // European meeting of leptospirosis – Dubrovnik (31 May- 2 June 2012) – p. 103-104.

4. Концевая Н.Н. Инактивированные комбинированные вакцины для профилактики инфекционных абортос коров / Н.Н. Концевая, Г.Л. Соболева, И.В. Непоклонова, Т.И. Алипер // Ветеринария –2013. – № 11 - с. 10-16.

5. Сергеев В.А. Вакцина инактивированная комбинированная против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и лептоспироза крупного рогатого скота. / В.А. Сергеев, Е.А. Непоклонов, Т.И. Алипер, Г.Л. Соболева, Н.Н. Концевая, М.А. Корицкая // патент на изобретение RUS 2395297 от 31.03.2009.

6. Сергеев В.А. Вакцина инактивированная комбинированная против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота-, коронавирусной болезней и лептоспироза крупного рогатого скота. / В.А. Сергеев, Е.А. Непоклонов, Т.И. Алипер, Г.Л. Соболева, Н.Н. Концевая, М.А. Корицкая // патент на изобретение RUS 2395299 от 31.03.2009.