

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ  
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР - ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНО-  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ  
ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ К.И. СКРЯБИНА И Я.Р. КОВАЛЕНКО  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

*На правах рукописи*

**Шемелькова Галина Олеговна**

**ВЫДЕЛЕНИЕ И АНАЛИЗ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ АДЕНОВИРУСА  
КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА В КАЧЕСТВЕ КОМПОНЕНТА  
ИНАКТИВИРОВАННОЙ КОМБИНИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ**

06.02.02 «Ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология, микология с  
микотоксикологией и иммунология»

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

Научный руководитель:  
член-корреспондент РАН,  
доктор биологических наук, профессор  
Забережный Алексей Дмитриевич

Москва – 2020 г.

## СОДЕРЖАНИЕ:

|          |                                                   |    |
|----------|---------------------------------------------------|----|
| 1.       | Введение.                                         | 4  |
| 2.       | Обзор литературы.                                 | 12 |
| 2.1.     | Аденовирусная инфекция крупного рогатого скота.   | 12 |
| 2.1.1.   | Возбудитель.                                      | 13 |
| 2.1.2.   | Эпизоотологические данные.                        | 20 |
| 2.1.3.   | Патогенез и клинические признаки.                 | 21 |
| 2.1.4.   | Патологоанатомические изменения.                  | 22 |
| 2.1.5.   | Диагностика.                                      | 23 |
| 2.1.6.   | Профилактика.                                     | 24 |
| 2.1.7.   | Лечение.                                          | 25 |
| 2.2.     | Вакцинация. Вакцины. Адьюванты.                   | 26 |
| 2.2.1.   | Особенности развития вторичного иммунного ответа. | 27 |
| 2.2.2.   | Классификация вакцин.                             | 31 |
| 2.2.2.1. | Живые вакцины.                                    | 32 |
| 2.2.2.2. | Инактивированные вакцины.                         | 34 |
| 2.2.3.   | Основные типы адьювантов.                         | 35 |
| 2.2.4.   | Заключение.                                       | 42 |

## СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

|      |                                                                                                                                                                                                   |    |
|------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.   | Материалы и методы.                                                                                                                                                                               | 43 |
| 4.   | Выделение и идентификация полевого изолята аденовируса КРС. Оптимизация технологии его культивирования, оценка биологических свойств. Отработка методов инактивации. Изучение антигенных свойств. | 59 |
| 4.1. | Выделение и идентификация полевого изолята аденовируса КРС.                                                                                                                                       | 59 |
| 4.2. | Оптимизация технологии культивирования аденовируса КРС, оценка его биологических свойств.                                                                                                         | 61 |

|      |                                                                                                                                                                                                                                               |     |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.3. | Отработка методов инаktivации выделенного аденовируса КРС.                                                                                                                                                                                    | 64  |
| 4.4. | Изучение антигенных свойств инаktivированного штамма «Альфа» аденовируса КРС.                                                                                                                                                                 | 66  |
| 5.   | Разработка родоспецифичной тест-системы ПЦР для выявления ДНК аденовируса КРС.                                                                                                                                                                | 68  |
| 6.   | Изучение эпизоотической ситуации по основным респираторным и желудочно-кишечным заболеваниям телят вирусной этиологии в хозяйствах РФ.                                                                                                        | 73  |
| 7.   | Разработка инаktivированной комбинированной вакцины против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота-, коронавирусной болезней и аденовирусной инфекции крупного рогатого скота КОМБОВАК-А. | 77  |
| 7.1. | Оптимизация состава вакцины. Оценка ее безвредности и антигенных свойств.                                                                                                                                                                     | 77  |
| 7.2. | Подбор оптимальной иммунизирующей дозы вакцины для взрослых животных и телят.                                                                                                                                                                 | 85  |
| 7.3. | Оценка колострального иммунитета и эффективности вакцины.                                                                                                                                                                                     | 86  |
| 7.4. | Оценка стабильности физических и иммунобиологических свойств вакцины в процессе хранения (в течение срока годности).                                                                                                                          | 89  |
| 8.   | Обсуждение.                                                                                                                                                                                                                                   | 92  |
| 9.   | Заключение и Выводы.                                                                                                                                                                                                                          | 108 |
| 10.  | Практические предложения.                                                                                                                                                                                                                     | 113 |
| 11.  | Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы.                                                                                                                                                                                        | 114 |
| 12.  | Список сокращений.                                                                                                                                                                                                                            | 115 |
| 13.  | Список использованной литературы.                                                                                                                                                                                                             | 117 |
| 14.  | Приложения.                                                                                                                                                                                                                                   | 132 |

## 1. Введение.

**Актуальность темы.** Семейство аденовирусов является одним из самых больших и насчитывает более 100 видов, которые вызывают заболевания практически у всех теплокровных животных. Этиологическое значение аденовируса в развитии различных серьезных патологий инфекционного характера доказано для человека, многих видов домашних животных и птиц. Разработаны и успешно применяются соответствующие вакцинные препараты [24, 64].

Роль аденовируса крупного рогатого скота в патогенезе респираторных и желудочно-кишечных заболеваний в настоящее время является предметом дискуссии, поскольку до конца не определена его первостепенность в развитии патологического процесса. То есть является ли аденовирус первопричиной заболевания, на фоне которого (в том числе и за счет его общего иммуно-супрессивного воздействия на организм животного) развиваются вторичные инфекции. Или аденовирусная инфекция является по своей сути вторичной и начинает проявляться только на фоне воздействия других микробиологических агентов, стресса или иных неблагоприятных факторов, снижающих общую резистентность организма животного [2, 34, 53, 67, 134].

Аденовирусная инфекция крупного рогатого скота протекает с поражением органов дыхания и пищеварения, глаз, лимфоидной ткани. У взрослых животных, как правило, протекает бессимптомно, при этом они могут являться вирусоносителями и источником возбудителя для телят. Наиболее тяжело и остро болеет молодняк 2-3 недельного возраста, также заболеванию подвержены телята до четырех месячного возраста [9].

Одним из факторов, осложняющих диагностику аденовируса крупного рогатого скота, является большое количество его типов, характеризующихся генетическим разнообразием. В настоящий момент классифицировано 11 типов аденовируса КРС, относящихся к родам *Mastadenovirus* и *Atadenovirus*.

Современным методом, позволяющим быстро и достоверно установить наличие любого возбудителя в исследуемом материале является - обнаружение

ДНК при помощи полимеразной цепной реакции. Особенно часто ее применяют при осуществлении мониторинга биозагрязненности окружающей среды и для выявления источников аденовируса [52, 99, 138]. В Европейском союзе при проведении скрининговых исследований фекалий КРС с целью выявления источников биологического загрязнения окружающей среды ДНК аденовируса КРС была выявлена в 75-90% исследуемых проб [113, 127].

Чаще аденовирусная инфекция протекает в виде смешанной респираторной и/или желудочно-кишечной инфекции в ассоциации с другими патогенами: вирусами вирусной диареи, инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, респираторно-синцитиальным вирусом, рота- и коронавирусами КРС, пастереллами, эшерихиями, манheimией, микоплазмой и т.д. Ввиду такой полиэтиологичности инфекций и невозможности разграничения ведущей роли того или иного агента в развитии патологии, наиболее эффективным методом специфической профилактики подобных смешанных заболеваний является применение комбинированных вакцин, содержащих антигены сразу нескольких из указанных возбудителей [16, 74]. Вакцинации подвергают стельных коров для создания у новорожденного потомства пассивного колострального иммунитета, а также телят с 2-3 недельного возраста для создания активного поствакцинального иммунитета [17, 48]. В настоящее время имеется ряд поливалентных вакцин против двух, трех и более указанных респираторных и/или кишечных вирусных заболеваний телят, но эти вакцины не содержат в своем составе аденовирусный компонент.

В животноводстве наиболее широкое распространение получили инаktivированные вакцинные препараты, которые в своем составе содержат два обязательных компонента: антиген (смесь антигенов), отвечающий за специфичность иммунного ответа и адъювант, отвечающий за силу и продолжительность этого ответа [32]. Наряду с традиционно используемыми в ветеринарной практике гидроокисью алюминия и масляными адъювантами во всем мире ведутся широкомасштабные исследования по изучению адъювантных

свойств новых веществ и соединений, которые бы позволили повысить эффективность и обеспечить безопасность вакцинных препаратов [55, 120].

### ***Степень разработанности темы исследования.***

В нашей стране проблеме аденовирусной инфекции КРС и изучению самого возбудителя было уделено достаточно пристальное внимание, в результате многочисленных исследований, в том числе, были разработаны: латексный эритроцитарный диагностикум для обнаружения антител к аденовирусу КРС, иммуноферментная тест-система для выявления антител к аденовирусам крупного рогатого скота, инактивированная вакцина против аденовирусной инфекции КРС, ассоциированная инактивированная вакцина против аденовирусной инфекции и вирусной диареи крупного рогатого скота, усовершенствован метод серодиагностики аденовирусной инфекции КРС в РНГА [4, 5, 7, 23].

На момент начала наших исследований в Российской Федерации отсутствовали вакцины, содержащие аденовирусный компонент, имеющие действующее регистрационное удостоверение и разрешенные для практического применения.

### ***Цель работы.***

Выделение и изучение биологических свойств полевых изолятов аденовируса КРС, циркулирующих на территории РФ для включения в состав комбинированной вакцины.

### ***Основные задачи исследований:***

1. Изучить эпизоотическую ситуацию по основным респираторным и желудочно-кишечным заболеваниям телят вирусной этиологии в хозяйствах РФ, выявить роль аденовирусной инфекции в структуре данных заболеваний.
2. Провести выделение и идентификацию полевых изолятов аденовируса КРС, изучить их биологические и антигенные свойства, оптимизировать условия культивирования.
3. Разработать тест-систему ПЦР для выявления ДНК аденовируса КРС. Изучить ее чувствительность и специфичность на клиническом материале от естественно-восприимчивых животных.

4. Разработать подходы к изготовлению и методы биологического контроля аденовирусного компонента в составе поливалентной вакцины.

5. Провести сравнительный анализ существующих адъювантов и оптимизировать состав многокомпонентной вакцины против основных респираторных и желудочно-кишечных заболеваний телят вирусной этиологии.

6. Изучить формирование поствакцинального гуморального иммунного ответа у лабораторных и естественно-восприимчивых животных на введение экспериментальных образцов многокомпонентной вакцины, после включения в ее состав аденовирусного компонента и нового адъюванта. Отработать оптимальные иммунизирующие дозы и схемы вакцинации КРС.

7. Провести оценку формирования колострального иммунитета и эффективности применения вакцины в животноводческих хозяйствах, неблагополучных по респираторным и кишечным инфекционным заболеваниям КРС.

#### ***Научная новизна работы.***

Выделен и адаптирован к перевиваемой культуре клеток полевой штамм аденовируса КРС I-го типа, изучены его биологические, в том числе антигенные свойства.

Разработана собственная родоспецифическая тест-система для выявления ДНК аденовируса КРС и дифференциации родов *Mastadenovirus* и *Atadenovirus*.

Представлены новые обобщенные данные о распространенности основных вирусных респираторных и желудочно-кишечных болезней телят в период с 2010 по 2019 годы на территории РФ.

Впервые дана сравнительная оценка влияния различных адъювантов (коммерческих продуктов: ISA 50, ISA 61, ISA 70, ISA 71, ISA 206, ISA 773, ГОА с добавлением сапонины и экспериментальных разработок: ISCOM, полисахаридные адъюванты грибного и растительного происхождения, а также высокомолекулярного синтетического полиэлектrolита (карбомер 971) со смесью поверхностно-активных гликозидов) на формирование поствакцинального гуморального иммунного ответа у лабораторных и естественно-восприимчивых

животных. Показан различный иммуностимулирующий эффект адъювантов при включении их в состав вакцин против инфекционных болезней КРС.

В ходе проведенных исследований был подобран эффективный и безопасный адъювант, который вошел в состав поливалентной вакцины, предназначенной для специфической профилактики инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота-, коронавирусной болезней и аденовирусной инфекции крупного рогатого скота.

### ***Теоретическая и практическая значимость исследований.***

Для биологической промышленности получен и охарактеризован новый производственный штамм аденовируса КРС I-го типа «Альфа», депонированный в Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, номер депонента ГКВ № 2732.

Для проведения диагностических исследований предложена тест-система для обнаружения ДНК аденовируса КРС с помощью полимеразной цепной реакции.

Представлен сравнительный анализ различных типов адъювантов, который позволяет подобрать наиболее оптимальный из них для конструирования и последующего производства инактивированных вакцин против инфекционных болезней КРС.

Для ветеринарной практики разработана методика получения аденовирусного вакцинного компонента, который вошел в состав семивалентной инактивированной комбинированной вакцины против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота-, коронавирусной болезней и аденовирусной инфекции крупного рогатого скота КОМБОВАК-А.

Разработаны и обоснованы методы контроля многокомпонентной вакцины, содержащей аденовирусный компонент и новый адъювант. Экспериментально установлена безвредность, антигенная и иммуногенная активность препарата для



лабораторных и естественно-восприимчивых животных и возможность ее использования для формирования колострального иммунитета у телят. Установлено, что применение разработанного вакцинного препарата в условиях животноводческих хозяйств, неблагополучных по респираторным и кишечным инфекционным заболеваниям, влечет протективный эффект, снижая показатели заболеваемости и смертности телят, и увеличивает рентабельность производства в целом.

Вакцина КОМБОВАК-А производится в ООО «Ветбиохим» (г. Москва) и применяется с 2014 года в соответствии с нормативной документацией, утвержденной в установленном порядке. В 2019 году вакцина прошла обязательное подтверждение государственной регистрации, по результатам которого получено бессрочное регистрационное удостоверение. За 6 лет производства вакцины было выпущено для практического применения более 4 миллионов доз препарата.

**Методология и методы исследования.** Методология диссертационной работы спланирована в соответствии со структурой и задачами. Предметом научного исследования стало выделение и изучение биологических свойств полевых изолятов аденовируса КРС, включение в состав вакцины против основных вирусных заболеваний КРС аденовирусного компонента и нового адъюванта. В качестве объектов исследования использовали лабораторных и естественно-восприимчивых животных, а также пробы биологического материала (носовые и конъюнктивальные смывы, пробы сыворотки крови), полученные от них. Научная литература, касающаяся тематики исследования, была проанализирована формально-логическими методами.

В работе были использованы серологические, иммунологические, клинические, статистические методы исследований, методы биотехнологии, молекулярной диагностики и другие научно-исследовательские методы.

**Личный вклад соискателя.** Работа выполнена соискателем самостоятельно.

Автор приносит благодарность за оказание научно-методической помощи в организации и проведении исследований заведующему лабораторией болезней

свиной ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН д.б.н., профессору Алиперу Т.И., д.б.н., ученому секретарю диссертационного совета ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН Ездаковой И.Ю., д.б.н. Соболевой Г.Л., д.б.н., профессору Верховскому О.А., к.б.н. Корицкой М.А., к.б.н. Южакову А.Г., к.в.н. Иванову Е.В., а также всем сотрудникам отделения контроля качества ООО «Ветбиохим».

***Степень достоверности и апробация результатов исследования.***

Результаты работы были получены при использовании сертифицированного оборудования и определяются достаточным количеством проведенных исследований на большой выборке лабораторных и естественно-восприимчивых животных. Достоверность результатов подтверждена статистической обработкой данных. Значения критерия достоверности оценивали по таблице вероятностей Стьюдента-Фишера.

Основные положения диссертационной работы доложены на: Международной конференции "AGRITECH 2019" (г. Красноярск, 2019 г.); Научно-практической конференции, посвященной 115-летию со дня основания ВИЭВ: «Состояние и перспективы развития ветеринарной науки России», (г. Москва, 2013г.); научно-производственных совещаниях ООО «Ветбиохим» и АНО «НИИ ДПБ» (г. Москва, 2010-2020 гг.); межлабораторном совещании сотрудников ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН (г. Москва, 2020 г.).

***Публикации.*** По материалам диссертации опубликованы 4 научные работы, в том числе 2 работы в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, 1 работа в журнале, индексируемом в базе SCOPUS.

***Структура и объем диссертации.*** Диссертация изложена на 134 стр. машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследований, результатов собственных исследований и их обсуждения, выводов, практических предложений, рекомендаций и перспектив дальнейшей разработки темы, списка литературы и приложений. Материалы диссертации иллюстрированы 16 таблицами и 16 рисунками. Список литературы включает 142 источника (48 отечественных и 94 зарубежных авторов).

**Основные положения, выносимые на защиту.** Полученные экспериментальные данные позволяют вынести на защиту следующие основные положения:

- результаты изучения биологических, в т.ч. антигенных свойств выделенного полевого штамма аденовируса КРС I-го типа;
- результаты разработки и испытания диагностической тест-системы ПЦР, предназначенной для выявления ДНК аденовирусов КРС, относящихся к родам *Mastadenovirus* и *Atadenovirus* в биологическом материале КРС;
- данные о распространенности основных вирусных респираторных и желудочно-кишечных болезней телят, включая аденовирусную инфекцию, в период с 2010 по 2019 годы на территории РФ.
- результаты исследований по сравнительной оценке иммуностимулирующего эффекта различных типов адъювантов в составе инаktivированной комбинированной вакцины против инфекционных болезней КРС;
- подходы к изготовлению и методы биологического контроля аденовирусного компонента в составе поливалентной вакцины;
- результаты оценки эффективности применения семикомпонентной вакцины, включающей аденовирусный компонент, для специфической профилактики респираторных и кишечных инфекционных заболеваний телят в производственных условиях.

## 2. Обзор литературы.

### 2.1. Аденовирусная инфекция крупного рогатого скота.

Аденовирусная инфекция крупного рогатого скота (*Bovine adenoviral infection*) - остро протекающая болезнь телят, характеризующаяся поражением органов дыхания, пищеварения, лимфоидной ткани и конъюнктивитом [8, 9, 38]. Чаще болеют телята от 2-недельного до 4-месячного возраста, наиболее остро заболевание протекает у молодняка 2-3 недельного возраста [11, 22, 35]. У взрослого скота аденовирусная инфекция, как правило, протекает в латентной форме, ее клиническое проявление могут спровоцировать следующие факторы: стресс, нарушения зоогигиенических условий содержания, ослабление организма другими вирусами, прочие неблагоприятные факторы [7, 38, 68].

Установлено, что аденовирусы в целом являются иммунодепрессантами и способствуют развитию других инфекционных патологий [16, 91]. В настоящее время до конца не выяснена роль аденовируса КРС в развитии комплексной респираторной и/или кишечной патологии телят инфекционного происхождения – является ли аденовирусная инфекция вторичной, развивающейся на фоне воздействия других вирусов. Или же аденовирус является одним из спусковых крючков, снижающих резистентность организма и открывающим путь другим инфекционным агентам, в том числе и бактериальной природы [71, 74, 97].

Adair и коллеги, проведя изучение влияния аденовируса КРС I-го типа (BAdV-1) на альвеолярные макрофаги КРС *in vitro*, установили, что его воздействие на клетки уменьшает экспрессию Fc-рецепторов, снижает функциональную активность системы комплемента и в целом, снижает фагоцитарную активность в отношении *Candida krusei* [51].

Несмотря на не совсем определенную роль (первичного или вторичного фактора) аденовируса КРС в развитии инфекционных патологий, он часто является одним из этиологических агентов смешанных респираторных и/или кишечных заболеваний телят, выступая в ассоциации с другими вирусными (вирусом вирусной диареи, инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, респираторно-синцитиальным вирусом, рота- и коронавирусами КРС),

бактериальными (пастереллы, эшерихии, манхемия) агентами и/или микоплазмами [4, 18, 36, 74, 101].

### 2.1.1. Возбудитель.

Аденовирус КРС впервые был выделен в 1959 г в США (Klein et al.), относится к семейству *Adenoviridae* [39]. Название семейства произошло от древнегреческого слова *adénes*, переводящегося как железы (железа), поскольку впервые аденовирус человека был выделен в 1953 году из тканей удаленных при операции гланд у детей (W.P. Rowe). В последующем аденовирусы КРС были выделены в 1965 году в Англии (Darbyshire et al.), в 1966 году в Венгрии (Bartha A., Aldasy P.), в 1966 году в Голландии (Rondhuis et al.), в 1970 году в Японии, затем и в других странах. В СССР выделением и изучением аденовируса КРС занимались Алиева Н.А. (1967 г.), Гуненков В.В. (1972 г.), Белоусова Р.В. (1984-1987 г.г.) [23, 53].

До настоящего момента всего классифицировано 11 типов аденовируса КРС (*Bovine adenovirus*, BAdV), относящихся к родам *Mastadenovirus* (BAdV-1, -2, -3, -9 и -10) и *Atadenovirus* (BAdV-4, -5, -6, -7, -8 и -Rus) [75, 94, 98, 133]. Род *Mastadenovirus* получил свое название от древнегреческого *mastikó adéna* – молочная железа, род *Atadenovirus* получил свое название из-за того, что в ДНК представителей этого рода содержится большое количество пар А- и Т-нуклеотидов [24, 68].

Внутри каждого рода все аденовирусы были разделены на виды название которых включало вид преобладающего хозяина, название вируса и латинскую букву А, В, С и т.д [94]. Так вид *Bovine adenovirus* А (BAdV-A) включал тип BAdV-1; BAdV-B включал тип BAdV-3; BAdV-C включал тип BAdV-10; BAdV-D включал типы BAdV-4, -5, -8, -Rus. При этом часть типов аденовируса КРС были отнесены к видам, в названии которых был другой хозяин: BAdV-2 входил в вид *Ovine adenovirus* А (OAdV-A); тип BAdV-9 входил в вид *Human adenovirus* С (HAdV-C). Типы BAdV-6 и -7 не были отнесены к какому-либо виду [24, 65, 94].

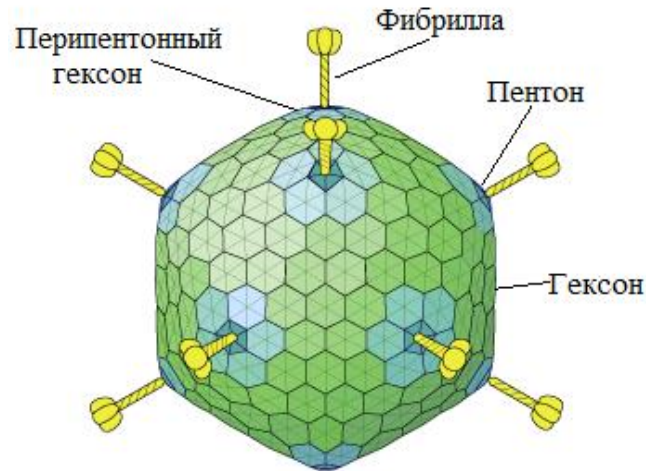
В 2013 году в целях упрощения классификации аденовирусов международный комитет по таксономии вирусов (ICTV) принял решение об

изменении названия видов всех аденовирусов (код постановления: 2013.003aV), вводя в название указание рода. По новой таксономии было введено 4 вида аденовируса КРС: *Bovine mastadenovirus A* (включает тип BAdV-1), *Bovine mastadenovirus B* (BAdV-3), *Bovine mastadenovirus C* (BAdV-10) и *Bovine atadenovirus D* (BAdV-4, -5, -8, - Rus). Типы BAdV-2 и BAdV-9 были включены в виды *Ovine mastadenovirus A* и *Human mastadenovirus C* соответственно [92]. В 2015 в международный комитет по таксономии вирусов было внесено предложение классифицировать еще два вида аденовируса КРС *Bovine atadenovirus E* (который бы включал BAdV-6) и *Bovine atadenovirus F* (который бы включал BAdV-7), но это предложение пока не утверждено, хотя в базе данных GenBank уже имеется полногеномный сиквенс аденовируса КРС BAdV-6. При этом допускается старое использование названий вирусов, штаммов, изолятов [88, 93, 95, 109].

Вирионы аденовируса КРС имеют структуру типичную для всех представителей семейства *Adenoviridae* и представляют собой изометрические частицы диаметром 70-90 нм, состоящие из сердцевины, (содержащей ДНК и белки) и икосаэдрического капсида, суперкапсидная оболочка отсутствует [7, 24, 117].

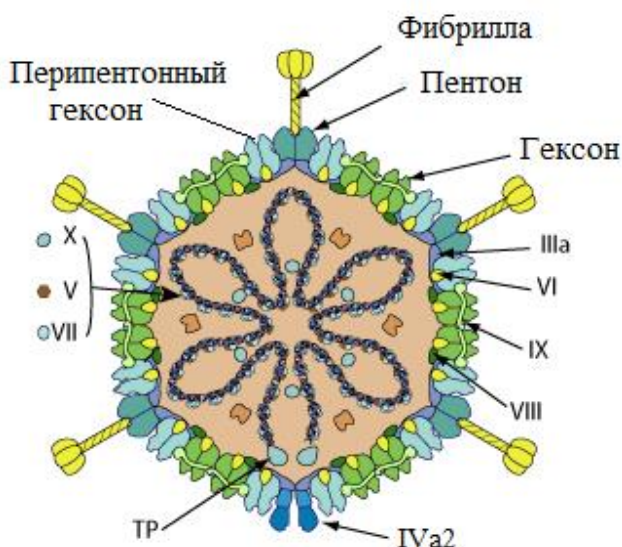
Капсид имеет икосаэдрическую симметрию и состоит из 252 капсомеров, 240 из которых гексоны, образующие 20 триангулярных граней, а 12 – пентоны. Пентоны располагаются на вершинах икосаэдра, состоят из двух субъединиц: основания, закрепленного в капсиде, и отростка (фибриллы) длиной 9-78 нм, выступающего за пределы капсида, на конце которого имеется булавовидное утолщение [23, 24, 117, 132], рисунок 1.

*Капсид аденовируса (ViralZone, Swiss Institute of Bioinformatics)[131]*



Гексон является наиболее изученным основным структурным белком аденовируса. Каждый гексон в капсиде имеет шестиугольную форму и соответственно окружен шестью другими такими же гексонами, за исключением перипентонных гексонов, которые в комплексе из пяти штук окружают пентон. Гексон состоит из трех одинаковых белков (белок II, 110-120 кДа каждый). Белок II имеет сложную антигенную структуру и составляет основную массу белка вирионов. При аденовирусной инфекции гексон накапливается в больших количествах, при этом от 70 до 90% его не участвует в построении вириона, а остается в виде растворенного антигена, структурно и иммунологически идентичного гексону, входящему в состав вириона [4, 21, 23, 24, 95, 124, 125].

Пентон состоит из 5 белков (белок III, 85 кДа), обладает выраженной эндонуклеазной активностью, что обеспечивает токсическую активность аденовируса. Белок III чувствителен к действию протеолитических ферментов и вызывает ранний цитопатический эффект. Белки IIIa (66 кДа) и VI (24 кДа) придают стабильность связи пентона с перипентонными гексонами [4, 24, 59, 124, 136], рисунок 2.



Белок VIII (13 кДа) обеспечивает дополнительную структурную устойчивость вириону аденовируса, располагаясь с внутренней стороны капсида. Белок IX (12 кДа) - компонент вириона, образующий трискелионные структуры, состоящие из трех молекул, которые стабилизируют три гексоновых тримера в центре каждой икосаэдрической грани фиксируя гексоны [24, 59, 95, 124, 125].

Фибрилла состоит из трех гликолизированных белковых молекул (белок IV, 62 кДа), отвечает за распознавание рецепторов на клеточной мембране и адсорбцию вирионов на поверхности клетки [4, 24].

Белки V (48,5 кДа), VII (18,5 кДа) и X (10 кДа) располагаются в сердцевине вириона и обеспечивают правильную укладку молекулы ДНК внутри капсида. Белок IVa2 обеспечивает инкапсулирование вирусного генома в предварительно собранный капсид или пре-капсид при сборке новых вирионов аденовируса [24, 59, 111, 136].

Наиболее изученные антигенные детерминанты аденовируса располагаются в гексоне и пентоне (включая фибриллы), которые в том числе содержат: родо-, групповые, межгрупповые, подгрупповые и типоспецифические антигенные детерминанты [24, 80, 94].

Гексон в своем составе содержит родоспецифическую ( $\alpha$  – ориентирована внутрь вириона) и типоспецифическую ( $\epsilon$  - экспонирована на поверхности

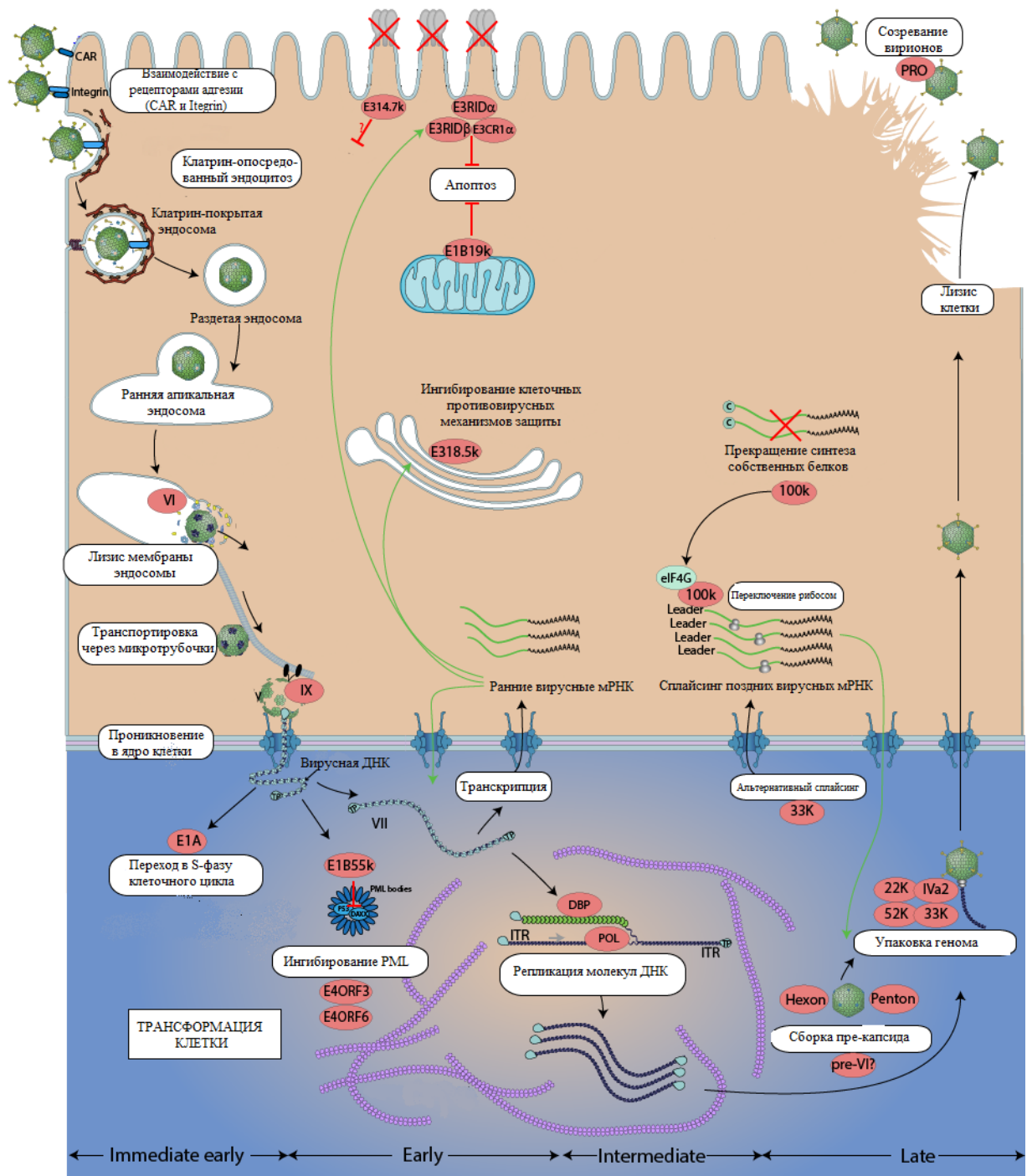


вириона) антигенные детерминанты. Известно, что наиболее консервативными являются родоспецифические антигенные детерминанты, типоспецифические же наиболее изменчивы [4, 23].

Геном аденовирусов представлен единой двуспиральной молекулой ДНК (26-48 тысяч пар нуклеотидов), которая фланкирована инвертированными концевыми последовательностями, позволяющими формировать кольца за счет образования водородных связей между концами одной и той же цепи. На 5'-конце ДНК аденовируса имеется терминальный белок – TP (55 кДа) [96, 106, 142], рисунок 2.

Аденовирус, используя CAR (*Coxsackievirus and Adenovirus Receptor*) и интегрин рецепторы проникает в клетку посредством клатрин-опосредованного эндоцитоза [24, 122]. В последующем происходит освобождение от клатриновой белковой оболочки и разрушение эндосомальной мембраны белком VI, в результате чего вирусный вирион выходит в цитозоль клетки. В течение следующих 2 часов вирион посредством микротрубочек доставляется к ядру клетки [24, 76, 94], рисунок 3.

## Репликация аденовируса (ViralZone, Swiss Institute of Bioinformatics)[131]



«Раздевание» капсида происходит в непосредственной близости от клеточного ядра, затем вирусная ДНК проникает в ядро, где чаще всего существует в виде эписомы, значительно реже происходит интегрирование вирусной ДНК в хромосомы клетки.

Аденовирус ингибирует синтез собственных клеточных нуклеиновых кислот и белков параллельно запуская синтез вирусных мРНК.

Находясь внутри клеточного ядра аденовирус ингибирует PML (The Promyelocytic Leukemia Protein - промиелоцитарный лейкозный белок), который предназначен для подавления репликации / транскрипции вирусов, тем самым предотвращая противовирусную активность клеток. Ингибирование синтеза собственных клеточных белков в цитозоле клетки осуществляется посредством белка 100K.

Транскрипция генов осуществляется клеточной РНК-полимеразой (POL II). Различают ранние вирусные мРНК с генов E (E-early) и поздние вирусные мРНК с генов L (L-late). Вирусные мРНК подвергаются сплайсингу. Ранние вирусные мРНК синтезируются до начала репликации вирусной ДНК и кодируют в основном белки, непосредственно необходимые для репликации ДНК аденовируса. «Поздние» вирусные мРНК синтезируются после репликации вирусной ДНК и кодируют преимущественно структурные белки капсида [24, 65, 111, 114, 140].

Вирион аденовируса собирается в клеточном ядре клетки хозяина, сначала строится белковый прообраз капсида, включающий в себя белки-предшественники, затем вирусная ДНК, ассоциированная с белками сердцевины, проникает внутрь недостроенного капсида, после чего он уплотняется за счет расщепления белков-предшественников [24, 111].

Выход готовых вирионов из клетки может сопровождаться ее лизисом, однако, это осуществляется не всегда, и клетка остается хронически инфицированной [24, 65, 111, 114, 140].

Аденовирус КРС размножаясь в перевиваемых культурах клеток КРС вызывает цитопатогенное действие, начинающееся с периферии и характеризующееся специфической дегенерацией клеток зараженного монослоя. Клетки увеличиваются, утрачивая правильную форму, становятся округлыми и затем объединяются в конгломераты, похожие на гроздья винограда. Монослой разрушается. Кроме того, аденовирус вызывает образование внутриядерных включений [9].

Аденовирус КРС достаточно устойчив к воздействию различных физико-химических факторов, хорошо переносит многократное замораживание и оттаивание. При температуре 56°C инактивируется в течение 30-60 минут, при температуре 70°C – в течение 10-30 минут (в зависимости от изолята), при этом полевые штаммы вируса более устойчивы, чем эталонные. При температуре 4°C аденовирус сохраняет свою инфекционную активность более 6 месяцев, при 24°C – 1-3 месяца, при 36°C – 15-60 дней. Воздействие ультрафиолетовых лучей выдерживает в течение 30-60 минут, аденовирус устойчив к изменению уровня рН среды в пределах 5,0-9,0. В лиофилизированном состоянии аденовирус можно хранить более 5 лет [4, 20].

### **2.1.2. Эпизоотологические данные.**

Заражение аденовирусом происходит алиментарным или воздушно-капельным путем, возможно заражение через конъюнктиву глаза. Источником возбудителя являются больные и переболевшие животные, часто у взрослого скота инфекция протекает в латентной форме, при этом они могут выделять аденовирус с истечениями из носа, глаз, фекалиями, мочой. Факторами передачи служат корма, вода, подстилка, предметы инвентаря, загрязненные аденовирусом КРС [7, 62].

Чаще болеют телята от 2-недельного до 4-месячного возраста, экспериментальную инфекцию удалось воспроизвести только на животных 15-30 дневного возраста [4, 38]. Однако, по данным японских ученых [116] им удалось воспроизвести инфекцию на животных и более старшего возраста. В своих экспериментах они использовали две группы телят голштинской породы: однонедельного возраста (n=3) и трехмесячного возраста (n=3), которым эндобронхиально инокулировали аденовирус КРС III-го типа (BAdV-3). У зараженных животных в обеих группах отмечали развитие некротического бронхита и пневмонии, сопровождающиеся клеточной инфильтрацией и пролиферацией пневмоцитов II-го типа. У однонедельных телят в изменённых эпителиальных клетках были обнаружены внутриядерные тельца-включения и выделен антиген BAdV-3 чего не наблюдали у трехмесячных животных.

Напротив, только у трехмесячных телят в легочных очагах поражения были обнаружены специфические CD-8 Т-лимфоциты [116]. Такая разница в иммунопатологических реакциях разновозрастных групп телят, по-видимому, обуславливается различиями в развитии иммунной системы животных.

Аденовирусная инфекция КРС широко распространена как на территории нашей страны, так и за рубежом, о чем свидетельствуют данные серологических исследований [10, 18, 23, 35, 36, 63, 82, 101, 106, 119, 126, 141].

В условиях промышленного животноводства заболевание часто возникает в зимне-весенние месяцы при комплектовании групп телят или их перегруппировке. Стресс, вызванный изменениями в условиях окружающей среды, рациона и транспортировкой животных, неудовлетворительное санитарно-гигиеническое состояние помещений, так же являются факторами риска возникновения аденовирусной инфекции [9, 17, 34, 97, 101].

### **2.1.3. Патогенез и клинические признаки.**

При респираторном пути заражения первичная локализация аденовируса КРС в организме животных происходит в органах верхних дыхательных путей, откуда вирус проникает в лимфоидную ткань (лимфатические узлы и пр.), затем в кровь, легкие, органы пищеварительного тракта, центральную нервную систему [9, 105].

Инкубационный период составляет от 4 до 7 суток. Клиническое проявление болезни может выражаться пневмонией, энтеритом, пневмоэнтеритом, конъюнктивитом. Соответственно проявляются характерные клинические признаки: повышение температуры тела до 41,5 °С, серозные истечения из носа и глаз, переходящие в гнойные. Затрудненное дыхание, кашель. Общая слабость, снижение аппетита, тимпания, колики, диарея (фекалии могут быть с примесью крови и/или кусочков слизистой оболочки кишечника) [38, 50, 105].

Гибель может наступить через 1-3 сутки после начала проявления клинических признаков, смертность среди телят раннего возраста достигает 60% [9, 38, 105].

Аденовирус оказывает иммуносупрессивное действие на организм теленка, провоцируя развитие вторичных инфекций [16]. Тяжесть и продолжительность течения болезни зависит от возраста, условий кормления, содержания теленка, а также проведения соответствующего лечения. Болезнь может приобретать хроническое течение, переболевшие телята отстают в росте и развитии [23, 82].

Часто встречается латентное вирусоносительство (у более взрослых животных), что доказано выделением аденовируса КРС из носовых смывов, тканей почек, тестикул и крови клинически здоровых животных [24, 58, 108].

Таким образом характерных клинических признаков аденовирусной инфекции не установлено. Все перечисленные признаки присущи многим вирусным и бактериальным инфекционным заболеваниям крупного рогатого скота [9, 32, 81, 103, 129].

#### **2.1.4. Патологоанатомические изменения.**

Патологоанатомические изменения не носят специфический характер. Однако ряд исследователей отмечают, что при поражении органов дыхания обнаруживают уплотнения, ателектаз и эмфизему легких, закупорку бронхов некротическими массами. При поражении желудочно-кишечного тракта находят признаки катарального и/или геморрагического воспаления слизистых оболочек [4, 50, 128, 139].

Так же при вскрытии наблюдают увеличение печени, дегенеративные изменения лимфатической системы (анемия и отек лимфатических узлов), признаки нарушения кровообращения (кровоизлияния и пр.) [4, 9, 23].

При проведении гистологических исследований обнаруживают гиперплазию, слущивание эпителия бронхов, многочисленные скопления лейкоцитов вокруг небольших кровеносных сосудов. Также обнаруживают внутриядерные включения в клетках различных органов и тканей: легких, эндотелии кровеносных сосудов, лимфоузлах, селезенки, печени, почках, слизистой оболочки трахеи, бронхов и желудочно-кишечного тракта [4, 24, 107].

### **2.1.5. Диагностика.**

Как и на любое инфекционное заболевание, диагноз на аденовирусную болезнь КРС ставится комплексно, с учетом эпизоотологических данных, клинических признаков, патологоанатомических изменений с обязательным лабораторным подтверждением. Следует отметить, что лабораторные исследования имеют решающее значение при постановке диагноза, так как ряд вирусных и бактериальных инфекций могут вызывать сходные формы патологий [4, 7, 23].

Патологический материал берут от больных животных, с ярко выраженной клинической картиной в первые 2-3 дня болезни или от животных в острой стадии заболевания, убитых для диагностических исследований.

У больных животных берут: смывы со слизистой оболочки носа, глаз и прямой кишки; парные пробы сыворотки крови, полученные от одного животного с интервалом 15-60 суток.

У животных, убитых для диагностических исследований, берут: кусочки легких и бронхов, селезенки, лимфоузлов, пораженные участки слизистых оболочек носовой и ротовой полости, трахеи, кишечника [4, 7, 23, 40].

Лабораторная диагностика проводится по следующим направлениям:

- обнаружение антигена в патологическом материале в серологических реакциях: РИФ, РСК, РДП, ИФА.

- выделение возбудителя или его ДНК (в чувствительной культуре клеток) и его последующая идентификация (электронным микрокопированием, с использованием серологических реакций: РСК, РИФ, РДП, ИФА; методом секвенирования);

- ретроспективная диагностика (выявление антител в парных пробах сыворотки крови больных и переболевших животных): РН, РЛА, РНГА, РТГА, РСК, РДП [4, 5, 7, 23, 40, 92].

Для быстрого обнаружения аденовирусов КРС в патологическом материале в 2006 году шведскими учеными была разработана тест-система TaqMan ПЦР в реальном времени [114].

У экспериментально зараженных телят вируснейтрализующие антитела обнаруживали на пятые сутки после заражения, на десятые сутки уровень вируснейтрализующих антител увеличивался более чем в 4 раза [38, 62, 110].

В виду большой схожести клинико-эпизоотических признаков и патологоанатомических изменений, характерных для аденовирусной болезни КРС с другими инфекциями, поражающими респираторный и желудочно-кишечный тракты, необходима дифференциальная диагностика от заболеваний, вызываемых: вирусами вирусной диареи, инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, респираторно-синцитиальным вирусом, рота- и коронавирусами КРС, а также от заболеваний, вызываемых: *P. multocida*, *M. haemolytica*, *E.coli*, микоплазмами и т.д. [43, 103, 118].

Следует учитывать тот факт, что аденовирусная инфекция часто встречается в ассоциированной форме с вышеуказанными болезнями [10, 30, 41, 89, 100, 119, 126].

#### **2.1.6. Профилактика.**

Неспецифическая профилактика аденовирусной инфекции КРС основана на:

- применении ветеринарно-санитарных мероприятий, направленных на предупреждение заноса возбудителя в хозяйство;
- обеспечении хороших условий кормления и содержания животных.

Для этого необходимо: выдерживать на карантине вновь поступающих животных; соблюдать режим по биологической защите хозяйства; проводить своевременную дезинфекцию помещений, оборудования, транспорта; организовать поддержание нормального микроклимата в помещениях; обеспечить животных сбалансированным рационом [17, 46].

Иммунитет у переболевших животных сохраняется до 5 месяцев, при этом они могут оставаться вирусоносителями и воздействие различных неблагоприятных факторов может спровоцировать повторное заболевание и выделение аденовируса в окружающую среду [9, 24].

Для специфической профилактики аденовирусной инфекции ранее были разработаны и предложены моно- и поливалентные вакцины [6, 8, 15, 69]. В том



числе инактивированная вакцина из двух типов аденовируса КРС; бивалентная вакцина против аденовирусной инфекции и пастереллеза [38]; ассоциированная инактивированная вакцина против аденовирусной инфекции и вирусной диареи крупного рогатого скота [3, 11].

Двукратная иммунизация моновакциной против аденовируса КРС коров на 7-8 месяце стельности индуцировала выработку вируснейтрализующих антител в сыворотке крови и молозиве на уровне 1:512-1:1024. Высокий уровень вируснейтрализующих антител в сыворотке крови животных, вакцинированных во время стельности, сохранялся на протяжении до 6 месяцев (срок наблюдения) после отела. Уровень антител в молозиве снижался быстрее, чем в сыворотке крови. У телят, получавших молозиво от вакцинированных коров, пассивные вируснейтрализующие антитела выявляли до 78 суточного возраста в титре 1:4-1:8 [38, 69, 115].

При двукратной вакцинации телят максимальный уровень вируснейтрализующих антител был зафиксирован на 14-е сутки (1:256-1:512) с последующей тенденцией к снижению через 6 недель до 1:128, через 13 недель до 1:4-1:8 [38].

На сегодняшний момент в РФ отсутствуют зарегистрированные и разрешенные для практического применения вакцины, содержащие аденовирусный компонент, за исключением вакцины «КОМБОВАК-А».

#### **2.1.7. Лечение.**

Для лечения аденовирусной инфекции используют комплексный подход с применением неспецифических и специфических средств терапии.

Неспецифическая терапия предусматривает применение симптоматических средств (направленных на купирование симптомов заболевания и поддержание жизненных функций организма теленка), использование антибиотиков и других противомикробных препаратов, направленных на подавление вторичной бактериальной (грибной, микоплазменной) инфекции. Положительный лечебный эффект при лечении оказывают иммуномодуляторы и иммуностимуляторы, аэрозоли лекарственных и дезинфицирующих средств [9, 53].

В качестве специфического лечения используют гипериммунные сыворотки, содержащие антитела к аденовирусу КРС. В России выпускается гипериммунная сыворотка «Иммуносерум» для лечения и профилактики вирусных пневмоэнтеритов телят (ФГУП «Армавирская биофабрика», Россия), содержащая в своем составе специфические антитела против аденовируса, вирусов парагриппа-3, инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, ротавируса и коронавируса крупного рогатого скота. Больным телятам сыворотку вводят внутримышечно или внутривенно. Также возможно применение сыворотки с профилактической целью для новорожденных телят. Возможно добавление сыворотки в молозиво (молоко) для выпаивания телят.

## **2.2. Вакцинация. Вакцины. Адъюванты.**

Одним из наиболее эффективных способов профилактики инфекционных болезней и борьбы с ними является специфическая иммунопрофилактика, основанная на применении вакцинных препаратов. Особенно это актуально для животноводческих комплексов, на которых технология содержания животных предусматривает большую концентрацию поголовья скота в ограниченном пространстве [13, 32].

В условиях частой полиэтиологичности первичных (как правило, вирусных возбудителей), а также сложной дифференциальной клинической и патологоанатомической диагностики основных респираторных и желудочно-кишечных заболеваний КРС наиболее эффективным способом профилактики является использование поливалентных (комбинированных) вакцин, содержащих антигены сразу нескольких возбудителей [12, 20, 26, 32].

В основе вакцинопрофилактики лежит иммунологический феномен, получивший название иммунологической памяти, то есть способности иммунной системы организма к более эффективному и быстрому ответу на проникновение возбудителя (антигена), с которым организм встречался ранее, в результате чего происходит так называемый вторичный иммунный ответ. Способность к вторичному иммунному ответу обусловлена наличием длительно живущих иммунных клеток памяти, которые представлены особыми антигенспецифичными

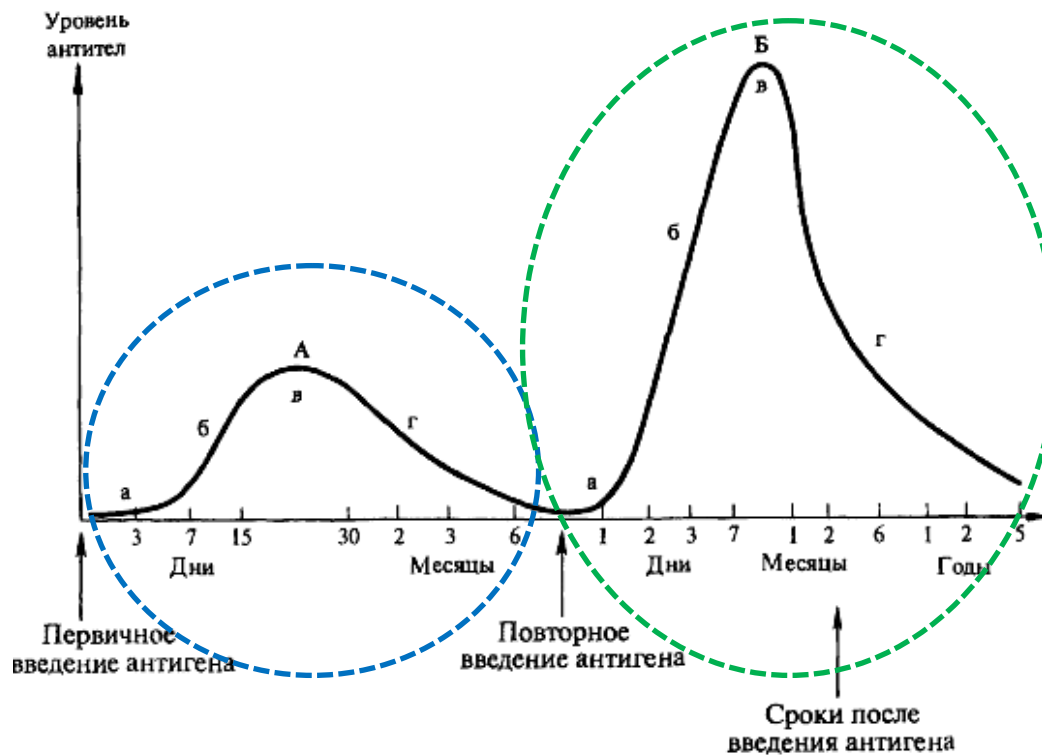
субпопуляциями Т- и В- лимфоцитов. Для активации иммунных клеток памяти требуется значительно меньшее количество антигена, чем для запуска первичного иммунного ответа, они гораздо быстрее и активнее реагируют на повторное введение антигена и готовы к быстрому превращению в эффекторные клетки [27, 28, 44, 130].

### **2.2.1. Особенности развития вторичного иммунного ответа, в том числе поствакцинального.**

Особенности развития вторичного иммунного ответа:

1. Меньшая доза антигена, провоцирующая его развитие.
2. Увеличение длительности и напряженности специфического иммунного ответа.
3. Значительное ускорение развития клеточного и гуморального (рисунок 4) иммунного ответа.
4. Сокращение периода синтеза плазматическими клетками IgM и, соответственно, быстрый переход на синтез более специфических IgG и IgA. При этом возрастает и аффинность синтезируемых антител.
5. Увеличение экспрессии молекул главного комплекса гистосовместимости II класса (ГКГС II класса) на поверхности В-лимфоцитов, что в конечном итоге способствует более быстрому вовлечению их в гуморальный иммунный ответ в виде плазматических клеток [1, 42, 44, 112, 130].

## Динамика образования антител (А. А. Воробьев и др., 2003)



На рисунке 4 представлена динамика образования антител при первичном (А) и вторичном (Б) введении антигена, фазы: *а* – латентная («лаг»-фаза); *б* – логарифмического роста («лог»-фаза); *в* – плато; *г* – фаза снижения.

В латентную или «лаг»-фазу (*а*) происходит распознавание и захват антигена антигенпрезентирующими клетками (АПК), с последующим его представлением (в составе комплекса с молекулами ГКГС II класса) Т-лимфоцитам (Th2 Т-лимфоцитам), которые индуцируют В-лимфоциты к пролиферации и дифференцировке в антителосекретирующие плазматические клетки.

В фазу роста «лог»-фазу, *б*) происходит экспоненциальное увеличение количества антител в сыворотке крови. Т.е. количество плазматических клеток, синтезирующих специфические к данному антигену антитела, и сам синтез этих антител резко возрастают.

В фазу плато (*в*) – уровень антител стабилизируется.

В фазу снижения (*г*) – происходит снижение уровня антител в сыворотке крови, причем сначала относительно быстро, а затем медленно. Длительность

этого процесса зависит от соотношения скорости синтеза антител и их полураспада.

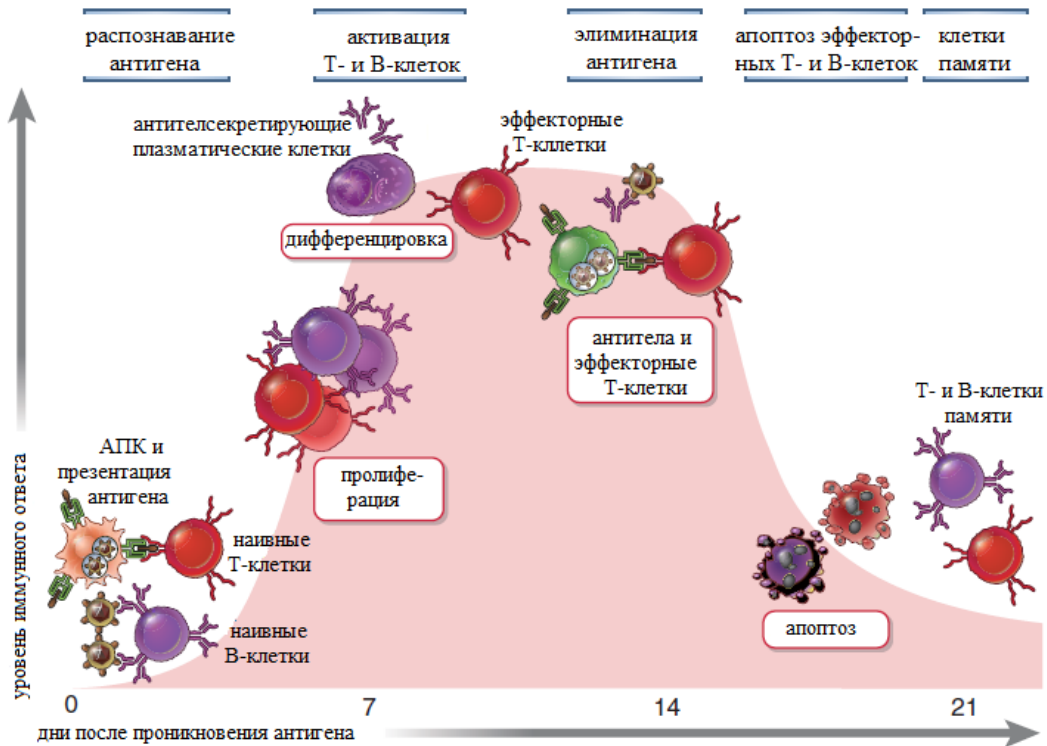
Когда уровень антител опускается ниже определенного значения, защита организма падает, и становится возможным заболевание при проникновении возбудителя. Поэтому в практике вакцинопрофилактики часто используется двукратная первичная вакцинация, с последующей периодической ревакцинацией [1, 13, 19, 49, 112].

При первичном иммунном ответе преобладает синтез IgM, при вторичном - плазматические клетки переключаются на синтез более зрелых изотипов и продуцируют антитела IgG, IgA или IgE. Вторичный ответ характеризуется более короткой латентной фазой и более продолжительными фазами плато и снижения. Уровень антител при вторичном ответе в 5-10 раз выше, чем при первичном. Кроме того, значительно повышается аффинность антител, при этом степень возрастания аффинности обратно пропорциональна дозе антигена [25, 27, 44, 77].

При вакцинации развитие специфического иммунного ответа происходит по тому же принципу, что и при инфицировании в результате контакта с возбудителем, рисунок 5 [1, 29, 49, 112].

Рисунок 5.

*Поэтапная схема развития адаптивного иммунного ответа (Cellular and Molecular Immunology, Abul K. Abbas et al., 2017) с момента проникновения антигена (в нашем случае – после вакцинации) до апоптоза эффекторных клеток и образования клеток памяти [49].*



Данный процесс включает в себя следующие основные этапы:

1. Вакцинные антигены захватываются антигенпрезентирующими клетками, подвергаются расщеплению и в последующем отдельные эпитопы антигена, в комплексе с молекулами ГКГС I и/или II класса, представляются на поверхности АПК.
2. Комплекс антиген-молекула ГКГС I и/или II класса распознается специфическими Т- и В-лимфоцитами.
3. После контакта со «своим» антигеном Т-лимфоциты активизируются, происходит их пролиферация и дифференцировка: появляются регуляторные (Т-хелперы: Th1, Th2), эффекторные (цитотоксические) и Т-клетки памяти.
4. В-лимфоциты активизируются, дифференцируются в антителосекретирующие плазматические клетки и В-клетки памяти.

5. По окончании активной фазы иммунного ответа происходит апоптоз эффекторных Т- и В-клеток [1, 42, 49, 61, 70, 112].

При этом есть ряд факторов, которые могут негативно повлиять на развитие вторичного иммунного ответа:

- слабо-иммуногенный антиген;
- наличие эффекторных антител;
- неспособность макроорганизма отвечать на антигенный раздражитель (различные иммунодефициты);
- ранний возраст [14, 19, 170].

### **2.2.2. Классификация вакцин.**

Все существующие вакцины можно разделить на несколько основных групп, при этом только часть из них нашли свое применение в широкой практической деятельности, а остальные пока остаются на этапе лабораторных разработок, не вошедших в серийное производство:

- живые вакцины, изготавливаемые из аттенуированных штаммов микроорганизмов;
- классические инактивированные вакцины, которые готовят из полевых (как правило) патогенных штаммов микроорганизмов;
- анатоксины, представляют собой инактивированные токсины (экзо- и/или эндотоксины), которые стимулируют развитие антитоксического иммунитета;
- гетерологичные живые вакцины, готовят из гетерологичных патогенным микроорганизмов, содержащих перекрестно-реагирующие с последними антигены. Т.е. для иммунизации используют близкородственные вирусы или бактерии. Так первая вакцинация, проведенная Дженнером, была основана на использовании гетерологичного вируса коровьей оспы, для профилактики натуральной оспы человека;
- генно-инженерные вакцины, включающие в себя большую группу разнонаправленных препаратов: рекомбинантные живые и субъединичные (на основе белковых антигенов, полученных в специальных системах экспрессии генов) вакцины, синтетические и конъюгированные вакцины, ДНК-вакцины и

вакцины, полученные путем делеции генов возбудителей. Из генно-инженерных препаратов практическое применение в ветеринарной и гуманной медицине нашли только рекомбинантные субъединичные вакцины [25, 28, 32, 45, 60, 130].

В животноводческой практике РФ подавляющую часть применяемых вакцинных препаратов составляют живые и инактивированные вакцины, в значительно меньшей степени анатоксины [29, 32].

#### **2.2.2.1. Живые вакцины.**

Живые вакцины, готовят на основе искусственно ослабленных или природных слабовирулентных штаммов микроорганизмов, которые при этом обладают ярко выраженными иммуногенными свойствами [1, 31].

Аттенуация вирулентных микроорганизмов обычно производится путем адаптации и последующего многократного повторения циклов размножения в измененных условиях (например, в организме неестественных хозяев или гетеровидовой перевиваемой культуре клеток). Совершая множественные циклы репродукции микроорганизмы накапливают мутации, в том числе влияющие на вирулентность. При этом, если пассирование идет в условиях естественного хозяина, то как правило, селекционируются и быстрее размножаются мутанты с повышенной вирулентностью, а в изменённых условиях лучше накапливаются клоны с мутациями, позволяющими им лучше приспособливаться к новым условиям. Такие мутанты часто теряют свою патогенность для первоначального хозяина и могут рассматриваться в качестве кандидатов в вакцинные штаммы. Одним из принципиальных условий аттенуирования любого штамма микроорганизма, является то, чтобы со снижением его вирулентности (вплоть до полной потери), сохранялись его антигенные и иммуногенные свойства [19, 32].

Поскольку аттенирование штаммов в измененных условиях процесс во многом эмпирический, весьма трудо- и время-затратный, а результат непредсказуем, то в настоящее время широко применяют генно-инженерное конструирование вакцин, подразумевающее целенаправленное изменение генома возбудителя для получения определённых параметров [39].



Размножаясь в месте инъекции, а в последующем и в регионарных лимфоузлах, аттенуированные штаммы вызывают вакцинную инфекцию, по сути имитирующую естественный инфекционный процесс в очень слабовыраженной форме, без развития клинической картины заболевания. На этом базируется основное преимущество живых вакцин – они вызывают стойкий и длительный иммунитет, для формирования которого требуется, как правило однократная вакцинация [29, 44].

Однако, живые вакцины имеют и ряд существенных недостатков, ограничивающих их использование при многих инфекциях.

В первую очередь – это возможность реверсии аттенуированного штамма к дикому вирулентному типу. Такое возможно при многократном пассировании штамма через организмы естественно-восприимчивого хозяина. Другим опасным феноменом является возможность спонтанной рекомбинации вакцинных и полевых штаммов микроорганизмов, в результате которых могут возникнуть высокопатогенные мутанты [13, 32].

Существуют ограничения применения живых вакцин при возникновении вспышки заболевания, а также для стельных животных. Особенно это актуально для таких вирусов как возбудители вирусной диареи и инфекционного ринотрахеита КРС. Имеются доказанные случаи, когда указанные вакцинные штаммы преодолевали плацентарный барьер, вызывая внутриутробное инфицирование телят [29, 45, 66].

Кроме того, не для всех возбудителей удастся селекционировать безопасные и в тоже время иммуногенные штаммы [13, 29, 45].

Одним из актуальных, но далеко не всегда выполнимых, требований к живым аттенуированным вакцинам является использование маркированных штаммов возбудителей. Маркер – это, как правило, ген, кодирующий определенный иммуногенный белок, которого нет в геноме полевых штаммов возбудителя или, наоборот, в геноме маркированного штамма отсутствует легко выявляемый ген, присущий полевым изолятам. Основное назначения маркера – возможность дифференцировать поствакцинальные и постинфекционные антитела, также

маркер позволяет контролировать распространение вакцинного штамма среди не вакцинированного поголовья животных [1].

Широко распространённым примером такого вакцинного препарата является живая маркированная вакцина против болезни Ауески. У вакцинного штамма вируса болезни Ауески отсутствует фрагмент гена, кодирующий гликопротеин gE, который присутствует у полевых штаммов. Если у вакцинированных животных находят вируснейтрализующие антитела или антитела к другому гликопротеину gB в ИФА, но отсутствуют антитела к гликопротеину gE, иммунный ответ к вирусу вызван именно применением вакцины, а не циркуляцией полевых штаммов.

На использовании маркированных вакцин построена стратегия DIVA (*Differentiating Infected from Vaccinated Animals*), которая предусматривает использование вакцинных препаратов, имеющих легко выявляемый серологическими методами маркер, в сочетании с проведением постоянного серологического мониторинга с целью выявления животных, серопозитивных к полевым изолятам, которых своевременно выбраковывают [1, 29, 32].

#### **2.2.2.2. Инактивированные вакцины.**

Другим и, пожалуй, самым массовым в животноводстве применяемым типом вакцинных препаратов являются инактивированные вакцины. Готовят данные препараты, как правило, из вирулентных штаммов возбудителей, которые предварительно были подвержены инаktivации. На эффективность инактивированных вакцин ключевое влияние оказывают следующие факторы:

1. Количество и качество антигена в прививной дозе. Поскольку вакцинный штамм в составе инактивированного препарата лишен возможности к размножению, то вводимое при инъекции количество антигена должно быть достаточным для развития полноценного иммунного ответа [13, 19, 25].

2. Правильно подобранные условия и режимы инаktivации. Процесс инаktivации с одной стороны должен обеспечить полную потерю возбудителем способности к репликации, а с другой стороны максимально щадяще

воздействовать на него, сохраняя пространственную конформацию его белков, которые могут выступать в качестве антигенных эпитопов.

Несмотря на возможность использования физических методов для инактивации микроорганизмов (гамма и ультрафиолетовое облучение, прогревание при повышенной температуре), более удобными и соответственно, распространенными являются химические методы – добавление к накопленному микроорганизму химических инактивирующих агентов [29].

Самыми распространенными типами инактивирующих агентов являются: ретикулирующие (альдегиды, в том числе формальдегид) и алкилирующие (бетапропиолактон, этиленимин и другие азиридины).

Формальдегид, взаимодействуя с нуклеиновыми кислотами и белками, в основном реагирует с аминогруппами. Присоединение формальдегида к аминогруппам пуринов и пиримидинов уничтожает матричную и инфекционную активность нуклеиновых кислот.

Одним из преимуществ бетапропиолактона и этиленимина является то, что они после проведения инактивации, сами легко поддаются полному гидролизу с образованием нетоксичных продуктов [1, 25, 32].

3. Ввиду отсутствия возможности репликации инактивированных микроорганизмов в организме животного и соответственно, неспособности вызвать вакцинную инфекцию, возникает необходимость включения в состав вакцины специальных «помогающих» веществ – адъювантов, которые способны значительно усилить иммунный ответ, провоцируемый введением антигена [45, 90, 104, 121].

### **2.2.3. Основные типы адъювантов.**

Впервые адъювантное действие химических соединений обнаружил Глени с соавторами при очистке дифтерийного токсина путем его осаждения алюминиевыми квасцами. Глени отметил тот факт, что комплекс токсина с квасцами вызывает гораздо более выраженный иммунный ответ, чем дифтерийный токсин в чистом виде [31, 87].

Взаимодействие гидроокиси алюминия с антигенами проходит посредством ионного взаимодействия, поэтому такие препараты получили название сорбированных (адсорбированных) вакцин. Взаимодействие гидроокиси алюминия с белковыми антигенами происходит за счет разницы электрических зарядов, что и обуславливает их хорошую адсорбцию [13, 31].

Гидроокись алюминия является простым в использовании и хорошо зарекомендовавшим себя адъювантом, обеспечивающим развитие довольно выраженного иммунного (преимущественно гуморального) ответа при приемлемом уровне безвредности конечного вакцинного продукта. Данный адъювант долгое время оставался единственно разрешенным к использованию при изготовлении вакцин для человека в США. Хотя полностью побочные эффекты при его применении не исключены, так развитие поствакцинальной остеосаркомы у кошек связывают с воздействием солей гидроокиси алюминия [56, 78].

Адъювантные механизмы гидроокиси алюминия следующие: создание эффекта депо антигена на месте инъекции препарата; оптимизация контакта между антигеном и антигенпрезентирующими клетками (если антиген хорошо адсорбируется); повышение эффективности взаимодействия антигенпрезентирующих и эффекторных клеток иммунной системы; проявление иммуномодулирующего эффекта за счет влияния на синтез определенных цитокинов [31, 73, 78].

Наиболее существенным недостатком гидроокиси алюминия как адъюванта является недостаточно выраженная индукция клеточного (цитотоксического) иммунного ответа [1, 31].

Часто гидроокись алюминия используют в сочетании с другим адъювантом – сапонином. Сапонин получают из коры южноамериканского дерева *Quillaja saponaria*, путем экстракции стероидных и тритерпеновых гликозидов и последующей очистки. Являясь поверхностно-активным веществом, растворенный сапонин при определенной концентрации формирует мицеллы, которые вступают в гидрофобное взаимодействие с поверхностными белками

антигенов. Образующиеся комплексы обладают более выраженной иммуногенной активностью по сравнению с «чистым» антигеном [56, 73, 90].

Вторым, наиболее распространенным и используемым в животноводстве типом инактивированных вакцин наряду с адсорбированными на гидроокиси алюминия являются эмульгированные (масляные) вакцинные препараты [31, 121].

Эмульгированная вакцина (эмульсия) – это дисперсия одной жидкости (рассеянная фаза) в другой жидкости (непрерывная фаза) без их смешивания. По сути эмульгированная вакцина состоит из двух жидкостей водной (которая содержит антиген) и масляной. Веществом, которое обеспечивает стабильное распределение одной фазы внутри другой и, соответственно, придает стабильность эмульсии является сурфактант (эмульгатор). Он в своей структуре имеет две группы гидрофильную и гидрофобную (липофильную), обеспечивающие взаимодействие с водной и масляной фазами. Соотношение гидрофильной и липофильной групп составляет гидрофильно-липофильный баланс (HLB) сурфактанта, который оказывает прямое влияние на тип получаемой эмульсии [1, 104].

Низкий уровень HLB характерен для липофильных сурфактантов, обладающих большим сродством с масляной фазой. Такие эмульгаторы (маннид моноолеата, Спан-85) формируют эмульсии типа вода в масле, когда водная фаза (содержащая антиген) диспергирована в непрерывной масляной фазе. Гидрофильные эмульгаторы (Твин-80, Твин-85) обладают высоким сродством с водной фазой и обеспечивают получение эмульсий типа масло в воде – в непрерывной водной фазе диспергировано масло. Сурфактанты, обладающие промежуточным уровнем HLB имеют примерно равное сродство с водной и масляной фазами и могут быть использованы для изготовления сложных эмульсий типа вода в масле в воде, когда в непрерывной водной фазе диспергирована масляная фаза, содержащая вторичную водную фазу [1, 121].

Эмульгированные вакцины типа вода в масле проявляют выраженный эффект депо на месте введения, обуславливая длительное высвобождение антигена, обеспечивают оптимизацию контакта антигена с антигенпрезентирующими

клетками. В целом, эмульсии такого типа хорошо индуцируют развитие гуморального иммунного ответа, вызывая напряженный и продолжительный иммунитет. Как правило эмульсии типа вода в масле обладают большей вязкостью по сравнению с другими типами [31, 56].

Для эмульсий типа масло в воде характерно более быстрое высвобождение антигена; они способствуют его презентации, оптимизируя контакт между антигеном и антигенпрезентирующими клетками; стимулируют развитие гуморального ответа, вызывая сильный, но менее продолжительный (по сравнению с эмульсиями типа вода в масле) иммунитет.

Сложные эмульсии типа вода в масле в воде обладают свойствами, промежуточными между предыдущими типами. Однако, существенным их недостатком является технологически сложная процедура изготовления, требующая поддержания определенной температуры с точностью до 1°C в течение всего процесса эмульгирования. Кроме того, из-за своей сложной структуры они обладают меньшей стабильностью в процессе хранения, подвергаясь расслоению на водную и масляную фазу [1, 31, 45].

Использование масляных адъювантов, позволяет включать в состав эмульгированных вакцин, помимо антигенной части, другие вещества и соединения, растворенные в водной или масляной фазе, которые способны влиять на развитие иммунного ответа [45].

Впервые влияние масляных адъювантов на развитие поствакцинального иммунитета описал Фрейнд в 1937 г, который использовал минеральное масло с добавлением целых клеток микобактерий, инактивированных прогреванием при высокой температуре. Данное сочетание получило название полного адъюванта Фрейнда (FCA) и представляет собой классическую эмульсию типа вода в масле. Неполный адъювант Фрейнда (FIA) характеризуется отсутствием в своем составе микобактерий. Компоненты клеточной стенки микобактерий являются мощным индуктором развития клеточного иммунного ответа, поэтому вакцины, содержащие FCA, хорошо стимулируют как гуморальный, так и клеточный иммунитет [56, 121].

Полный адъювант Фрейнда один из наиболее мощных адъювантов, существующих на сегодняшний день. Однако за такую способность к индукции иммунного ответа он расплачивается чрезвычайно высокой реактогенностью изготавливаемых с его использованием вакцин. По этой причине принципиально невозможно его использование в составе вакцин как для человека, так и для животных. Единственно возможной областью применения ФСА являются экспериментальные исследования, иногда, его используют для получения гипериммунных сывороток животных [45, 56].

В целом, проблема баланса между эффективностью (иммуногенностью) вакцины и ее безвредностью актуальна для многих готовых препаратов и отдельных составляющих вакцин – как для различных адъювантов, так и для антигенов имеющих разную структуру и природу. Так цельноклеточные, молекулярно- и эпитопно-перегруженные антигены, имеющие в своем составе помимо белков липосахариды (например, различные бактерии), как правило, вызывают напряженный и продолжительный иммунный ответ, однако, обладают ярко выраженной реактогенностью, особенно в сочетании с масляными адъювантами. И наоборот, высокоочищенные, низкомолекулярные белковые антигены, не проявляют реактогенных свойств, но являются весьма слабыми индукторами иммунного ответа [1, 56, 78].

Наибольшее практическое распространение среди эмульгированных вакцин нашли эмульсии типа вода в масле. Несмотря на хорошие показатели эффективности, они имеют определенные недостатки, ограничивающие их применение:

- возможное развитие местных воспалительных реакций (образование гранул и абсцессов);
- сравнительно высокая вязкость вакцины, что создает затруднения при введении, а также повышает болезненные ощущения при использовании;
- процесс изготовления таких эмульсий является трудоемким (при эмульгировании требуется высокая скорость фазового сдвига).

В качестве первых масляных адъювантов использовали только минеральные масла, но из-за повышенной реактогенности предпринимались попытки использовать органические масла (растительного и животного происхождения), которые бы легко подвергались биодegradации в организме животного. Однако, при сравнительно меньшей реактогенности они оказались и менее эффективны [31, 32, 45, 56].

В настоящее время имеется ряд коммерческих адъювантов, основанных на комбинации минеральных и неминеральных масел, которые сочетают в себе высокую адъювантную активность с относительно невысокой реактогенностью. Кроме того, современные технологии по изготовлению адъювантов на основе только минеральных масел значительно продвинулись в аспекте снижения реактогенности и широко применяются для изготовления вакцинных препаратов фактических для всех видов продуктивных животных, птицы и рыб [1].

Другие адъюванты, которые могут быть использованы в производстве вакцинных препаратов:

- синтетические полиэлектролиты – синтетические полиионы, с контролируемой структурой: полиоксидоний (применяется в качестве адъюванта в медицинской вакцине против гриппа «Грипол», а также в виде отдельного препарата, обладающего иммуномодулирующими свойствами), поли-4-винил-пиридин [28, 42];

- карбомер – сополимер полиакриловой кислоты, активно используется в качестве адъюванта в вакцинах для свиней, кошек, собак [85, 86];

- липосомы – искусственные липидные мембраны, используются не только в качестве адъювантов, но и как средства доставки лекарственных средств к определенным тканям в организме;

- бактериальные производные и их синтетические аналоги, ярким представителем данного класса адъювантов являются компоненты клеточной стенки микобактерий (входящие в полный адъювант Фрейнда), выделенное из них вещество - пептидогликан, отвечающий за адъювантные свойства и позднее полученный его синтетический аналог – муралдипептид;



- гидрофильные и гидрофобные блок-полимеры – неионные поверхностно-активные блок-полимеры;
- цитокины – отдельные цитокины (ИФН- $\gamma$ , ИЛ-1, ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-12) могут быть включены в состав вакцин в качестве адъювантов, в том числе и в сочетании с другими адъювантами;
- хитозан – катионный полисахарид, полученный из хитина членистоногих, грибов и/или дрожжей;
- микрокапсулы – готовятся из биodeградируемых полимеров: различные цианоакрилаты, полиактид-полигликолид и др.;
- различные носители антигенов – например белковые: различные эндогенные белки, столбнячный и дифтерийный анатоксины [1, 31, 42, 45, 56, 73, 104].

Иногда несколько типов адъювантов используют в виде разных комбинаций в составе одной вакцины. Одна из первых и наиболее известных комбинаций адъювантов - полный адъювант Фрейнда, который хорошо стимулирует развитие клеточного и гуморального иммунного ответа. Для использования с амфифильными иммуногенами хорошо зарекомендовал себя Syntex adjuvant formulation, который состоит из неионного блок-полимера L121 и треонил-муралдипептида, с добавлением минерального масла. Перспективными видятся липосомы, позволяющие включать в состав вакцины другие адъюванты, например, липофильные производные муралдипептида и сапонин [1, 31, 42].

Из адъювантов, представленных выше, практическое применение в ветеринарной практике нашли: карбомер, липосомы (и их комбинация с сапонином - ISCOM), блок-полимер L121, муралдипептид [85, 86, 137].

Однако, уровень их использования несравним с такими традиционными адъювантами, как гидроокись алюминия (в том числе и в сочетании с другими веществами, такими как сапонин) и различные масляные адъюванты, с использованием которых готовится подавляющее большинство инактивированных вакцинных препаратов, предназначенных для крупного рогатого скота [1].

#### **2.2.4. Заключение.**

На основании анализа литературных данных мы выяснили, что аденовирусная инфекция КРС распространена как на территории РФ, так и за рубежом. Наиболее подвержен заболеванию молодняк крупного рогатого скота, переболевшие животные остаются вирусоносителями, отстают в росте и развитии.

Основным источником аденовируса КРС являются больные животные, выделяющие его во внешнюю среду со слюной, слезой и фекалиями. Возбудитель болезни может передаваться через корм, питьевую воду, инвентарь. Заражение может происходить алиментарным, воздушно-капельным путем, через конъюнктиву. Аденовирус КРС является устойчивым к воздействию неблагоприятных факторов окружающей среды таким как pH и температура, сохраняет свою активность после многократного замораживания.

Наиболее часто аденовирусная инфекция встречается в комплексе с другими вирусными респираторными заболеваниями. Поэтому для ее профилактики целесообразно использовать многокомпонентные вакцины, направленные на создание иммунитета против наиболее распространенных вирусных инфекций КРС. Однако, конструирование многокомпонентных инактивированных вакцин (наиболее часто применяемых в промышленном животноводстве) требует использования эффективного и безопасного адъюванта.

В настоящее время для изготовления инактивированных вакцин предложено большое количество известных и новых адъювантных продуктов, которые сочетают в себе различные свойства и обладают своими выраженными достоинствами и недостатками. Поэтому сравнительный анализ и подбор адъюванта для разных типов вакцин являются актуальными.

## СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.

### 3. Материалы и методы.

Работа выполнена в 2009-2020 гг. на базе Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр – Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН), лаборатории биохимии и молекулярной биологии.

Анализ литературных данных по изучаемым вопросам определил общее направление наших исследований, основные объекты и модели, используемые для проведения экспериментов.

В качестве основных объектов для экспериментальных исследований были взяты: пробы биологического материала (носовые и конъюнктивальные смывы, пробы сыворотки крови); лабораторные (морские свинки) и естественно-восприимчивые (телята, коровы) животные.

**Культуры клеток и питательные среды.** При проведении исследований использовали перевиваемые культуры клеток: почки теленка (Т-1), почки теленка (MDBK). В качестве ростовой среды для культур использовали - питательную среду ДМЕМ («HyClone», США) с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота («HyClone», США); поддерживающей - среду ДМЕМ без сыворотки. Антибиотики добавляли из расчета: пенициллина – 100 ЕД/см<sup>3</sup> и стрептомицина – 100 мкг/см<sup>3</sup> питательной среды.

**Вирусы.** В опытах использовали следующие вакцинные штаммы вирусов: штамм «Т» вируса ИРТ, штамм «ВС-05» вируса ПГ-3, штамм «Т-04» вируса ВД, штамм «ТИ» вируса РС, штамм «К-88» ротавируса, штамм «КВ-90» коронавируса, штамм «Альфа» аденовируса КРС I-го типа.

**Выделение аденовирусного изолята из числа циркулирующих на территории РФ.** Для выделения аденовируса проводили исследования смывов с конъюнктивы глаза и слизистой носовой полости телят 2-4 недельного возраста, имеющих характерную клиническую картину острых респираторных

заболеваний. Полученные смывы центрифугировали, после добавления антибиотиков и антимикотиков и проведения стерилизующей фильтрации смешивали в равных объемах с гипериммунной сывороткой крови морских свинок, содержащей вируснейтрализующие антитела к вирусам инфекционного ринотрахеита (ИРТ), парагриппа-3 (ПГ-3), вирусной диареи (ВД), респираторно-синцитиальному (РС), рота- (РВ) и коронавирусам (КВ) КРС. Полученную смесь использовали для заражения перевиваемой культуры клеток почки теленка - Т1. Каждую пробу исследовали путем проведения 4 слепых пассажей в указанной культуре клеток.

Для дальнейшего исследования отбирали культуральную жидкость четвертого пассажа, из проб, где наблюдали цитопатические изменения в культуре клеток. Идентификацию выделенных вирусов проводили в реакции нейтрализации с использованием моноспецифических референтных антисывороток к вирусам ИРТ, ПГ-3, ВД, РС, РВ и КВ КРС, полученных из Центральной ветеринарной лаборатории, Вейбридж, Великобритания.

Пробы культуральной жидкости, в которых не происходила нейтрализация вируса референтными антисыворотками к вышеперечисленным вирусам КРС, исследовали методом полимеразной цепной реакции с последующим секвенированием фрагмента генома.

**Референтные антисыворотки.** В работе использовали моноспецифические референтные антисыворотки к вирусам ИРТ, ПГ-3, ВД, РС, РВ, КВ, полученные из Центральной ветеринарной лаборатории, Вейбридж, Великобритания.

**Выделение ДНК вируса.** Осуществляли с использованием коммерческого набора для выделения ДНК, производства ООО «Ветбиохим» (РФ) согласно инструкции изготовителя.

**Полимеразная цепная реакция (ПЦР).** Для идентификации выделенного вируса использовали набор «High Fidelity PCR Enzyme mix» («Fermentas», Литва) с применением вырожденных праймеров, фланкирующих фрагмент генома, кодирующего гексон аденовирусов КРС [113]:

BALF 5'-GRTGGTCIYTRGATRTRATGGA-3'  
 BARF 5'-AAGYCTRTCATCYCCDGGCCA-3',

где: Y=C+T, R=A+G, D=G+A+T, I = inosine.

Реакционная смесь для проведения ПЦР в конечном объеме 25 мкл содержала: 5 мкл выделенной ДНК, 10 пМ каждого праймера, 0,25 мМ каждого dNTP, 1,25 ЕД Tag-полимеразы, 10 мМ трис-HCl (pH 9,0), 50 мМ KCl, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,1% тритон X-100.

Проводили две последовательные амплификации в следующем температурно-временном режиме:

- |                                        |             |
|----------------------------------------|-------------|
| - прогревание (t 95°C) – 5 минут       | } 30 циклов |
| - денатурация (t 95°C) – 15 секунд     |             |
| - отжиг праймеров (t 58°C) – 15 секунд |             |
| - элонгация (t 72°C) – 30 секунд       |             |
| - прогревание (t 72°C) – 5 минут       |             |

Выявление продуктов ПЦР проводили методом горизонтального электрофореза в 1% агарозном геле, с использованием трисацетатного буфера (pH 8,5), содержащего 0,5 мкг/мл этидия брома и применением маркера молекулярного веса ДНК. Анализ гелей проводили на ультрафиолетовом трансиллюминаторе ( $\lambda = 254$  нм).

При наличии четко обозначенных полос, расположенных в диапазоне 630-650 п.н., пробы считали условно-положительными.

Для окончательной идентификации вируса и одновременно с целью его типирования, проводили секвенирование полученных в ПЦР фрагментов ДНК.

**Секвенирование.** Секвенирование проводили по методу Сэнгера, применяя вышеуказанные праймеры, с использованием флюоресцентно-меченых терминирующих нуклеотидов на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3130 («Applied Biosystems», США) согласно инструкции изготовителя.

При проведении сравнительного анализа нуклеотидных последовательностей использовали расшифрованные геномы штаммов аденовируса КРС разных подтипов, представленных в официальной таксономии аденовирусов и в базе данных ресурса GenBank.

Обработку результатов секвенирования полученных последовательностей, а также сравнительный анализ проводили с использованием пакета программ Lasergene (version 7/1/0/(44) Copyright 1993-2006, DNSTAR Inc). Все нуклеотидные последовательности, взятые из базы данных ресурса GenBank, были предварительно выровнены и обрезаны по расшифрованному нами фрагменту генома аденовируса, а затем использованы в построении филогенетического дерева в программе MEGA 7 [102].

**Определение оптимального времени культивирования клеточной культуры до заражения.** Выделенный аденовирус КРС использовали для заражения перевиваемой культуры клеток почки телят MDBK. После адаптации вируса к культуре клеток проводили исследования по выявлению оптимального времени культивирования клеточной культуры до заражения для максимально эффективной работы аденовируса. Для этого использовали заранее охарактеризованную суспензию аденовируса (с инфекционной активностью  $5,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ ), которой заражали культуру клеток MDBK через 24, 48 и 96 часов после посева. Объем и концентрация вносимого вируса во всех случаях были идентичны. Матрасы с зараженной культурой клеток культивировали при температуре  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , при этом визуально оценивали цитопатическое действие аденовируса на культуру клеток. При максимально выраженном цитопатическом действии вируса (120 часов в каждом случае) – прекращали культивирование и отбирали пробы для оценки инфекционной активности полученной вирусосодержащей суспензии.

**Подбор оптимальной заражающей дозы.** Для установления оптимальной инфицирующей дозы проводили заражение 48 часовой культуры клеток MDBK, выращенной в культуральном матрасе площадью  $75 \text{ см}^2$  (количество живых клеток составляло  $2,0 - 4,0 \times 10^4$  клеток на  $1 \text{ см}^2$ ). Для инокуляции использовали заранее охарактеризованную вирусосодержащую суспензию с инфекционной активностью от  $10^4$  до  $10^7 \text{ ТЦД}_{50}/\text{мл}$ , объем вносимой вирусосодержащей суспензии составлял 1 мл на один матрас. Поддерживающую среду вносили в объеме 35 мл на один культуральный матрас.

В течение культивирования визуально оценивали цитопатическое действие аденовируса на культуру клеток. Через 120 часов после заражения заканчивали процесс культивирования, из каждого матраса отбирали пробы для определения уровня инфекционной активности полученного вируса.

**Определение оптимальной продолжительности культивирования вируса.** Для определения оптимальной продолжительности культивирования аденовируса использовали несколько матрасов с 48 часовой культурой клеток MDBK, которые одновременно заражали одинаковой дозой вируса и культивировали в одинаковых условиях. В течение всего времени культивирования визуально оценивали цитопатическое действие аденовируса на культуру клеток. По прошествии 48 часов и далее каждые 24 часа прекращали культивирование одного из матрасов, из которого отбирали пробу для определения уровня инфекционной активности полученного вируса.

Также в ходе оптимизации условий культивирования аденовируса были поставлены сравнительные опыты по заражению культуры клеток MDBK с проведением «контакта» заражающей вирусосодержащей суспензии в течение 1 часа (без внесения поддерживающей питательной среды в условиях термостата при температуре  $37\pm 1^\circ\text{C}$ ) и «без контакта», когда поддерживающую среду вносили фактически сразу после инокуляции вируса.

Кроме того, были проведены исследования по оценке влияния трипсина в небольших количествах на контакт аденовируса с клеткой. Добавление раствора трипсина (до концентрации 0,1-0,3%) в питательную среду при заражении культуры клеток - один из распространенных в культуральной практике методов оптимизации контакта вируса и клетки, который иногда позволяет получить на выходе суспензию с более высокой инфекционной активностью вируса.

#### **Титрование (определение инфекционной активности) вируса.**

Титрование вируса проводили микрометодом. Для этого готовили ряд последовательных 10-кратных разведений вируса от  $10^{-1}$  до  $10^{-8}$  в 24-луночном плоскодонном планшете. Под одну пробу отводили 8 лунок планшета, в каждую из которых вносили 900 мкл среды ДМЕМ. Затем в первую лунку вносили 100

мкл исследуемой пробы вируса, меняли наконечник пипетки, перемешивали содержимое лунки и переносили в следующую лунку, не касаясь наконечником её содержимого. Аналогично, меняя наконечники, делали все последующие разведения вируса.

Приготовленные разведения вируса переносили на 48 часовой монослой культуры клеток MDBK, выращенных в 96-луночном плоскодонном планшете. Несколько лунок заполняли средой ДМЕМ по 100 мкл, используя их для контроля культуры клеток.

Заполненный планшет закрывали крышкой и инкубировали в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре 37±1°C в 5% CO<sub>2</sub> атмосфере. Результаты учитывали на 5-7-е сутки, при условии, что незараженная культура клеток в контрольных лунках оставалась неизменной, без признаков дегенерации. Результаты титрования выражали в lg ТЦД<sub>50</sub>/мл.

**Изучение свойств выделенного вируса.** Изучение гемагглютинирующих и гемадсорбирующих свойств проводили по общепринятой методике с использованием эритроцитов свиньи, кролика, белой мыши, морской свинки, петуха, барана [4, 40].

#### **Отработка методов инаktivации выделенного аденовируса КРС.**

В качестве инаktivирующих агентов для инаktivации аденовируса КРС были опробованы следующие соединения: формалин (содержащий 37% формальдегида), димер этиленimina и β-пропиолактон в различных концентрациях и с разным временем экспозиции. Температура, при которой инаktivировали аденовирус во всех случаях была одинаковая (37±1°C). Для оценки эффективности инаktivации отбирали соответствующие пробы через 24, 48, 72 и 96 часов. Контроль полноты инаktivации аденовируса осуществляли путем проведения четырехкратных последовательных пассажей в культуре клеток MDBK.

#### **Оценка антигенных свойств выделенного штамма аденовируса КРС.**

Антигенные свойства, выделенного аденовируса КРС изучали в составе моновакцины, изготовленной в четырех вариантах с двумя разными адьювантами:



неполным адъювантом Фрейнда (НАФ) и гидроокисью алюминия. Опыты проводили на лабораторных (морские свинки, массой 300-350 г) и естественно-восприимчивых (телята, 3-4 месячного возраста) животных. Антигенную активность оценивали по уровню вируснейтрализующих антител в сыворотке крови животных до и после вакцинации.

**Разработка тест-системы ПЦР.** Для разработки тест-системы использовали штамм «Альфа» аденовируса КРС, носовые и глазные смывы от телят, полученные из хозяйств Центрального Федерального округа РФ. Оценку специфичности тест-системы проводили с использованием указанных выше штаммов вирусов ИРТ, вирусной диареи, ПГ-3, РС, рота- и коронавируса КРС, а также бактериальных штаммов *P. multocida* типов А, В и D, *M. haemolytica*, *E.coli* серогрупп O101 и O141.

Выделение ДНК из вируссодержащей культуры клеток, носовых и глазных смывов осуществляли, используя набор для выделения ДНК на основе неорганического сорбента (ООО «Ветбиохим», Россия), по методике производителя.

Подбор специфических олигонуклеотидов (праймеров) осуществляли с использованием компьютерной программы Primer premier 6.25 (PREMIER Biosoft International, США) на основании анализа нуклеотидных последовательностей разных типов аденовируса КРС, представленных в информационной базе данных GenBank, которые выравнивали с помощью программ DNASTAR Lasergene 11.2 (DNASTAR, Inc. США), BioEdit 7.0.1 (Informer Technologies, Inc., США).

ПЦР проводили в объёме 25 мкл. Рабочая смесь для каждой реакции содержала: 50 ммоль KCl, 10 ммоль Tris-HCl (pH=9,0), 0,1% Triton X-100, 1,5 ммоль MgCl<sub>2</sub>, 0,25 ммоль каждого dNTP, 10 пмоль каждого праймера, 5 мкл выделенной ДНК и 1,25 ЕД Taq-полимеразы.

Выявление продуктов ПЦР проводили методом горизонтального электрофореза в 1% агарозном геле, с использованием трисацетатного буфера (pH 8,5), содержащего 0,4-0,5 мкг/мл этидия брома и применением ДНК-маркера. Анализ гелей проводили на ультрафиолетовом трансиллюминаторе ( $\lambda = 254$  нм).

Рекомбинантные плазмиды для оценки чувствительности тест-системы конструировали с использованием векторной системы клонирования продуктов ПЦР pGEM T-Easy (Promega, США)). Продукты ПЦР были получены с использованием родоспецифических праймеров, информация о которых представлена ниже, таблица 7. В качестве матрицы использовали культуральный аденовирус BAdV-1 (род *Mastadenovirus*) и полевой вирус (положительная проба), который был предварительно охарактеризован методом секвенирования, как аденовирус KPC BAdV-8 (род *Atadenovirus*).

Аmplицированные фрагменты ДНК выделяли из геля с использованием набора для очистки ПЦР-продуктов Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (ThermoScientific, США), согласно методике производителя.

Трансформацию компетентных клеток *E.coli*, селекцию положительных клонов, выделение и очистку плазмид проводили согласно инструкции производителя векторной системы.

Лигирование проводили в конечном объёме 10 мкл. Рабочая смесь содержала 5-7 мкл очищенной ДНК вставки, 1 мкл вектора, 1 мкл лигазы T4 и буфера для лигирования до конечного объема 10 мкл. Время проведения реакции лигирования составляло 10-12 часов, при температуре  $16 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Полученные плазмиды (pGEM-Mast и pGEM-At) трансформировали в компетентные клетки *E.coli* (штамм *Top Ten*) методом электропорации. Заранее подготовленные электрокомпетентные клетки *E.coli* хранили в замороженном виде при температуре минус  $70 \pm 3^\circ\text{C}$ .

Электропорацию электрокомпетентных клеток *E.coli* плазмидной ДНК и лигазными смесями проводили следующим образом.

Клетки *E.coli* размораживали во льду, там же заранее охлаждали кюветы для электропорации. К клеткам *E.coli* добавляли 1-2 мкл плазмидной ДНК, после чего полученную смесь быстро переносили в кюветы для электропорации. Кюветы помещали в соответствующее гнездо прибора для электропорации, проводили электрический разряд (1800 вольт для 1 мм кювета). Смесь, содержащую трансформированные клетки *E.coli* переносили в

микроцентрифужные пробирки, содержащие 0,5 мл LB-бульона и инкубировали в течение 20 минут при температуре  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ , проводя умеренное встряхивание пробирок. После этого трансформированные клетки *E.coli* высевали на селективную среду (1,5% L-агар, с добавлением ампициллина 100 мкг/мл), заранее разлитую по чашкам Петри.

В последующем вели учет роста колоний трансформированных клеток *E.coli*. У положительно отобранных клонов проверяли наличие целевой вставки фрагмента ДНК BAdV-1 или BAdV-8 методом ПЦР.

Для выделения плазмидной ДНК проводили, пересев колоний в жидкую в селективную среду (LB-бульон, с добавлением ампициллина 100 мкг/мл) из расчета 10 мл бульона на одну колонию с последующим культивированием при температуре  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  в течение 12-16 часов.

Для выделения плазмидной ДНК использовали набор фирмы Promega DNA Purification System, Wizard®Plus, SV Minipreps (США). Выделение проводили в соответствии с инструкцией производителя. Наличие плазмид pGEM-Mast и pGEM-At определяли методом электрофореза в агарозном геле.

С целью подтверждения корректности конструирования плазмид и соответствия встроенных фрагментов ДНК BAdV-1 или BAdV-8 проводили их проверку методом секвенирования по Сэнгеру.

Массовую концентрацию раствора рекомбинантной плазмиды в пробе определяли на спектрофотометре. Молекулярную концентрацию  $n$  (молекул/мкл) рассчитывали из массовой по формуле:

$$n = (C \times NA) / (X_{п.н.} \times M_{1п.н.}),$$

где  $n$  - молекулярная концентрация плазмиды (молекул/мкл);

$C$  - массовая концентрация плазмиды в растворе (г/мкл);

$NA$  - число Авогадро;

$X_{п. н.}$  = число пар нуклеотидных оснований (п. н.) в составе плазмиды;

$M_{1 п. н.}$  = 660 (г/моль) - средняя молярная масса 1 п. н.

**Мониторинг эпизоотической ситуации.** Для проведения серологического мониторинга использовали пробы сыворотки крови крупного рогатого скота,

полученные от невакцинированных животных из разных субъектов РФ (животноводческих хозяйств Вологодской, Воронежской, Калужской, Московской, Тамбовской областей, Алтайского и Краснодарского краев, Республики Башкортостан), которые исследовали на наличие вируснейтрализующих антител к аденовирусу КРС I-го типа, вирусам инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальному, рота- и коронавирусам крупного рогатого скота.

Наличие специфических антител к возбудителям инфекционного ринотрахеита, респираторно-синцитиальной болезни и вирусной диареи, также определяли методом ИФА, с использованием соответствующих коммерческих диагностических ИФА-наборов производства ООО «Ветбиохим» (РФ):

- Набор для выявления антител к вирусу инфекционного ринотрахеита крупного рогатого скота иммуноферментным методом «ИРТ-СЕРОТЕСТ»,
- Набор для выявления антител к респираторно-синцитиальному вирусу крупного рогатого скота иммуноферментным методом «РСИ-СЕРОТЕСТ»,
- Набор для выявления антител к антигену вирусной диареи крупного рогатого скота (ВДКРС) иммуноферментным методом «ВД-СЕРОТЕСТ».

Для оценки распространенности аденовирусов КРС среди поголовья животных также исследовали смывы из носовой полости и с конъюнктивы глаза, полученные от телят и взрослых животных методом ПЦР с использованием разработанной тест-системы.

Часть полевых проб, давших положительный результат в ПЦР, идентифицировали при помощи секвенирования по методу Сэнгера, используя подобранные для ПЦР праймеры. Секвенирование амплифицированного фрагмента генома вируса проводили с использованием флюоресцентно-меченых терминирующих нуклеотидов на автоматическом секвенаторе ABI Prism 3130 («Applied Biosystems», США) согласно инструкции изготовителя-прибора.

### **Прототипная модель вакцины.**

В качестве основного прототипа для изготовления экспериментальных серий вакцин на основе различных типов адьювантов была использована

коммерческая вакцина инактивированная комбинированная против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота- и коронавирусной болезней крупного рогатого скота КОМБОВАК к которой добавили аденовирусный компонент и подобрали более иммунологически эффективный адъювант.

**Культивирование вирусов.** Вирусы выращивали в перевиваемой культуре клеток MDBK, для культивирования ротавируса в питательную среду добавляли трипсин в концентрации 0,25%.

Накопление вирусов в культуре клеток оценивали по цитопатическому действию, накопление вируса ПГ-3 также по гемагглютинирующей активности (РГА ставили микрометодом по общепринятой методике с использованием эритроцитов морской свинки) [40]. Инфекционную активность (титр) вирусов вычисляли по методу Рида и Менча и выражали в lg ТЦД<sub>50</sub>/мл.

В работу брали: ИРТ с инфекционной активностью не менее 7,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл, ВД – не менее 6,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл, ПГ-3 – не менее 7,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл, РС – не менее 5,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл, РВ – не менее 6,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл, КВ – не менее 5,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл, АВ – не менее 6,0 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл.

**Инактивация вирусных антигенов.** Для инактивации вирусных антигенов, входящих в состав поливалентной вакцины, использовали формалин, содержащий не менее 37% формальдегида. Время экспозиции при температуре 37±1°C от 24 до 72 часов.

#### **Определение полноты инактивации вирусов.**

Полноту инактивации вирусов оценивали по отсутствию их размножения в чувствительной культуре клеток (MDBK) в течение четырех последовательных пассажей. Для этого пробу вируса после инактивации в объеме 5 мл помещали в диализный мешок («Thermoscientific», США) и ставили на диализ против 100-кратного объема стерильного физиологического раствора при температуре 2-8°C в течении 12 часов. После этого пробу вируса вносили в культуральный матрас со сформировавшейся 24-48 часовой культурой клеток MDBK. «Зараженную» культуру клеток инкубировали при температуре 37±1°C в течении 4-5 суток.

Наличие вируса определяли по цитопатическому эффекту. Отсутствие цитопатического эффекта на культуре клеток на протяжении всех четырех пассажей свидетельствовало о полной инаktivации соответствующего вируса.

**Адьюванты.** В работе были использованы следующие адьюванты: MONTANIDE ISA 50, ISA 61, ISA 70, ISA 71, ISA 206, ISA 773; высокомолекулярный синтетический полиэлектrolит (карбомер) со смесью поверхностно-активных гликозидов; 6% гель гидроокиси алюминия (ГОА) с добавлением сапони́на; комплексный адьювант, состоящий из липосом и сапони́на (ISCOM); полисахаридные адьюванты грибного и растительного происхождения.

Образцы вакцин, содержащие в качестве адьюванта ГОА, готовили путем интенсивного смешивания во флаконах. Для изготовления вакцин, содержащих масляные адьюванты, использовали лабораторный диспергатор IKA T25 basic (10.000 об/минуту, в течение 5 минут). Образцы вакцин, содержащие в качестве адьюванта ISCOM, полисахаридные адьюванты, синтетический полиэлектrolит, изготавливали с использованием лабораторной магнитной мешалки Microstirrer (1000 об/минуту, в течение 5 минут).

**Изучение стабильности готовых вакцинных препаратов.** Для изучения стабильности готового препарата (только для эмульгированных вакцин) сразу после изготовления применяли метод центрифугирования в течение 30 минут при скорости вращения ротора - 4000 оборотов в минуту, с использованием центрифужных пробирок EPPENDORF, вместимостью 50 мл и центрифуги лабораторной EPPENDORF 5810R.

Также использовали метод «ускоренного старения», путем выдерживания изготовленных образцов вакцин при температуре  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$  в течение 14 суток.

Кроме того, вели наблюдение за состоянием образцов в процессе их хранения при температуре  $2-8^{\circ}\text{C}$ .

**Определение стерильности.** Контроль стерильности на каждом этапе проводили согласно ГОСТ 28085-2013 «Средства лекарственные биологические

для ветеринарного применения. Метод бактериологического контроля стерильности».

Опыты по испытанию экспериментальных серий вакцин проводили в Вышневолоцком филиале ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН, в животноводческих хозяйствах Рязанской и Смоленской областей.

**Экспериментальные животные. Оценка безвредности и антигенной активности экспериментальных вакцин.** В качестве лабораторной модели, для оценки безвредности, использовали группы морских свинок ( $n=5-10$ ) массой 350-400 г, сформированные по принципу аналогов. Вакцину вводили внутримышечно в дозе 2,0 мл (по 1 мл в разные тазовые конечности), за животными вели наблюдение в течение 14 суток.

Антигенную активность образцов на лабораторной модели оценивали путем проведения внутримышечной вакцинации группы морских свинок ( $n=10$ , на каждый образец), массой 350-450 г, сформированные по принципу аналогов в дозе 1,0 мл, с последующим крововзятием и постановкой реакции нейтрализации (РН) с сыворотками крови вакцинированных животных.

Безвредность и антигенную активность изготовленных образцов в опыте на естественно-восприимчивых животных оценивали путем проведения двукратной внутримышечной иммунизации коров за 1-2 месяца до осеменения ( $n=30$  на каждый образец вакцины), сформированных в соответствующие группы по принципу аналогов, в дозе 3,0 мл. Кровь брали выборочно по 10 голов из каждой группы перед вакцинацией ( $D_0$ ) и через 21 сутки после первой ( $D_{21}$ ) и второй иммунизаций ( $D_{42}$ ), с последующим исследованием сыворотки крови по уровню специфических антител в РН.

Для оценки безвредности за всеми естественно-восприимчивыми животными вели наблюдение в течение 14 суток, отмечая общую и местную реакцию у всех животных, использованных в опыте. А также проводили термометрию – два раза в сутки (утром и вечером).

Материалом для исследований служила сыворотка крови экспериментальных животных, в которой определяли содержание специфических антител в различных серологических тестах.

**Клинические методы.** В работе использовали общие методы клинического исследования: осмотр, пальпацию и термометрию.

**Реакция нейтрализации (РН).** РН ставили микрометодом в 96-луночных полистироловых планшетах по стандартной методике с рабочей дозой соответствующего вируса (100-300 ТЦД<sub>50</sub>/мл). Вируснейтрализующий титр сыворотки выражали как предельное ее разведение, ингибирующее развитие ЦПД вируса в 50% зараженных культур клеток [4, 40].

**Подбор оптимальной иммунизирующей дозы.** Для определения оптимальной иммунизирующей дозы вакцины использовали три группы коров за 1-2 месяца до осеменения (n=15 в каждой группе), которых иммунизировали внутримышечно двукратно с интервалом 21 сутки в дозах 2,0 мл (первую группу), 3,0 мл (вторую группу) и 4,0 мл (третью группу). А также две группы телят в возрасте 2,5-3 месяца (n=15 в каждой группе), которых иммунизировали двукратно внутримышечно в дозах 1,0 мл (первую группу) и 2,0 мл (вторую группу). Кровь у животных брали перед вакцинацией (Д<sub>0</sub>) и через 21 сутки после второй иммунизации (Д<sub>42</sub>), с последующим исследованием сыворотки крови по уровню специфических антител в РН. В качестве контроля использовали группы невакцинированных животных (по 10 голов коров и телят).

**Оценка колострального иммунитета и эффективности экспериментальной вакцины.** Оценку напряженности колострального иммунитета и эффективности применения вакцины в производственных условиях проводили в животноводческом хозяйстве, неблагополучном по респираторным и кишечным инфекционным заболеваниям телят. В хозяйстве вакцинировали стельных коров - дважды: первый раз - за 50-60 суток до отела, второй раз – через 14-21 сутки, в дозе 3,0 мл. Полученных телят первый раз вакцинировали в возрасте 25-30 суток, повторно через 20-25 суток, в дозе 2,0 мл. В качестве



контроля использовали группы невакцинированных стельных коров и телят, которые содержались в другом помещении.

В контрольной и опытной группах коров были выбраны животные у которых брали кровь до вакцинации, через 14-21 сутки после первой вакцинации (во время проведения второй вакцинации) и сразу после отела. У невакцинированных животных брали пробы крови в тоже время, что и у вакцинированных. Также брали кровь у телят, полученных от выбранных коров, в первые 24-48 часов, при этом обязательно отслеживали своевременную выпойку молозива всем телятам, использованным в опыте.

Эффективность применения вакцины определяли по эпизоотологическим и хозяйственным показателям: заболеваемость телят респираторными и кишечными инфекциями, смертность телят, а также их вынужденная выбраковка в опытной и контрольной группах.

**Оценка стабильности физических и иммунобиологических свойств вакцины в процессе хранения (в течение срока годности).** Для оценки стабильности физических и иммунобиологических свойств вакцины в процессе хранения были изготовлены три экспериментальные серии вакцины, которые заложили на хранение при температуре 2-8°C.

Испытания проводили сразу после изготовления и через 12, 18 и 24 месяца хранения по показателям: внешний вид (посредством визуального контроля) и антигенная активность всех вирусных компонентов (в опытах на лабораторных животных – морских свинках, массой 300-350 г).

**Статистическая обработка результатов.** Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с использованием программ Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, США), Stat Plus 2009 (AnalystSoft Inc., США).

При этом приняты следующие обозначения:

n – число наблюдений или животных в опыте;

r – коэффициент корреляции;

P – критерий достоверности.

Значения критерия достоверности оценивали по таблице вероятностей Стьюдента-Фишера в зависимости от объема анализируемого материала.

Вероятность различий считалась существенной при  $P > 0,05$ .

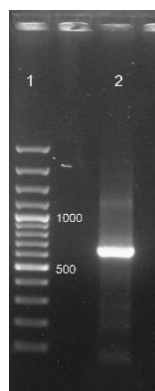
#### **4. Выделение и идентификация полевого изолята аденовируса КРС. Оптимизация технологии его культивирования, оценка биологических свойств. Отработка методов инактивации. Изучение антигенных свойств.**

##### **4.1. Выделение и идентификация полевого изолята аденовируса КРС.**

Для выделения полевого изолята аденовируса КРС было исследовано 174 пробы смывов с конъюнктивы глаза и слизистой носовой полости из животноводческих хозяйств Центрального Федерального округа РФ. При проведении слепых пассажей в культуре клеток Т1 были выявлены 4 пробы, внесение которых (предварительно смешанных с гипериммунной сывороткой, содержащей вируснейтрализующие антитела к вирусам инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальному вирусу, рота- и коронавирусам КРС) сопровождалось развитием цитопатических изменений.

В последующем в реакции нейтрализации с референтными антисыворотками и методом ПЦР с использованием специфических праймеров к фрагменту ДНК аденовируса КРС, кодирующего гексон [113], было установлено, что одна из четырех проб выделенных вирусов является условно-положительной на аденовирус КРС, рисунок 6.

*Рисунок 6.*  
*Электрофореграмма амплифицированного фрагмента ДНК аденовируса КРС*



1 – маркер молекулярного веса ДНК;

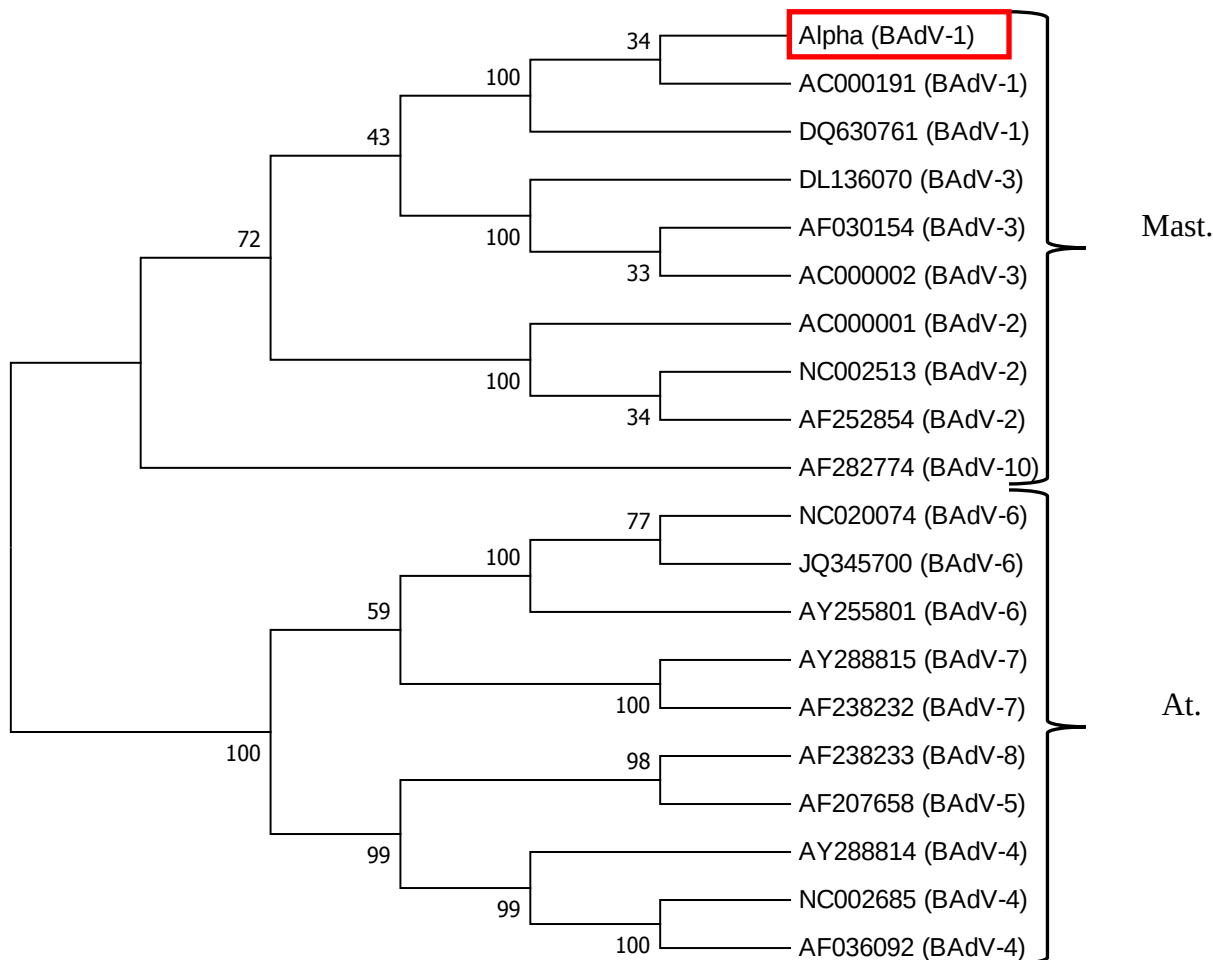
2 – условно-положительная проба

Методом секвенирования фрагмента генома выделенного вируса, размером 644 п.н., с последующим изучением полученной последовательности участка ДНК, было подтверждено, что он является аденовирусом КРС. Кроме того, путем

сравнительного анализа расшифрованной последовательности нуклеотидов участка ДНК, кодирующего гексон, с нуклеотидными последовательностями разных типов аденовируса КРС, представленных в базе данных ресурса GenBank был определен тип выделенного аденовируса КРС, рисунок 7.

**Рисунок 7.**

**Филогенетический анализ изолятов аденовируса КРС разных типов на основе фрагмента генома (644 п.н.), кодирующего гексон.**



На рисунке 7 выделенный нами штамм аденовируса КРС обозначен как *Alpha*.

Филогенетический анализ штаммов на основе фрагмента генома, кодирующего гексон, показал принадлежность выделенного нами штамма к первому типу аденовируса КРС и соответственно к роду *Mastadenovirus*. Степень сходства, выделенного изолята с аденовирусом КРС I-го типа, представленного в базе данных ресурса GenBank, составила 99% на исследуемом участке.

#### 4.2. Оптимизация технологии культивирования аденовируса КРС, оценка его биологических свойств.

В дальнейшем выделенный аденовирус КРС I-го типа использовали для заражения перевиваемой культуры клеток почки телят MDBK. Всего было проведено 27 пассажей выделенного вируса в указанной культуре клеток.

В ходе проведенных исследований были подобраны:

- наиболее оптимальное время культивирования клеточной культуры MDBK до заражения, таблица 1.
- оптимальная доза заражения, таблица 2.
- оптимальная продолжительность культивирования, зараженных клеток (таблица 3), необходимая для максимального накопления вируса в перевиваемой культуре.

**Таблица 1.**

**Определение оптимального времени культивирования клеточной культуры MDBK (площадь матраса 75 см<sup>2</sup>)**

| Время культивирования до заражения, часы | Заражающая доза                              | Объем полученной вирусосодержащей суспензии | Инфекционная активность вируса*          |
|------------------------------------------|----------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------|
| 24                                       | 1 мл – 10 <sup>5</sup> ТЦД <sub>50</sub> /мл | 35 мл                                       | 10 <sup>5,66</sup> ТЦД <sub>50</sub> /мл |
| 48                                       | 1 мл – 10 <sup>5</sup> ТЦД <sub>50</sub> /мл | 35 мл                                       | 10 <sup>6,0</sup> ТЦД <sub>50</sub> /мл  |
| 72                                       | 1 мл – 10 <sup>5</sup> ТЦД <sub>50</sub> /мл | 35 мл                                       | 10 <sup>5,0</sup> ТЦД <sub>50</sub> /мл  |

\* через 120 часов культивирования

**Таблица 2.**

**Подбор оптимальной заражающей дозы для 48 часовой культуры клеток MDBK (площадь матраса 75 см<sup>2</sup>)**

| Заражающая доза                                | Состояние культуры клеток (уровень проявления ЦПД вируса в % от общей площади посева) | Объем полученной вирусосодержащей суспензии | Инфекционная активность вируса*          |
|------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|------------------------------------------|
| 1 мл - 10 <sup>4</sup> ТЦД <sub>50</sub> /мл   | ≈ 60%                                                                                 | 35 мл                                       | 10 <sup>3,66</sup> ТЦД <sub>50</sub> /мл |
| 1 мл - 10 <sup>4,5</sup> ТЦД <sub>50</sub> /мл | ≈ 75%                                                                                 | 35 мл                                       | 10 <sup>5,0</sup> ТЦД <sub>50</sub> /мл  |
| 1 мл – 10 <sup>5</sup> ТЦД <sub>50</sub> /мл   | ≈ 95%                                                                                 | 35 мл                                       | 10 <sup>6,0</sup> ТЦД <sub>50</sub> /мл  |
| 1 мл – 10 <sup>5,5</sup> ТЦД <sub>50</sub> /мл | ≈ 99%                                                                                 | 35 мл                                       | 10 <sup>6,33</sup> ТЦД <sub>50</sub> /мл |
| 1 мл – 10 <sup>6</sup> ТЦД <sub>50</sub> /мл   | ≈ 99%                                                                                 | 35 мл                                       | 10 <sup>6,76</sup> ТЦД <sub>50</sub> /мл |

\* через 120 часов культивирования

Таблица 3.

**Выбор оптимального времени съема вирусосодержащей суспензии\***

| <b>Время после заражения культуры клеток</b> | <b>Состояние культуры клеток (уровень проявления ЦПД вируса в % от общей площади посева)</b> | <b>Объем полученной вирусосодержащей суспензии</b> | <b>Инфекционная активность вируса*</b> |
|----------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------|----------------------------------------|
| 48 часов                                     | ≈ 55%                                                                                        | 35 мл                                              | $10^{4,5}$ ТЦД <sub>50</sub> /мл       |
| 72 часа                                      | ≈ 80%                                                                                        | 35 мл                                              | $10^{5,5}$ ТЦД <sub>50</sub> /мл       |
| 96 часов                                     | ≈ 95%                                                                                        | 35 мл                                              | $10^{6,33}$ ТЦД <sub>50</sub> /мл      |
| 120 часов                                    | ≈ 99%                                                                                        | 35 мл                                              | $10^{6,5}$ ТЦД <sub>50</sub> /мл       |
| 144 часа                                     | ≈ 99%                                                                                        | 35 мл                                              | $10^{6,5}$ ТЦД <sub>50</sub> /мл       |

\* заражающая доза во всех случаях составляла 1 мл –  $10^{6,0}$  ТЦД<sub>50</sub>/мл на 1 матрас с 48 часовой культурой клеток MDBK

Таким образом, наиболее подходящим временем культивирования клеточной культуры MDBK до заражения, позволяющим получить наибольшую инфекционную активность вируса  $10^{6,0}$  ТЦД<sub>50</sub>/мл является 48 часов. При проведении заражения культуры клеток через 24 и 72 часа после пересева, полученная в результате культивирования вирусная суспензия имеет меньшую активность -  $10^{5,66}$  ТЦД<sub>50</sub>/мл и  $10^{5,0}$  ТЦД<sub>50</sub>/мл соответственно.

Оптимальная доза аденовируса КРС для заражения культуры клеток MDBK (матрас с 48 часовой культурой, площадью 75 см<sup>2</sup>) составляет 1 мл с активностью  $10^{6,0}$  ТЦД<sub>50</sub>/мл, что примерно соответствует 1,5 ТЦД<sub>50</sub> на одну клетку. Указанная заражающая доза аденовируса, при прочих равных условиях, позволяет получать суспензию с инфекционной активностью  $10^{6,76}$  ТЦД<sub>50</sub>/мл.

Оптимальное время культивирования зараженной культуры клеток, позволяющее получить максимальное накопление вируса в суспензии составляет 120±4 часов.

В вирусологической практике для более эффективного взаимодействия вируса с клеткой часто используют метод заражения клеточной культуры с проведением «контакта». Его суть заключается в следующем. После формирования клеточного монослоя из культурального матраса (роллера) удаляют ростовую среду, вносят заражающую вирусосодержащую суспензию, равномерно ее распределяют по культуре клеток, после чего культуральный

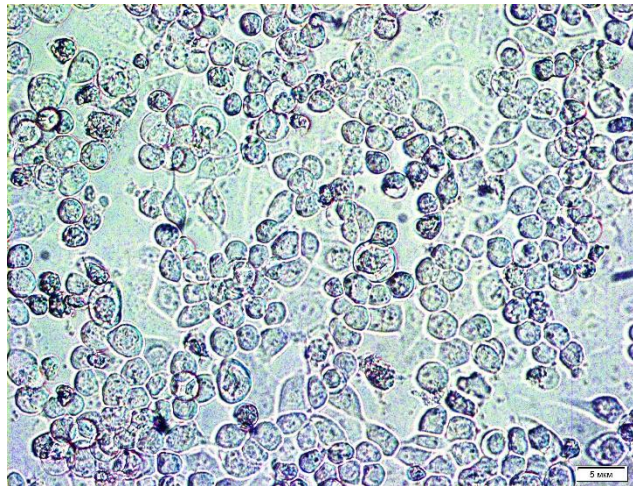
матрас помещают в термостат при температуре  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Спустя час в матрас вносят поддерживающую среду и проводят культивирование в течение необходимого времени 48-120 часов или больше.

В ходе проведенных сравнительных испытаний было установлено, что применение метода заражения культуры MDBK с проведением «контакта» позволяет получать вирус с активностью на  $0,5-0,77 \lg$  выше, чем при бесконтактном внесении поддерживающей питательной среды.

В результате проведенных работ по адаптации и последующей оптимизации условий культивирования удалось получить вирусосодержащую суспензию с инфекционной активностью  $7,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ . При этом наблюдали характерную микрокартину цитопатических изменений в культуре клеток MDBK, вызванная аденовирусом КРС, рисунок 8. Которая выражалась в дегенерации клеток зараженного монослоя. Клетки приобретали округлую форму, образовывали конгломераты, вследствие чего происходило разрушение монослоя.

*Рисунок 8.*

***Цитопатические изменения в культуре клеток MDBK,  
вызванные выделенным аденовирусом КРС***



Другой часто используемый способ оптимизации контакта между вирусом и клеткой – добавление в заражающую вирусосодержащую суспензию и поддерживающую среду трипсина в концентрации  $0,25\pm 0,1\%$  в нашем случае не дал заметного повышения на выходе инфекционной активности культивируемого аденовируса.

Использование роллерного метода культивирования, за счет увеличения площади монослоя культуры клеток и уменьшения объема поддерживающей среды (в перерасчете на одну клетку MDBK), позволяет еще увеличить выход аденовируса до 7,23-7,50 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл.

У выделенного аденовируса КРС I-го типа не было выявлено гемагглютинирующей и гемадсорбирующей активности в отношении эритроцитов свиньи, кролика, белой мыши, морской свинки, петуха, барана.

Выделенный штамм аденовируса КРС I-го типа, получивший название «Альфа» депонирован в Государственную коллекцию вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, номер депонента ГKB №2732 (Удостоверение о депонировании штамма «Альфа» аденовируса КРС представлено в приложении №1).

#### 4.3. Отработка методов инактивации выделенного аденовируса КРС.

В качестве инактивирующих агентов были опробованы следующие соединения: формалин (содержащий 37% формальдегида), димер этиленimina и β-пропиолактон в различных концентрациях и с разным временем экспозиции. Инактивацию проводили при температуре 37±1°C.

Оценку эффективности инактивации осуществляли путем проведения четырех кратных последовательных пассажей в культуре клеток MDBK, таблица 4.

*Таблица 4.*

##### *Отработка концентрации и времени экспозиции различных инактивирующих агентов*

| Агент    | Концентрация | Время экспозиции, ч | Наличие (+) / отсутствие (-)<br>ЦПД вируса в пассаже № |   |   |   |
|----------|--------------|---------------------|--------------------------------------------------------|---|---|---|
|          |              |                     | 1                                                      | 2 | 3 | 4 |
| Формалин | 0,1%         | 24                  | +                                                      | + | + | + |
|          |              | 48                  | +                                                      | + | + | + |
|          |              | 72                  | +                                                      | + | + | + |
|          |              | 96                  | -                                                      | - | + | + |
|          | 0,2 %        | 24                  | +                                                      | + | + | + |
|          |              | 48                  | -                                                      | + | + | + |
|          |              | 72                  | -                                                      | - | - | + |
|          |              | 96                  | -                                                      | - | - | + |



|                      |       |    |   |   |   |   |
|----------------------|-------|----|---|---|---|---|
|                      | 0,3%  | 24 | + | + | + | + |
|                      |       | 48 | - | - | - | + |
|                      |       | 72 | - | - | - | - |
|                      |       | 96 | - | - | - | - |
| Димер<br>этиленимина | 0,05% | 12 | + | + | + | + |
|                      |       | 18 | + | + | + | + |
|                      |       | 24 | + | + | + | + |
|                      |       | 48 | + | + | + | + |
|                      | 0,1%  | 12 | + | + | + | + |
|                      |       | 18 | - | + | + | + |
|                      |       | 24 | - | - | + | + |
|                      |       | 48 | - | - | + | + |
|                      | 0,2%  | 12 | - | - | + | + |
|                      |       | 18 | - | - | - | - |
|                      |       | 24 | - | - | - | - |
|                      |       | 48 | - | - | - | - |
| β-пропиолактон       | 0,05% | 2  | + | + | + | + |
|                      |       | 24 | + | + | + | + |
|                      |       | 48 | + | + | + | + |
|                      |       | 72 | + | + | + | + |
|                      | 0,1%  | 2  | + | + | + | + |
|                      |       | 24 | + | + | + | + |
|                      |       | 48 | + | + | + | + |
|                      |       | 72 | + | + | + | + |
|                      | 0,2%  | 2  | + | + | + | + |
|                      |       | 24 | - | - | + | + |
|                      |       | 48 | - | - | - | + |
|                      |       | 72 | - | - | - | + |
|                      | 0,3%  | 2  | - | - | + | + |
|                      |       | 24 | - | - | - | - |
|                      |       | 48 | - | - | - | - |
|                      |       | 72 | - | - | - | - |

Из представленных результатов, следует, что для гарантированной инактивации аденовируса КРС подходят следующие варианты и режимы:

- формалин в концентрации 0,3 % при времени экспозиции 72 часа;
- димерэтиленимин в конечной концентрации 0,2 % при времени экспозиции 24 часа;
- β-пропиолактон в конечной концентрации 0,3 % при времени экспозиции 48 часов.

Для дальнейшей работы нами был выбран в качестве инактивирующего агента формалин, содержащий 37% формальдегида, как наиболее распространенный и удобный в работе.

#### 4.4. Изучение антигенных свойств инактивированного штамма «Альфа» аденовируса КРС.

Для изучения антигенных свойств выделенного аденовируса КРС и оценки возможности его использования в качестве кандидата в вакцинные штаммы были изготовлены 4 экспериментальных варианта моновакцины с разным содержанием количества вирусосодержащей суспензии (недостающий объем был доведен до 100% за счет физиологического раствора) и двумя разными адъювантами: неполным адъювантом Фрейнда (НАФ) и ГОА. Для изготовления всех вариантов был использован один пул инактивированного аденовируса КРС, инфекционная активность которого до инактивации составила  $6,0 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ .

Каждым вариантом вакцинировали группу морских свинок ( $n=5$ ) и телят ( $n=7$ ) внутримышечно в дозах 1 и 2 мл соответственно, однократно. Кровь брали у всех животных (включая контрольных – невакцинированных животных,  $n=5$  для морских свинок и  $n=7$  для телят) до ( $D_0$ ) и через 21 сутки после вакцинации ( $D_{21}$ ). Антигенные свойства вируса оценивали по уровню вируснейтрализующих антител в сыворотке крови вакцинированных лабораторных и естественно-восприимчивых животных, таблицы 5 и 6.

*Таблица 5.*

*Уровень вируснейтрализующих антител  
в пробах сыворотки крови лабораторных животных*

| Адъювант             | Количество вирусосодержащей суспензии | Уровень вируснейтрализующих антител* |          |
|----------------------|---------------------------------------|--------------------------------------|----------|
|                      |                                       | $D_0$                                | $D_{21}$ |
| НАФ                  | 50%                                   | 0                                    | 97       |
| НАФ                  | 20%                                   | 0                                    | 74       |
| ГОА                  | 80%                                   | 0                                    | 56       |
| ГОА                  | 20%                                   | 0                                    | 42       |
| Контрольные животные | 0%                                    | 0                                    | 0        |

\* здесь и далее приведены средние геометрические значения титров антител по группе, выраженные в обратных величинах.

Таблица 6.

**Уровень вируснейтрализующих антител  
в пробах сыворотки крови естественно-восприимчивых животных**

| Адьювант             | Количество вируссодержащей суспензии | Уровень вируснейтрализующих антител* |                 |
|----------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-----------------|
|                      |                                      | Д <sub>0</sub>                       | Д <sub>21</sub> |
| НАФ                  | 50%                                  | 0                                    | 105             |
| НАФ                  | 20%                                  | 0                                    | 78              |
| ГОА                  | 80%                                  | 0                                    | 58              |
| ГОА                  | 20%                                  | 0                                    | 39              |
| Контрольные животные | 0%                                   | 0                                    | 0               |

Полученные результаты свидетельствуют, что все экспериментальные варианты моновакцины обладают выраженной антигенной активностью и вызывают выработку специфических вируснейтрализующих антител как у морских свинок ( $P < 0,03$ ), так и у телят ( $P < 0,02$ ). При этом наиболее высокий уровень антител зафиксирован у животных (обоих видов), которым вводили варианты вакцины, изготовленные с использованием неполного адьюванта Фрейнда, что вполне закономерно, поскольку НАФ является общепризнанным мощным стимулятором гуморального иммунного ответа [19, 31, 90].

Проведенные исследования показали, что выделенный аденовирус КРС является антигенно активным и может быть использован в качестве вакцинного штамма для изготовления инактивированных вакцин.

## 5. Разработка родоспецифичной тест-системы ПЦР для выявления ДНК аденовируса крупного рогатого скота.

Все нуклеотидные последовательности, взятые из базы данных ресурса GenBank, были предварительно выровнены и обрезаны по размеру участка, кодирующего гексон аденовируса, который является наиболее консервативным белком для всех типов аденовируса КРС [88, 113, 127, 142]. Всего использовали 34 различные последовательности данного гена.

Поскольку классифицировано большое количество типов аденовируса КРС, относящихся к родам *Mastadenovirus* и *Atadenovirus* нами было принято решение использовать гнездовой вариант ПЦР. При этом для проведения первой амплификации использовали праймеры, общие для всех типов аденовируса КРС (BALF и BARF) [113], а для проведения второй разработали индивидуальные пары для каждого рода (Mast-F, Mast-R и At-F, At-R соответственно), таблица 7.

Таблица 7.

*Набор праймеров, для выявления ДНК аденовируса КРС*

| Название | Назначение            | Последовательность             | Размер фрагмента |
|----------|-----------------------|--------------------------------|------------------|
| BALF     | общие                 | 5-GRTGGTCIYTRGATRTRATGGA-3     | 644 п.н.         |
| BARF     |                       | 5-AAGYCTRTCATCYCCDGGCCA-3      |                  |
| Mast-F   | для рода              | 5-ATTCAAGTKCCDCAAAAGTTTTTGC-3  | 431 п.н.         |
| Mast-R   | <i>Mastadenovirus</i> | 5-GCCWGARTAHGTRAAGTASGGATCG-3  |                  |
| At-F     | для рода              | 5-ATTCARGTWCCWCARAARTTTTTTGC-3 | 432 п.н.         |
| At-R     | <i>Atadenovirus</i>   | 5-CCAGAATATKHAAAATTKGGAT-3     |                  |

где: Y=C+T, R=A+G, D=G+A+T, W=A+T, K=G+T, S=G+C, H=A+T+C, I = inosine.

Для оптимизации условий проведения ПЦР и оценки чувствительности были сконструированы две рекомбинантные плазмиды (pGEM-Mast и pGEM-At) с использованием векторной системы клонирования продуктов ПЦР pGEM T-Easy. Также использовали культуральный аденовирус BAdV-1 (род *Mastadenovirus*) и полевой вирус (положительная проба), который был предварительно охарактеризован методом секвенирования, как аденовирус КРС BAdV-8 (род *Atadenovirus*). Используя разработанные праймеры нами были получены соответствующие фрагменты геномов BAdV-1 и BAdV-8, которые после

выделения из агарозного геля и проведения очистки были встроены в векторы pGEM T-Easy.

Трансформацию компетентных клеток *E.coli* (штамм *Top Ten*) проводили методом электропорации, по стандартной методике (1800 вольт для кювета размером 1 мм). Трансформированные клетки *E.coli* инкубировали в LB-бульоне в течение 20 минут при температуре  $37\pm 1^\circ\text{C}$ , после чего высевали на чашки Петри с селективной средой, содержащей ампициллин (100 мкг/мл). Чашки Петри выдерживали в термостате при температуре  $37\pm 1^\circ\text{C}$ , проводя учет роста колоний *E.coli*.

Проверку наличия плазмидной вставки проводили методом ПЦР, предварительно пересекая колонии в LB-бульон с добавлением ампициллина (100 мкг/мл). Для выделения плазмидной ДНК использовали набор фирмы Promega DNA Purification System, Wizard®Plus, SV Minipreps (США).

Корректность конструирования плазмид и соответствие встроенных фрагментов ДНК BAdV-1 или BAdV-8 подтверждали методом секвенирования по Сэнгеру с использованием соответствующих праймеров, таблица 7.

В процессе оптимизации условий проведения ПЦР были подобраны оптимальные температурно-временные режимы для всех стадий реакции, таблица 8.

**Таблица 8.**

**Температурно-временные режимы проведения ПЦР**

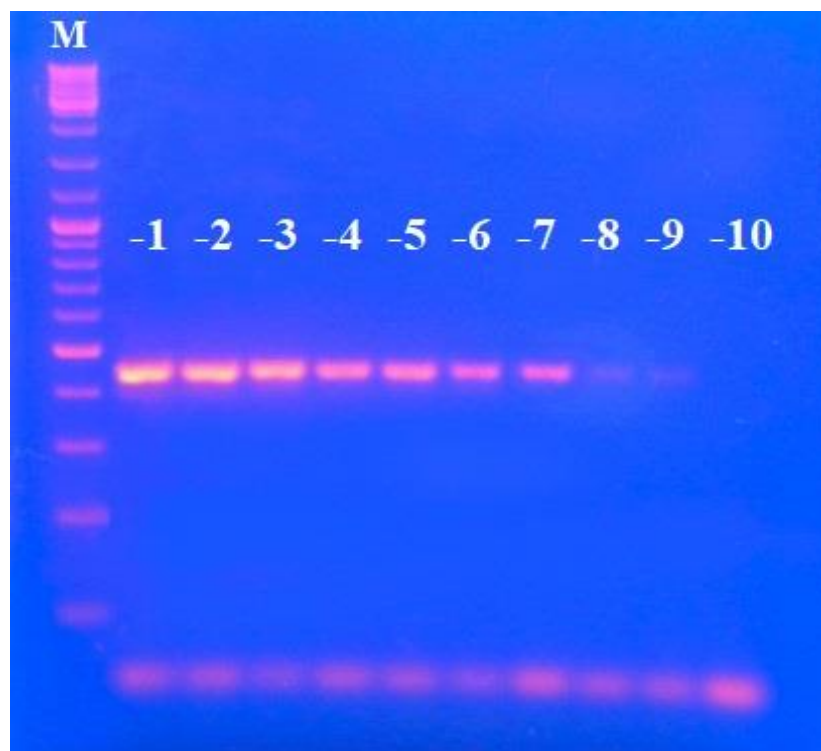
| <b>I-я амплификация BALF и BARF</b>                         |                      |                   |
|-------------------------------------------------------------|----------------------|-------------------|
| температура                                                 | время                | количество циклов |
| 94 <sup>0</sup> C                                           | 5 мин                | 1                 |
| 94 <sup>0</sup> C<br>53 <sup>0</sup> C<br>72 <sup>0</sup> C | 15 с<br>15 с<br>30 с | 30                |
| 72 <sup>0</sup> C                                           | 5 мин                | 1                 |

| II-я амплификация Mast-F, Mast-R |       |                   | II-я амплификация At-F, At-R |       |                   |
|----------------------------------|-------|-------------------|------------------------------|-------|-------------------|
| температура                      | время | количество циклов | температура                  | время | количество циклов |
| 94 <sup>0</sup> С                | 5 мин | 1                 | 94 <sup>0</sup> С            | 5 мин | 1                 |
| 94 <sup>0</sup> С                | 15 с  | 30                | 94 <sup>0</sup> С            | 15 с  | 30                |
| 52 <sup>0</sup> С                | 15 с  |                   | 52 <sup>0</sup> С            | 15 с  |                   |
| 72 <sup>0</sup> С                | 30 с  |                   | 72 <sup>0</sup> С            | 30 с  |                   |
| 72 <sup>0</sup> С                | 5 мин | 1                 | 72 <sup>0</sup> С            | 5 мин | 1                 |

Для оценки чувствительности разработанной тест-системы определяли молярную концентрацию каждой плазмиды, после чего готовили последовательные десятикратные разведения исследуемых проб, пределом чувствительности считали последнее разведение плазмиды, при котором наблюдали положительный результат ПЦР.

Чувствительность разработанной тест-системы составляет  $5,4 \times 10^3$  мол/мкл для рода *Mastadenovirus* и  $4,3 \times 10^3$  мол/мкл для рода *Atadenovirus*, рисунки 9 и 10.

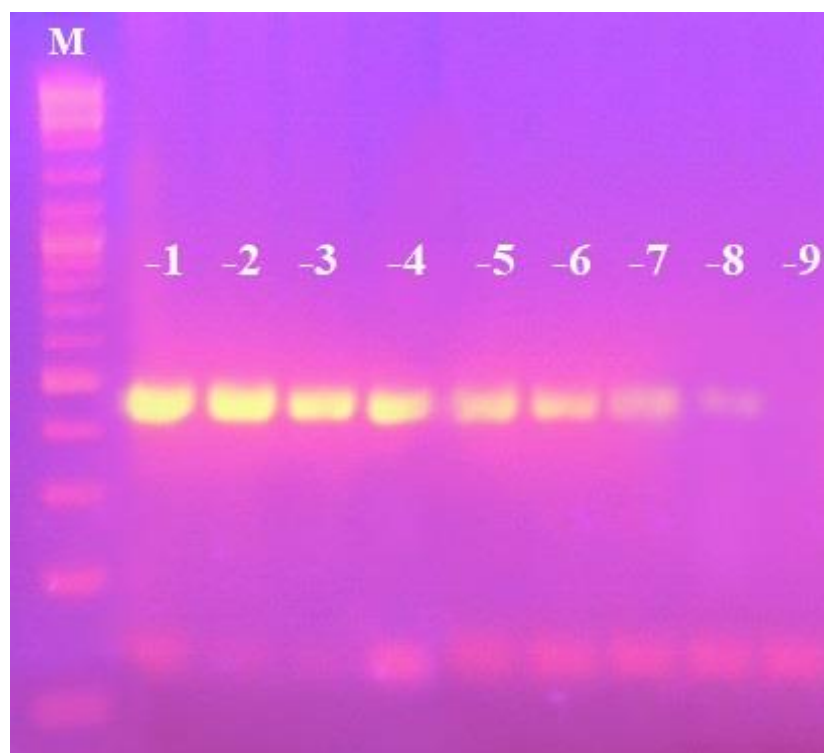
**Рисунок 9.**  
**Электрофореграмма определения чувствительности ПЦР (плазмида pGEM-Mast)**



**М** - маркер молекулярной массы ДНК; **(-1) – (-10)** - последовательные десятикратные разведения рекомбинантной плазмиды pGEM-Mast.

Рисунок 10.

Электрофореграмма определения чувствительности ПЦР (плазмида pGEM-At)



М - маркер молекулярной массы ДНК; (-1) – (-9) - последовательные десятикратные разведения рекомбинантной плазмиды pGEM-At.

Специфичность тест-системы проверяли, используя панель образцов, содержащую, наиболее часто встречающиеся вирусные и бактериальные патогены, вызывающие заболевания со сходной клинической картиной, а также носовые смывы, полученные от клинически здоровой коровы (животное содержалось в частном секторе), незараженные культуры клеток Т1 и MDBK. В качестве положительного контроля использовали пробы, содержащие ДНК аденовируса BAdV-1 и BAdV-8, таблица 9.

Таблица 9.

Чувствительность тест-системы ПЦР для обнаружения ДНК аденовируса КРС

| Результат обнаружения ДНК аденовируса КРС |                |            |
|-------------------------------------------|----------------|------------|
| Проба                                     | Mast-F, Mast-R | At-F, At-R |
| К+                                        | + (BAdV-1)     | + (BAdV-8) |
| Носовые смывы от КРС                      | -              | -          |
| Культура клеток Т1                        | -              | -          |
| Культура клеток MDBK                      | -              | -          |
| Вирус вирусной диареи                     | -              | -          |

|                                  |   |   |
|----------------------------------|---|---|
| Вирус ИРТ                        | - | - |
| Вирус ПГ-3                       | - | - |
| Вирус РС                         | - | - |
| Ротавирус                        | - | - |
| Коронавирус                      | - | - |
| <i>P. multocida</i> тип <i>A</i> | - | - |
| <i>P. multocida</i> тип <i>B</i> | - | - |
| <i>P. multocida</i> тип <i>D</i> | - | - |
| <i>M. haemolytica</i>            | - | - |
| <i>E.coli</i> O101               | - | - |
| <i>E.coli</i> O141               | - | - |

Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии ложноположительного реагирования разработанной тест системы, т.е. показывают ее высокую специфичность к аденовирусу КРС.

Таким образом, в ходе проведенных исследований была разработана тест-система для выявления ДНК аденовируса КРС методом полимеразной цепной реакции, чувствительность и специфичность которой позволяют ее использовать для проведения массовых диагностических исследований.

На разработанную тест-систему для обнаружения аденовирусов КРС методом полимеразной цепной реакции была подготовлена нормативная документация, для проведения ее регистрации.

В последующем разработанная тест-система была использована для исследования полевых проб материала – носовых и глазных смывов, полученных от телят с характерной клинической картиной, присущей респираторным заболеваниям.



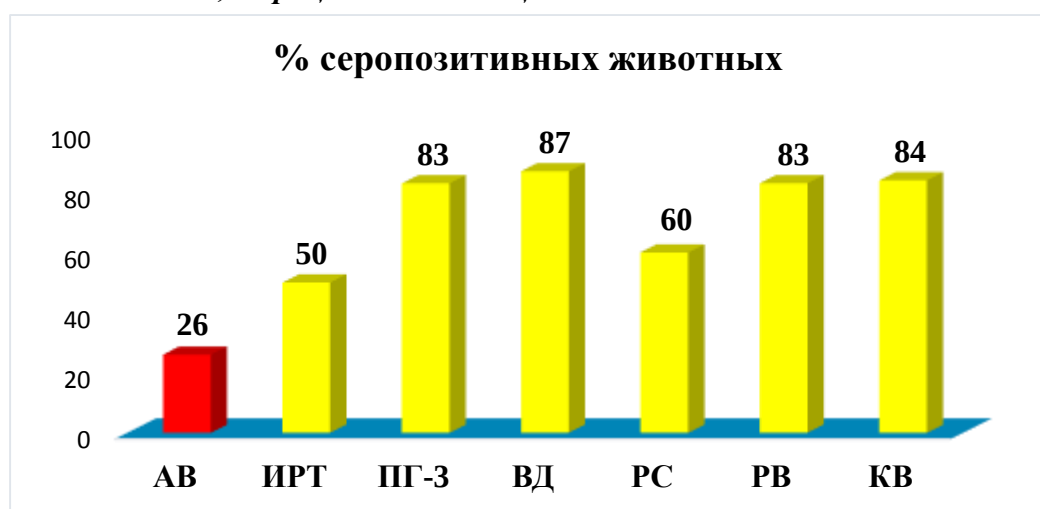
## 6. Изучение эпизоотической ситуации по основным респираторным и желудочно-кишечным заболеваниям телят вирусной этиологии в хозяйствах РФ.

В ходе серологического мониторинга провели исследование 1255 проб сыворотки крови коров и телят, полученных от невакцинированных животных, из 15 хозяйств Вологодской, Воронежской, Калужской, Московской, Тамбовской областей, Алтайского и Краснодарского краев, Республики Башкортостан, неблагополучных по основным респираторным и кишечным инфекционным заболеваниям телят. Для обнаружения специфических антител применяли реакцию нейтрализации с использованием соответствующих штаммов вирусов, в том числе аденовируса КРС I-го типа.

В результате было выявлено наличие специфических антител к возбудителям: аденовирусной инфекции (АВ) в 26% исследуемых проб, инфекционного ринотрахеита (ИРТ) – в 50%, парагриппа-3 (ПГ-3) - в 83%, вирусной диареи (ВД) - в 87%, респираторно-синцитиальной болезни (РС) – в 60%, ротавирусной болезни (РВ) – в 83%, коронавирусной болезни (КВ) – в 84% исследуемых проб, рисунок 11.

*Рисунок 11.*

*Количество положительных проб сыворотки крови КРС к соответствующему вирусу в РН, в процентах от общего числа исследованных*

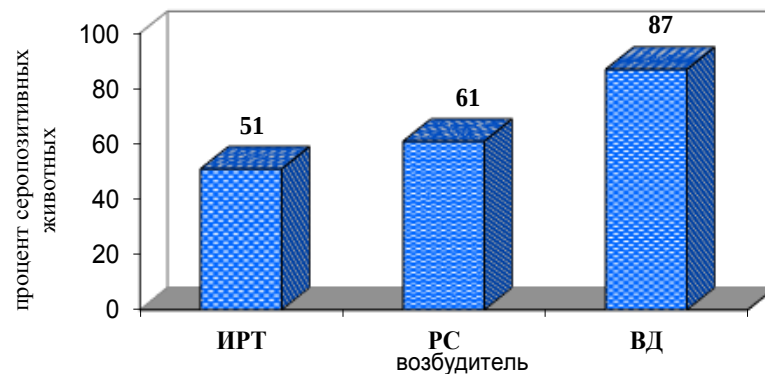


Кроме того, для выявления антител к возбудителям инфекционного ринотрахеита, респираторно-синцитиальной болезни и вирусной диареи

использовали соответствующие диагностические ИФА-наборы, полученные результаты представлены на рисунке 12.

**Рисунок 12.**

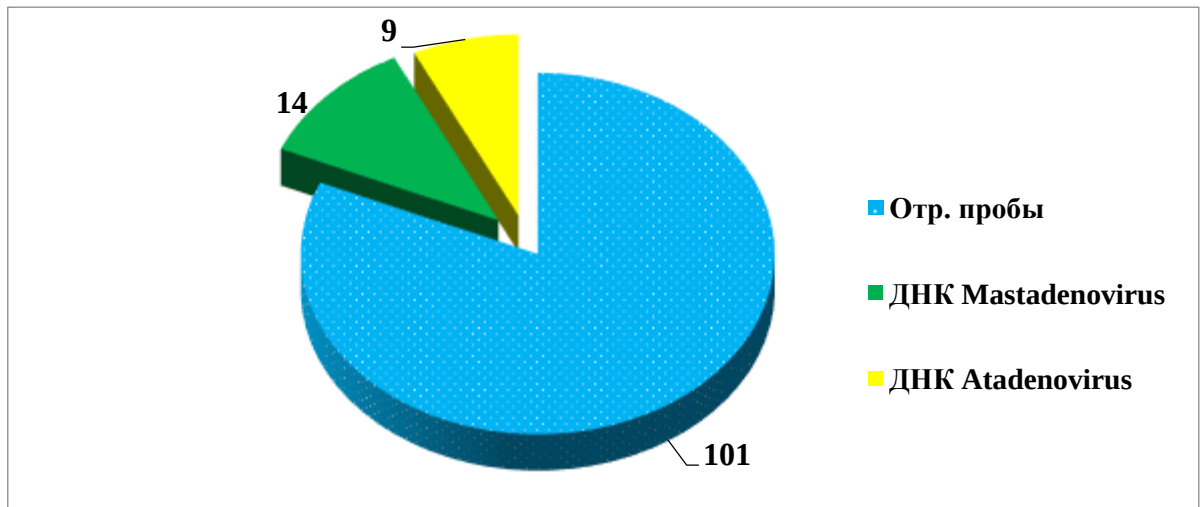
**Количество положительных проб сыворотки крови КРС к соответствующему вирусу в ИФА, в процентах от общего числа исследованных**



Количество положительных проб составило: к возбудителю инфекционного ринотрахеита – 51%, респираторно-синцитиальной болезни – 61%, вирусной диареи – 85% от общего количества исследованных проб.

При оценке распространенности аденовирусов КРС, циркулирующих на территории РФ были исследованы 124 полевые пробы (носовые и глазные смывы, полученные от телят с характерной клинической картиной, полученные из животноводческих хозяйств РФ) на обнаружение ДНК аденовируса, с использованием родоспецифической тест-системы ПЦР.

В результате проведенной работы ДНК аденовируса КРС из рода *Mastadenovirus* была обнаружена в 11,3 % исследованных проб, ДНК аденовируса КРС из рода *Atadenovirus* - в 7,2 % исследованных проб, рисунок 13.

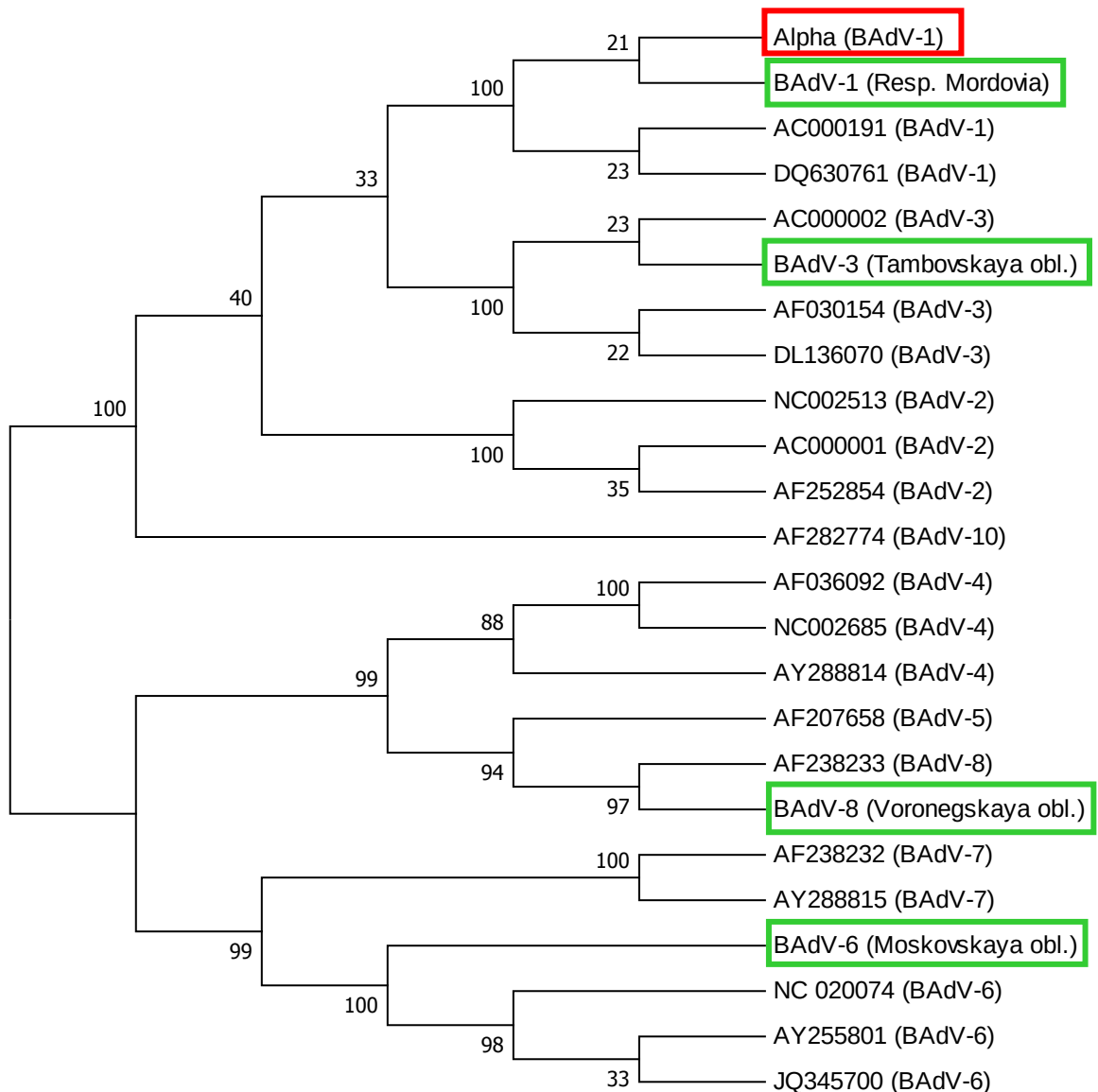
**Обнаружение ДНК аденовируса КРС в полевых пробах**

Для типирования изолятов аденовируса КРС часть проб, давших положительный результат, подвергли частичному геномному секвенированию на основе отдельных фрагментов ДНК, кодирующих гексон. Сравнительный анализ результатов секвенирования полученных ПЦР-ампликонов с нуклеотидными последовательностями разных типов аденовируса КРС, представленных в базе данных ресурса GenBank показал присутствие следующих типов аденовируса КРС среди положительных образцов: 1-го (республика Мордовия), 3-го (Тамбовская область), 6-го (Московская область), 8-го (Воронежская область), рисунок 14.

Результаты проведенных исследований свидетельствуют о широком распространении аденовируса крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах, при этом в подавляющем большинстве случаев он встречается в сочетании с другими вирусными возбудителями. Т.е. можно предположить, что аденовирус крупного рогатого скота играет существенную роль в этиологии основных вирусных заболеваний телят.

Рисунок 14.

**Филогенетический анализ изолятов аденовируса КРС разных типов на основе фрагмента генома (431 и 432 п.н.), кодирующего гексон, обнаруженных во время проведенных исследований**



На рисунке 14 - обнаруженные в ходе исследований подтипы аденовируса КРС выделены зеленой рамкой, выделенный ранее штамм аденовируса КРС *Alpha* выделен красной рамкой.

Полученные результаты согласуются с данными других ученых, показывающими широкое распространение вирусных инфекции, в т.ч. и аденовирусной, среди поголовья крупного рогатого скота [10, 16, 18, 35, 68, 74, 88, 139, 141].

Кроме того, при проведении серологических исследований, нами установлена корреляция результатов по выявлению антител к вирусам ИРТ, РС и ВД, полученных в реакции нейтрализации и методом ИФА.

**7. Разработка инактивированной комбинированной вакцины против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота-, коронавирусной болезней и аденовирусной инфекции крупного рогатого скота КОМБОВАК-А.**

**7.1. Оптимизация состава вакцины. Оценка ее безвредности и антигенных свойств.**

По результатам проведенных мониторинговых исследований нами было выявлено широкое распространение аденовирусной инфекции КРС, которая в большинстве случаев встречается в сочетании с другими вирусными заболеваниями. На основании этого, с учетом имеющихся литературных данных, мы пришли к заключению о целесообразности создания комбинированной (поливалентной) вакцины против основных респираторных и кишечных заболеваний телят, включающей в себя аденовирус крупного рогатого скота.

В качестве прототипа использовали инактивированную комбинированную вакцину «КОМБОВАК», производства ООО «Ветбиохим». Поскольку, по сравнению с прототипной, в новой вакцине увеличивается количество вирусных антигенов и, следовательно, снижается объемная доля каждого отдельного антигена, то для нее требуется более эффективный адъювант, способный обеспечить выраженный иммунный ответ на каждый антиген.

В ходе первоначально проведенных экспериментов были исследованы одиннадцать новых готовых адъювантов, а также экспериментальных продуктов:

- масляные адъюванты (ISA 50, ISA 61, ISA 70, ISA 71, ISA 206, ISA 773),
- 6% гель гидроокиси алюминия (ГОВА) с добавлением сапонины,
- ISCOM (комплексный адъювант, состоящий из липосом и сапонины),
- полисахаридные адъюванты грибного и растительного происхождения,
- высокомолекулярный синтетический полиэлектrolит (карбомер) со смесью поверхностно-активных гликозидов.

Оценку вели по следующим параметрам: антигенная активность (в опыте на лабораторной модели животных), безвредность и местная реактогенность, технологичность изготовления, вязкость конечного продукта (что в последствии

сказывается на таком факторе, как удобство применения вакцины), стабильность изготовленного препарата в процессе хранения, качество эмульсии (для эмульгированных образцов), таблица 10.

Для изучения влияния разных адъювантов на указанные параметры изготовили экспериментальные образцы трехкомпонентной вакцины со всеми перечисленными адъювантами, в качестве антигенной части использовали инаktivированные вирусы инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и аденовирус КРС, смешанные в равных пропорциях.

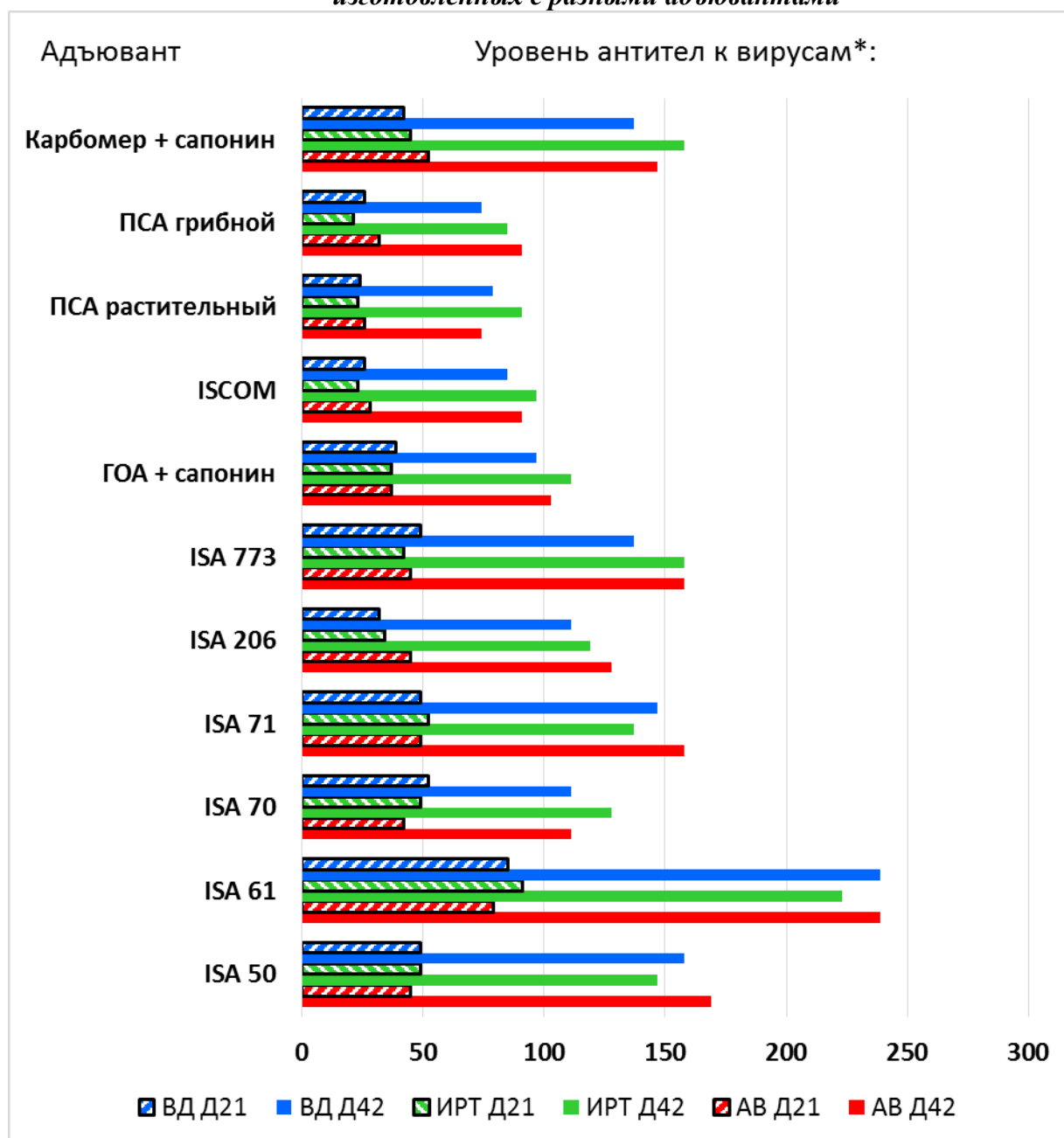
Антигенную активность, безвредность и местную реактогенность оценивали в опыте на морских свинках используя группы животных, сформированные по принципу аналогов  $n=10$  – для оценки антигенной активности и  $n=5$  – для оценки безвредности и местной реактогенности, на каждый экспериментальный образец вакцины.

Для оценки антигенной активности проводили двукратную вакцинацию с интервалом 21 сутки, внутримышечно в дозе 1 мл. Кровь брали у всех животных до и через 21 сутки после первой ( $D_{21}$ ) и второй вакцинаций ( $D_{42}$ ), рисунок 15, таблица 11.

Для оценки безвредности и местной реактогенности экспериментальные образцы вводили внутримышечно в дозе 2 мл (по 1 мл в разные тазовые конечности), за животными вели общее наблюдение в течение 14 суток, а также проводили пальпацию на месте введения препаратов, таблица 11.

Рисунок 15.

*Антигенная активность экспериментальных образцов вакцины, изготовленных с разными адъювантами*



\* приведены титры вируснейтрализующих антител у морских свинок после первой и второй вакцинаций, до вакцинации антител обнаружено не было.

Как видно из представленных результатов, все экспериментальные образцы вакцины вызвали формирование гуморального иммунного ответа у морских свинок, однако разные адъюванты оказывали не одинаковый иммуностимулирующий эффект. Наиболее антигенно-активными оказались образцы, изготовленные с адъювантами: ISA 61, ISA 50, ISA 773, ISA 71, ISA 206 и карбомер с добавлением сапонины ( $P < 0,03$ ). Полисахаридные адъюванты, а

также адъювант ISCOM оказались менее эффективными при внутримышечном введении.

Все животные, использованные в опыте по оценке безвредности и местной реактогенности, оставались живы и клинически здоровы. Эмульгированные образцы вакцины обладали более выраженной местной реактогенностью, что проявлялось в виде образования у отдельных животных ограниченной припухлости на месте введения вакцины, таблица 11.

Таблица 11.

*Результаты комплексной оценки экспериментальных образцов, изготовленных с разными адъювантами*

| № п/п | Адъювант           | Уровень антител к вирусу*              |                                         |                                        | Безвредность и реактогенность | Технологичность изготовления | Вязкость | Стабильность препарата | Качество эмульсии |
|-------|--------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------------------|-------------------------------|------------------------------|----------|------------------------|-------------------|
|       |                    | ВД<br>Д <sub>21</sub> /Д <sub>42</sub> | ИРТ<br>Д <sub>21</sub> /Д <sub>42</sub> | АВ<br>Д <sub>21</sub> /Д <sub>42</sub> |                               |                              |          |                        |                   |
| 1     | ISA 50             | 49/158                                 | 49/147                                  | 45/169                                 | ±**                           | ±                            | -        | +                      | +                 |
| 2     | ISA 61             | 85/239                                 | 91/223                                  | 79/239                                 | ±                             | ±                            | ±        | +                      | +                 |
| 3     | ISA 70             | 52/111                                 | 49/128                                  | 42/111                                 | ±                             | ±                            | -        | -                      | +                 |
| 4     | ISA 71             | 49/147                                 | 52/137                                  | 49/158                                 | ±                             | ±                            | -        | +                      | +                 |
| 5     | ISA 206            | 32/111                                 | 34/119                                  | 45/128                                 | ±                             | ±                            | ±        | ±                      | ±                 |
| 6     | ISA 773            | 49/137                                 | 42/158                                  | 45/158                                 | ±                             | ±                            | -        | ±                      | ±                 |
| 7     | ГОА + сапонин      | 40/97                                  | 37/111                                  | 37/104                                 | +                             | +                            | +        | +                      | ---               |
| 8     | ISCOM              | 26/85                                  | 23/97                                   | 28/91                                  | +                             | -                            | +        | ±                      | ---               |
| 9     | ПСА растительный   | 24/79                                  | 23/91                                   | 26/74                                  | +                             | +                            | +        | ±                      | ---               |
| 10    | ПСА грибной        | 26/74                                  | 21/85                                   | 32/91                                  | +                             | +                            | +        | -                      | ---               |
| 11    | Карбомер + сапонин | 42/137                                 | 45/158                                  | 52/147                                 | +                             | +                            | +        | +                      | ---               |

\* приведены титры вируснейтрализующих антител у морских свинок после первой и второй вакцинаций, до вакцинации антител обнаружено не было.

\*\* «+» - положительный (благоприятный) результат, «-» - отрицательный (неблагоприятный) результат, «---» - исследования не проводили, поскольку данные образцы не представляют собой эмульсию.



По результатам комплексной оценки хорошо себя зарекомендовали эмульгированные образцы вакцины, а также вариант вакцины, изготовленный на основе карбомера с добавлением сапонины, они отличались высокой антигенной активностью, безвредностью, приемлемой местной реактогенностью и вязкостью за исключением образцов, изготовленных с маслами ISA 50, ISA 70, ISA 206 и ISA 773.

При этом не все образцы положительно прошли испытание на стабильность, так при хранении наблюдали расслоение эмульсии (на масляную фазу – сверху и водную фазу - снизу) у образца, изготовленного с маслом ISA 70. Другие эмульгированные варианты вакцины оставались стабильны при всех методах испытаний, включая хранение в течение 18 месяцев (ориентировочный срок годности разрабатываемого вакцинного препарата) при температуре 2-8°C. В процессе длительного хранения у всех эмульгированных образцов отмечали незначительное (не более 10% от всего объема образца) отслоение эмульсии (появление прозрачной водной фазы над эмульсией), что является допустимым эффектом.

Значительные изменения внешнего вида и уровня pH наблюдали в процессе хранения у образца, изготовленного на основе полисахаридного адъюванта грибного происхождения.

Хорошо себя показал вариант вакцины на основе комплексного адъюванта (карбомера с добавлением сапонины), который помимо высокой антигенной активности, был безвредным, обладал низкой местной реактогенностью, вязкостью и сохранял свои физико-химические показатели в процессе длительного хранения.

Таким образом, по результатам проведенной работы, для дальнейших исследований были отобраны семь наиболее перспективных адъювантов: ISA 50, ISA 61, ISA 71, ISA 206, ISA 773, карбомер с добавлением сапонины и ГОА с добавлением сапонины (последний был выбран качестве контрольного).

Следующим этапом стало изготовление экспериментальных образцов комбинированной семикомпонентной вакцины против инфекционного

ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота-, коронавирусной болезней и аденовирусной инфекции крупного рогатого скота, для чего использовали соответствующее инаktivированные вирусы, полученные в перевиваемой культуре клеток и отобранные адъюванты. При отработке соотношения вирусных компонентов для антигенной части вакцины опирались на уже существующую вакцину «КОМБОВАК» с учетом появления дополнительного вирусного антигена.

Оценку изготовленных образцов семикомпонентной вакцины проводили по показателям безвредность и антигенная активность в опытах на лабораторных и естественно–восприимчивых животных.

Для этого каждым образцом экспериментальной вакцины иммунизировали морских свинок ( $n=10$ ) и коров до осеменения ( $n=30$ ), все группы были сформированы по принципу аналогов.

Морских свинок вакцинировали внутримышечно, в дозе 1,0 мл, однократно. Кровь брали до и через 21 сутки после вакцинации, таблица 12. За всеми животными вели наблюдение, отмечая общую и местную реакцию у всех животных, использованных в опыте.

Коров вакцинировали внутримышечно в дозе 3,0 мл двукратно с интервалом 21 сутки, первую вакцинацию делали за 1-2 месяца до осеменения. Кровь брали выборочно по 10 голов из каждой группы перед вакцинацией ( $D_0$ ) и через 21 сутки после первой ( $D_{21}$ ) и второй иммунизаций ( $D_{42}$ ), таблица 13. За всеми животными вели наблюдение, отмечая общую и местную реакцию у всех животных, использованных в опыте. А также проводили термометрию – два раза в сутки (утром и вечером).

Изучение безвредности показало, что все изготовленные образцы вакцины не вызывали заболевания или гибели подопытных животных, при этом у отдельных особей наблюдали образование плотных ограниченных припухлостей на месте введения образцов с масляными адъювантами. При проведении термометрии было зафиксировано повышение температуры тела на 0,5-1,0°C в течение первых двух суток после вакцинации у коров в разных группах. Общее

количество животных, отреагировавших на вакцинацию повышением температуры тела не превышало 10% от общего количества использованных в опыте.

В опытах на лабораторных и естественно-восприимчивых животных установлено, что введение экспериментальных образцов вакцины вызывало развитие выраженного иммунного ответа. При этом разные типы адъювантов оказывали неодинаковый иммуностимулирующий эффект на организм подопытных животных, что выразилось в различном уровне содержания специфических антител, синтезирующихся в процессе поствакцинального иммуногенеза ( $P < 0,02$ ), таблицы 12 и 13.

**Таблица 12.**

**Сравнительная оценка антигенной активности вакцины  
с разными адъювантами в опыте на лабораторных животных**

| № п/п | Адъювант           | Титр антител к вирусу* |     |     |      |    |     |     |
|-------|--------------------|------------------------|-----|-----|------|----|-----|-----|
|       |                    | АВ                     | ИРТ | ВД  | ПГ-3 | РС | РВ  | КВ  |
| 1     | ГОА+ сапонин       | 56                     | 34  | 64  | 119  | 23 | 52  | 69  |
| 2     | Карбомер + сапонин | 74                     | 49  | 97  | 137  | 26 | 104 | 60  |
| 3     | ISA 50             | 74                     | 37  | 128 | 256  | 28 | 147 | 181 |
| 4     | ISA 61             | 79                     | 60  | 104 | 194  | 32 | 111 | 137 |
| 5     | ISA 71             | 56                     | 37  | 74  | 274  | 34 | 137 | 128 |
| 6     | ISA 206            | 32                     | 34  | 69  | 91   | 28 | 42  | 97  |
| 7     | ISA 773            | 42                     | 42  | 111 | 119  | 37 | 111 | 128 |

\* приведены титры вируснейтрализующих антител у морских свинок после вакцинации, до вакцинации антител обнаружено не было.

Таблица 13.

**Сравнительная оценка антигенной активности вакцины  
с разными адъювантами в опыте на крупном рогатом скоте**

| №<br>п/п | Адъювант              | Срок<br>исслед. | Титр антител к вирусу |     |     |      |    |     |     |
|----------|-----------------------|-----------------|-----------------------|-----|-----|------|----|-----|-----|
|          |                       |                 | АВ                    | ИРТ | ВД  | ПГ-3 | РС | РВ  | КВ  |
| 1        | ГОВА +<br>сапонин     | Д <sub>0</sub>  | 0                     | 8   | 11  | 8    | 0  | 17  | 18  |
|          |                       | Д <sub>21</sub> | 42                    | 32  | 79  | 147  | 23 | 64  | 128 |
|          |                       | Д <sub>42</sub> | 74                    | 45  | 128 | 208  | 52 | 256 | 111 |
| 2        | Карбомер +<br>сапонин | Д <sub>0</sub>  | 0                     | 4   | 8   | 6    | 0  | 13  | 21  |
|          |                       | Д <sub>21</sub> | 45                    | 52  | 97  | 158  | 32 | 128 | 137 |
|          |                       | Д <sub>42</sub> | 84                    | 79  | 137 | 223  | 64 | 294 | 119 |
| 3        | ISA 50                | Д <sub>0</sub>  | 0                     | 3   | 10  | 11   | 0  | 23  | 32  |
|          |                       | Д <sub>21</sub> | 52                    | 147 | 104 | 239  | 39 | 416 | 294 |
|          |                       | Д <sub>42</sub> | 111                   | 119 | 194 | 416  | 84 | 388 | 223 |
| 4        | ISA61                 | Д <sub>0</sub>  | 0                     | 8   | 13  | 11   | 0  | 17  | 21  |
|          |                       | Д <sub>21</sub> | 64                    | 104 | 111 | 119  | 29 | 362 | 223 |
|          |                       | Д <sub>42</sub> | 119                   | 156 | 223 | 294  | 97 | 388 | 294 |
| 5        | ISA 71                | Д <sub>0</sub>  | 0                     | 7   | 9   | 11   | 0  | 18  | 16  |
|          |                       | Д <sub>21</sub> | 49                    | 97  | 128 | 446  | 39 | 446 | 362 |
|          |                       | Д <sub>42</sub> | 104                   | 64  | 239 | 362  | 79 | 338 | 239 |
| 6        | ISA 206               | Д <sub>0</sub>  | 0                     | 2   | 17  | 13   | 0  | 26  | 28  |
|          |                       | Д <sub>21</sub> | 26                    | 28  | 64  | 119  | 28 | 128 | 97  |
|          |                       | Д <sub>42</sub> | 52                    | 39  | 74  | 181  | 52 | 111 | 104 |
| 7        | ISA 773               | Д <sub>0</sub>  | 0                     | 8   | 13  | 16   | 0  | 20  | 26  |
|          |                       | Д <sub>21</sub> | 42                    | 79  | 119 | 239  | 28 | 148 | 147 |
|          |                       | Д <sub>42</sub> | 91                    | 56  | 223 | 294  | 74 | 170 | 111 |

Результаты, представленные в таблицах 12 и 13, свидетельствуют о том, что самой высокой антигенной активностью в опытах на лабораторных и естественно-восприимчивых животных обладали образцы вакцины, изготовленные на основе адъювантов ISA 50, ISA 61 и ISA 71 ( $P < 0,02$ ). Остальные экспериментальные образцы были менее эффективны.

На основе анализа полученных данных, а также ряда дополнительных показателей, полученных в ходе предыдущих исследований, в качестве адъюванта для изготовления вакцины был выбран масляный адъювант ISA 61.

Адъювант ISA 61 предназначен для изготовления прямых эмульсий типа вода в масле (к такому же типу эмульсий относится адъювант Фрейнда в обоих модификациях: полный и неполный). Характерными особенностями данного типа эмульсий является способность стимулировать напряженный и продолжительный гуморальный иммунный ответ. Однако, довольно часто такие эмульсии имеют и

негативные свойства, в частности повышенную местную реактогенность и вязкость. В нашем случае, за счет подбора оптимального соотношения масляной и водной (антигенной) фазы нам удалось добиться приемлемой вязкости, безвредности (включая местную реактогенность), сохранив высокие антигенные свойства готовой вакцины.

Кроме того, включение в состав вакцины данного адъюванта позволяет уменьшить объем необходимой водной фазы (антигенной части вакцины, состоящей из смеси инаktivированных вирусов) даже по сравнению с прототипной вакциной «КОМБОВАК», что в свою очередь сокращает технологические и экономические затраты на производство (поскольку стоимость антигенного вирусного сырья значительно превышает стоимость готового адъюванта ISA 61).

## **7.2. Подбор оптимальной иммунизирующей дозы вакцины для взрослых животных и телят.**

Для проведения испытаний была изготовлена экспериментальная серия вакцины с использованием адъюванта ISA 61.

Опыты по определению оптимальной иммунизирующей дозы вакцины показали, что введение препарата коровам в дозах 2,0, 3,0 и 4,0 мл, телятам – в дозах 1,0 и 2,0 мл вызывает у животных развитие выраженного гуморального иммунного ответа. При этом объем дозы препарата, вводимой животным, оказывал существенное влияние на уровень образования антител в процессе поствакцинального иммуногенеза, таблица 14.

Таблица 14.

**Определение оптимальной иммунизирующей дозы вакцины**

| Доза                  | Срок<br>исслед. | Титр антител к вирусу |     |      |     |     |     |     |
|-----------------------|-----------------|-----------------------|-----|------|-----|-----|-----|-----|
|                       |                 | ИРТ                   | ВД  | ПГ-3 | РС  | РВ  | КВ  | АВ  |
| коровы                |                 |                       |     |      |     |     |     |     |
| 2,0 мл                | Д <sub>0</sub>  | 3                     | 36  | 41   | 0   | 23  | 32  | 5   |
|                       | Д <sub>42</sub> | 75                    | 124 | 209  | 47  | 124 | 111 | 65  |
| 3,0 мл                | Д <sub>0</sub>  | 2                     | 42  | 28   | 0   | 26  | 28  | 6   |
|                       | Д <sub>42</sub> | 119                   | 239 | 416  | 96  | 388 | 239 | 109 |
| 4,0 мл                | Д <sub>0</sub>  | 6                     | 29  | 33   | 0   | 31  | 18  | 4   |
|                       | Д <sub>42</sub> | 100                   | 198 | 401  | 85  | 390 | 218 | 115 |
| Контрольная<br>группа | Д <sub>0</sub>  | 8                     | 13  | 16   | 0   | 20  | 26  | 5   |
|                       | Д <sub>42</sub> | 2                     | 17  | 13   | 0   | 26  | 28  | 8   |
| телята                |                 |                       |     |      |     |     |     |     |
| 1,0 мл                | Д <sub>0</sub>  | 8                     | 48  | 37   | 0   | 20  | 26  | 6   |
|                       | Д <sub>42</sub> | 128                   | 192 | 156  | 51  | 118 | 86  | 123 |
| 2,0 мл                | Д <sub>0</sub>  | 2                     | 56  | 32   | 0   | 26  | 28  | 5   |
|                       | Д <sub>42</sub> | 256                   | 321 | 304  | 120 | 224 | 119 | 217 |
| Контрольная<br>группа | Д <sub>0</sub>  | 4                     | 53  | 37   | 0   | 24  | 32  | 3   |
|                       | Д <sub>42</sub> | 16                    | 78  | 45   | 0   | 18  | 44  | 7   |

По результатам, приведенным в таблице 14, можно сделать выводы о том, что наиболее оптимальным объемом вакцины, вводимой коровам, является доза 3,0 мл. Введение вакцины в объеме 2,0 мл вызывало формирование менее напряженного гуморального иммунного ответа, в то время как увеличение объема вводимой вакцины до 4,0 мл не вызывало достоверного увеличения уровня поствакцинальных вируснейтрализующих антител у вакцинированных животных ( $P < 0,03$ ). Увеличение дозы вакцины, вводимой телятам, в два раза привело к повышению уровня синтезируемых антител ко всем вирусным компонентам в среднем в 1,83 раза ( $P < 0,02$ ).

Таким образом, на основании проведенных исследований было установлено, что оптимальная иммунизирующая доза вакцины для коров составляет 3,0 мл, для телят - 2,0 мл.

### 7.3. Оценка колострального иммунитета и эффективности вакцины.

Поскольку большинство из входящих в состав разработанной семикомпонентной вакцины вирусов патогенны не только для взрослых коров и телят 2-3 месячного возраста (возраст с которого в большинстве хозяйств

начинается вакцинация молодняка) и старше, но и для новорожденных телят и телят в первые месяцы жизни, то одним из ключевых свойств вакцины должна является способность формировать колостральный иммунитет.

Другим ключевым свойством любого вакцинного препарата является эффективность его применения. Для вакцины, предназначенной для профилактики указанных вирусных заболеваний, наиболее удобными критериями оценки эффективности являются эпизоотологические и хозяйственные показатели: заболеваемость телят респираторными и кишечными инфекциями, смертность телят, а также их вынужденная выбраковка в опытной и контрольной группах

Изучение влияния разработанной инактивированной вакцины против аденовирусной инфекции, инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота- и коронавирусной болезней крупного рогатого скота на формирование колострального иммунитета и оценку ее эффективности проводили в производственных условиях животноводческого хозяйства, неблагополучного по респираторным и кишечным инфекционным заболеваниям телят, в том числе где были выявлены вируснейтрализующие антитела к аденовирусу КРС.

Для этого была изготовлена экспериментальная серия вакцины, которая перед отправкой в хозяйство прошла лабораторные испытания по показателям: стерильность, безвредность и антигенная активность.

В хозяйстве всего было вакцинировано 352 стельные коровы и 347 телят, полученных от вакцинированных животных. В качестве контроля использовали невакцинированных стельных коров ( $n=93$ ) и телят ( $n=87$ ), которых содержали в другом помещении. В каждой группе (вакцинированной и контрольной) были выбраны по 10 голов животных у которых брали кровь до вакцинации ( $D_0$ ), через 14-21 сутки (I) после первой вакцинации (во время проведения второй вакцинации) и сразу после отела (II). У контрольных невакцинированных животных брали пробы крови примерно в тоже время, что и у вакцинированных. Также брали кровь у телят, полученных от выбранных коров в обеих группах, в

первые 24-48 часов, при этом обязательно отслеживали своевременную выпойку молозива всем телятам, использованным в опыте. Полученные результаты представлены в таблице 15.

Таблица 15.

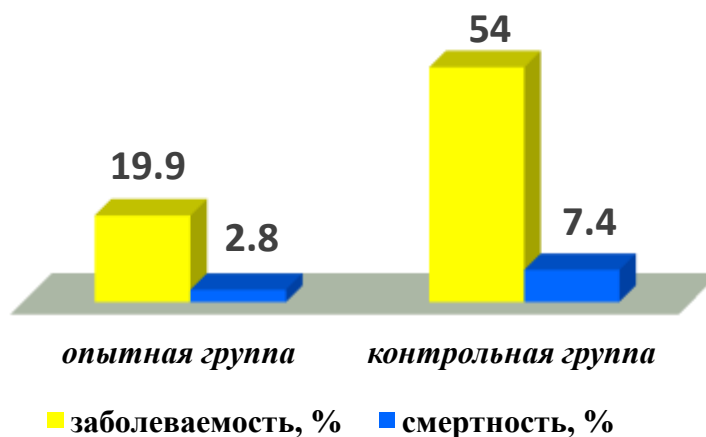
*Результаты оценки колострального иммунитета*

| №<br>п/п | Группа<br>животных               | Срок<br>исслед. | Титр антител к вирусу |     |     |      |    |     |     |
|----------|----------------------------------|-----------------|-----------------------|-----|-----|------|----|-----|-----|
|          |                                  |                 | АВ                    | ИРТ | ВД  | ПГ-3 | РС | РВ  | КВ  |
| 1        | Вакцини-<br>рованные<br>коровы   | Д <sub>0</sub>  | 11                    | 9   | 30  | 8    | 0  | 13  | 17  |
|          |                                  | I               | 56                    | 97  | 181 | 119  | 42 | 169 | 208 |
|          |                                  | II              | 137                   | 194 | 223 | 181  | 97 | 239 | 256 |
|          | телята                           | ---             | 69                    | 104 | 128 | 97   | 45 | 137 | 119 |
| 2        | Невакцини-<br>рованные<br>коровы | Д <sub>0</sub>  | 9                     | 8   | 24  | 11   | 0  | 12  | 20  |
|          |                                  | I               | 15                    | 15  | 16  | 30   | 0  | 11  | 21  |
|          |                                  | II              | 12                    | 15  | 39  | 56   | 0  | 15  | 16  |
|          | телята                           | ---             | 6                     | 7   | 9   | 15   | 0  | 8   | 6   |

Представленные данные свидетельствуют о том, что двукратная вакцинация стельных коров вызывает образование специфических антител к соответствующим возбудителям в высоких титрах, которые затем с молозивом передаются телятам, тем самым обеспечивая формирование выраженного колострального иммунитета. В то время как невакцинированные животные не смогли обеспечить формирование колострального иммунитета у потомства на приемлемом уровне ( $P < 0,01$ ).

В ходе проведения испытаний по оценке эффективности применения вакцины в производственных условиях были получены следующие результаты. В опытной группе заболеваемость телят составила 19,9%, смертность и вынужденная выбраковка 2,8%, в то время как в контрольной группе данные показатели составили 54,0% и 7,4% соответственно, рисунок 16.



**Эффективность применения вакцины в хозяйстве**

Таким образом, в результате проведенных в производственных условиях исследований, была показана способность вакцины вызывать напряженный колостральный иммунитет у телят, а также практическая эффективность разработанного препарата против основных вирусных респираторных и кишечных инфекций крупного рогатого скота.

#### **7.4. Оценка стабильности физических и иммунобиологических свойств вакцины в процессе хранения (в течение срока годности).**

Одним из обязательных этапов разработки любого вакцинного препарата (требование к регистрационному досье, при регистрации в РФ, ФЗ N61 от 12.04.2010 "Об обращении лекарственных средств") является оценка стабильности его физических и иммунобиологических свойств в процессе длительного хранения на основании которого и устанавливается срок годности препарата.

Для оценки стабильности физических и иммунобиологических свойств вакцины инактивированной комбинированной против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота-, коронавирусной болезней и аденовирусной инфекции крупного рогатого были изготовлены три экспериментальные серии препарата. После проведения испытаний каждая серия была заложена в архив (по 10 флаконов объемом 100 мл) для изучения стабильности внешнего вида и антигенных свойств вакцины в процессе хранения. Данные исследования проводили через 12, 18 и 24 месяца хранения вакцины при температуре 2-8°C.

Стабильность вакцины в процессе хранения определяли путем визуального изучения внешнего вида хранящихся образцов. Структура и внешний вид образцов вакцины в процессе хранения оставались без существенных изменений, при этом наблюдалось незначительное отслоение эмульсии (не более 10% от общего объема образца), при легком встряхивании эмульсия принимала однородный гомогенный вид.

Антигенную активность оценивали в опытах на морских свинках. Каждой серией препарата по истечению определенного срока хранения вакцинировали группу животных ( $n=5$ ), сформированную по принципу аналогов. Вакцинацию проводили однократно внутримышечно в дозе 1,0 мл. Взятие крови осуществляли до и через 21 сутки после вакцинации. Контролем в каждом опыте служили 3 невакцинированных животных. Уровень специфических вируснейтрализующих антител определяли в реакции нейтрализации, таблица 16.

**Таблица 16.**

**Сравнительный анализ антигенной активности экспериментальных серий вакцины при изготовлении, через 12, 18 и 24 месяца хранения**

| Серия №                   | Срок хранения | Уровень антител после вакцинации к вирусам: |     |     |      |    |     |     |
|---------------------------|---------------|---------------------------------------------|-----|-----|------|----|-----|-----|
|                           |               | АВ                                          | ИРТ | ВД  | ПГ-3 | РС | РВ  | КВ  |
| Экспериментальная серия 1 | 0 мес         | 84                                          | 74  | 128 | 147  | 28 | 97  | 111 |
|                           | 12 мес        | 74                                          | 84  | 97  | 111  | 24 | 111 | 128 |
|                           | 18 мес        | 84                                          | 84  | 111 | 128  | 32 | 111 | 97  |
|                           | 24 мес        | 74                                          | 64  | 111 | 111  | 24 | 97  | 97  |
| Экспериментальная серия 2 | 0 мес         | 56                                          | 97  | 111 | 128  | 32 | 128 | 84  |
|                           | 12 мес        | 64                                          | 84  | 128 | 97   | 24 | 97  | 97  |
|                           | 18 мес        | 64                                          | 84  | 111 | 128  | 28 | 111 | 97  |
|                           | 24 мес        | 49                                          | 84  | 97  | 111  | 24 | 111 | 84  |
| Экспериментальная серия 3 | 0 мес         | 97                                          | 111 | 111 | 128  | 24 | 111 | 128 |
|                           | 12 мес        | 84                                          | 128 | 147 | 111  | 21 | 128 | 97  |
|                           | 18 мес        | 84                                          | 97  | 97  | 128  | 24 | 97  | 111 |
|                           | 24 мес        | 74                                          | 84  | 97  | 111  | 24 | 97  | 97  |
| Контрольная группа        | 0 мес         | 0                                           | 0   | 0   | 0    | 0  | 0   | 0   |
|                           | 12 мес        | 0                                           | 0   | 0   | 0    | 0  | 0   | 0   |
|                           | 18 мес        | 0                                           | 0   | 0   | 0    | 0  | 0   | 0   |
|                           | 24 мес        | 0                                           | 0   | 0   | 0    | 0  | 0   | 0   |

Как видно из результатов, представленных в таблице 16, хранение вакцины при температуре 2-8°C в течение 24 месяцев не ведет к существенному снижению антигенных свойств вирусных компонентов, входящих в ее состав ( $P<0,02$ ).

На основании проведенных исследований по изучению стабильности физических и иммунобиологических свойств разработанной вакцины в процессе длительного хранения был установлен гарантированный срок годности препарата в течение 18 месяцев при соблюдении температурного режима транспортировки и хранения 2-8°C.

Таким образом, в ходе проведенной работы, был разработан новый семикомпонентный препарат – вакцина инактивированная комбинированная против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота-, коронавирусной болезней и аденовирусной инфекции крупного рогатого скота, получивший коммерческое название КОМБОВАК-А (приложение №2). Данная вакцина успешно прошла первичные регистрационные испытания в ФГБУ «ВГНКИ» и разрешена для применения на территории РФ. Через 5 лет после первичной регистрации, согласно законодательству, вакцина КОМБОВАК-А успешно прошла обязательную повторную регистрацию в ФГБУ «ВГНКИ», получив бессрочное регистрационное удостоверение.

Одним из обязательных условий (до ноября 2019 года) нахождения вакцинного препарата на рынке РФ (помимо регистрации) является обязательная регулярная сертификация этого препарата в аккредитованном испытательном центре (в настоящее время в РФ таким единственным центром является ФГБУ «ВГНКИ»). Вакцина КОМБОВАК-А регулярно проходила сертификационные испытания, и имеет действующий сертификат соответствия.

С момента начала коммерческого производства по настоящий момент (07.2020) всего было реализовано более 4 миллионов коммерческих доз вакцины. За все время нахождения вакцины КОМБОВАК-А в гражданском обороте на нее не поступало рекламаций или негативных отзывов, что с учетом объемов ее реализации, свидетельствует о высоком качестве и эффективности разработанного препарата.

## 8. Обсуждение.

Аденовирусная инфекция крупного рогатого скота является одной из актуальных инфекционных болезней, причиняющих значительный экономический ущерб животноводству. Преимущественно болеют телята в первые 2-3 недели жизни, реже в возрасте до 4 месяцев. Взрослые животные обычно переносят заболевание бессимптомно, при этом они могут выступать в качестве источников возбудителя, переболевая в латентной форме. Болезнь сопровождается поражением органов дыхания, пищеварения, лимфоидной ткани и слизистой оболочки глаз [9, 38].

Аденовирусная инфекция крупного рогатого скота, как правило, встречается в составе смешанной инфекции с другими вирусными (вирусом вирусной диареи, инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, респираторно-синцитиальным вирусом, рота- и коронавирусами КРС) и/или бактериальными (пастереллы, эшерихии, манheimии) возбудителями, также может осложняться микоплазменной инфекцией. При этом до конца не изучена роль аденовируса в развитии респираторных и/или кишечных заболеваний телят, поскольку он может выступать как в качестве возбудителя первичной инфекции, так и в качестве инфекционного агента, вызывающего развитие вторичной вирусной инфекции на фоне воздействия других вирусов [33, 57, 84, 123].

На текущий момент было выделено 11 разных типов аденовируса КРС (*Bovine adenovirus*, BAdV), относящихся к двум родам *Mastadenovirus* (BAdV-1, -2, -3, -9 и -10) и *Atadenovirus* (BAdV-4, -5, -6, -7, -8 и -Rus). Согласно решению международного комитета по таксономии вирусов (ICTV), принятого в 2013 году, были введены следующие виды аденовируса КРС: *Bovine mastadenovirus A* (включает тип BAdV-1), *Bovine mastadenovirus B* (BAdV-3), *Bovine mastadenovirus C* (BAdV-10) и *Bovine atadenovirus D* (BAdV-4, -5, -8, - Rus). Типы BAdV-2 и BAdV-9 были включены в виды, в которые входят аденовирусы с другим преобладающим хозяином, в частности они вошли в виды *Ovine mastadenovirus A* и *Human mastadenovirus C* соответственно. В 2015 году было предложено классифицировать еще два вида аденовируса КРС - *Bovine atadenovirus E*

(который бы включал BAdV-6) и *Bovine atadenovirus F* (который бы включал BAdV-7), но данное предложение международным комитетом по таксономии вирусов пока не утверждено, при этом в международной базе данных GenBank уже имеется полногеномный сиквенс аденовируса КРС шестого типа (BAdV-6), выделенного английскими исследователями [88, 93, 94, 109].

Аденовирус КРС впервые был выделен в 1959 г в США, относится к семейству *Adenoviridae* [24, 39]. Вирион аденовируса КРС состоит из сердцевин и икосаэдрического капсида, который построен из 240 гексонов и 12 пептонов. Каждый пептон, располагается на вершине икосаэдра и состоит из основания и фибриллы, рисунок 1. Основные антигенные детерминанты аденовируса КРС находятся в гексоне и пентоне, включая фибриллы. Двуспиральная молекула ДНК аденовируса располагается в сердцевине вириона [23, 24, 117].

Проникая в клетку, аденовирус перемещается непосредственно к ее ядру, где происходит «раздевание» капсида, и вирусная ДНК проникает в ядро. Она редко интегрируется в хромосомы клетки хозяина, чаще присутствуя в виде эписомы. Находясь в ядре, ДНК аденовируса запускает синтез вирусных мРНК, ингибируя синтез собственных клеточных нуклеиновых кислот. Сборка новых вирионов аденовируса осуществляется непосредственно в ядре клетки [24, 65, 111], рисунок 3.

Аденовирус КРС весьма устойчив во внешней среде и к воздействию различных физико-химических факторов [4, 9].

Инкубационный период аденовирусной инфекции КРС составляет от 4 до 7 суток. Заболевание, в зависимости от формы, проявляется повышением температуры тела, воспалением легких, конъюнктивитом, энтеритом, пневмоэнтеритом. У животных отмечают кашель, слабость, затрудненное дыхание, диарею [4, 38].

Диагностика аденовирусной инфекции КРС осложняется двумя факторами:

- отсутствием доступных легко воспроизводимых современных методов выявления специфических антител и/или возбудителя болезни;

- большой схожестью клинико-эпизоотологических признаков и патологоанатомических изменений с другими вирусными и бактериальными заболеваниями [4, 74].

Поскольку аденовирусная инфекция чаще всего протекает в виде смешанного комплекса с другими респираторными и/или желудочно-кишечными заболеваниями вирусной этиологии, то для профилактики подобных смешанных инфекций обосновано и экономически целесообразно использование поливалентных вакцинных препаратов, содержащих антигены сразу нескольких возбудителей.

К сожалению, не смотря на огромную работу, направленную на улучшение диагностики [5, 7, 23] и разработку средств специфической профилактики [3, 6, 8, 11, 15, 38], на момент начала наших исследований в РФ отсутствовали зарегистрированные и разрешенные к применению средства специфической профилактики аденовирусной инфекции КРС.

Однако, специфическая иммунопрофилактика, является одним из наиболее эффективных и дешевых способов сохранения здоровья, а, следовательно, и продуктивности животных [32, 37, 72].

Вакцинопрофилактика базируется на механизме иммунологической памяти – способности организма на более быстрое и эффективное развитие иммунного ответа на повторное проникновение возбудителя (антигена). При этом возрастает длительность и напряженность специфического иммунного ответа; ускоряется переход на синтез более специфических IgG и IgA; возрастает аффинность синтезируемых антител; увеличивается экспрессия молекул главного комплекса гистосовместимости II-го класса на поверхности В-лимфоцитов [27, 28, 44, 130].

На сегодняшний момент, самым массовым типом вакцин, применяемым в животноводстве, являются – инаktivированные вакцинные препараты. Они готовятся, как правило, из вирулентных инаktivированных штаммов соответствующих возбудителей, составляющих антигенную часть препарата. Второй необходимый компонент инаktivированных вакцин – адъювант, который

значительно усиливает и пролонгирует иммунный ответ, провоцируемый вакцинным антигеном [19, 25].

За более чем 100-летнюю историю использования адьювантов, наука значительно продвинулась в понимании механизмов их работы. Однако, пока не удалось создать идеально-универсальный адьювант, способный одинаково эффективно и безопасно образовывать вакцинный комплекс со всеми типами и видами антигенов.

Первоначально мы обратили внимание на тот факт, что в некоторых животноводческих хозяйствах, где применялись комбинированные поливалентные вакцины против основных вирусных респираторных и кишечных заболеваний телят, остаются проблемы, связанные с поражением органов дыхания и слизистых оболочек у телят.

Проведя исследования 174 полевых проб (смывов с конъюнктивы глаза и из носовой полости), полученных от телят с характерной клинической картиной острых респираторных заболеваний, нам путем проведения слепых пассажей в перевиваемой культуре клеток почки телят - Т1 удалось выделить аденовирус КРС, который был охарактеризован в реакции нейтрализации со специфическими референтными антисыворотками и методом ПЦР. Для проведения последней мы использовали праймеры к фрагменту ДНК аденовируса КРС, кодирующего гексон, взятые нами из научной статьи, которые в свою очередь, были разработаны для оценки загрязнения окружающей среды фекалиями и сточными водами, содержащими возбудителя аденовирусной инфекции КРС [113].

В дальнейшем, методом секвенирования фрагмента генома выделенного вируса по Сэнгеру, с последующим сравнительным анализом расшифрованной последовательности нуклеотидов участка ДНК, кодирующего гексон, с нуклеотидными последовательностями разных типов аденовируса КРС, представленных в базе данных ресурса GenBank был определен тип выделенного аденовируса КРС. Филогенетический анализ показал 99% сходство (на исследуемом участке) выделенного нами штамма аденовируса КРС с аденовирусом КРС I-го типа, представленного в базе данных ресурса GenBank.

В последующем мы провели работу по изучению биологических, в том числе антигенных свойств выделенного штамма аденовируса КРС, оптимизации технологии его получения в промышленных масштабах, а также отработали методы его инаktivации.

Выделенный штамм был адаптирован к перевиваемой культуре клеток почки телят (MDBK). Экспериментальным путем нами было установлено, что оптимальная заражающая доза аденовируса для этой культуры клеток составляет 1 мл –  $10^{6,0}$  ТЦД<sub>50</sub>/мл (на матрас с 48 часовой культурой, площадью 75 см<sup>2</sup>), что примерно соответствует 1,5 ТЦД<sub>50</sub> на одну клетку. Также опытным путем установили, что максимальное накопление вируса в суспензии происходит в течение 120±4 часов культивирования.

Кроме того, по результатам сравнительных испытаний, было установлено, что применение метода заражения культуры клеток MDBK с проведением «контакта» заражающей вируссодержащей суспензии в течение 1 часа (без внесения поддерживающей питательной среды в условиях термостата при температуре 37±1°C) позволяет получать вирус с активностью на 0,5-0,77 lg выше, чем при быстром внесении поддерживающей питательной среды.

Применение роллерного метода культивирования вируса позволяет еще повысить инфекционную активность вируса, по сравнению с культивированием в матрасах [83]. В итоге нам удалось получить вируссодержащую суспензию с инфекционной активностью 7,23-7,50 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл.

Выделенный штамм не гемагглютинирует и не гемадсорбирует эритроциты свиньи, кролика, белой мыши, морской свинки, петуха, барана.

В ходе проведенных опытов по изучению антигенных свойств на лабораторной модели животных, была показана высокая антигенная активность выделенного штамма. Так изготовленные экспериментальные варианты моновакцины, содержащей аденовирус КРС, вызывали достоверную сероконверсию в реакции нейтрализации у вакцинированных морских свинок. Ожидается, образцы, изготовленные с использованием неполного адъюванта



Фрейнда обладали более выраженной антигенной активностью (в полтора-два раза) по сравнению с образцами на основе ГОА, таблица 5.

Высокая антигенная активность различных штаммов аденовируса КРС была показана многими учеными, которые их использовали при конструировании экспериментальных вакцин. В опыте на лабораторных и естественно-восприимчивых животных было установлено, что введение экспериментальных образцов ассоциированных вакцин сопровождалось выраженной сероконверсией в отношении аденовирусного компонента [3, 15, 69].

Выделенный штамм аденовируса КРС I-го типа (относящейся к роду *Mastadenovirus*), получил название «Альфа» и был депонирован в Государственную коллекцию вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, номер депонента ГКВ №2732.

При выборе инактивирующего агента мы провели сравнительные испытания следующих реагентов: димерэтиленимина,  $\beta$ -пропиолактон и формалина, содержащего 37% формальдегида. В ходе работы мы пробовали разные концентрации каждого агента и разное время экспозиции.

Проведенные исследования показали, что для гарантированной инактивации аденовируса КРС подходят следующие варианты и режимы:

- формалин в концентрации 0,3 % при времени экспозиции 72 часа;
- димерэтиленимина в концентрации 0,2 % при времени экспозиции 24 часа;
- $\beta$ -пропиолактон в концентрации 0,3 % при времени экспозиции 48 часа.

Сопоставив полученные результаты и приняв во внимание ряд других факторов (таких как удобство в работе, использование конкретных реагентов для инактивации других вирусов) для дальнейшей работы в качестве инактивирующего агента мы выбрали формалин, содержащий 37% формальдегида.

Одним из этапов дальнейшей работы стала разработка диагностической тест-системы, предназначенной для идентификации аденовируса КРС. Мы выбрали полимеразную цепную реакцию, как один из наиболее перспективных

методов обнаружения и идентификации ДНК возбудителей [54, 63]. Сложность при разработке тест-системы ПЦР заключалась в том, что на данный момент классифицировано одиннадцать типов аденовируса КРС, относящихся к двум разным родам *Mastadenovirus* и *Atadenovirus*. Поэтому не смотря на достаточно большую консервативность участка ДНК, кодирующего гексон аденовируса КРС, внутри каждого типа встречаются определенные различия в последовательности нуклеотидов.

Проведя предварительные эксперименты с разными праймерами и режимами реакции, мы остановились на гнездовом варианте ПЦР. В качестве первых (внешних) праймеров мы использовали пару BALF и BARF [113], которые мы использовали при идентификации выделенного нами аденовируса КРС. Данная пара праймеров является общей для обоих родов аденовируса КРС. Для проведения второго раунда ПЦР мы разработали индивидуальные внутренние пары праймеров: Mast-F и Mast-R для рода *Mastadenovirus*; At-F и At-R для рода *Atadenovirus*, таблица 7. Внутренние пары праймеров кодируют фрагмент ДНК, располагающийся в пределах внешних праймеров BALF и BARF. Размеры фрагментов ДНК аденовируса КРС, кодируемые внутренними парами праймеров Mast-F, Mast-R и At-F, At-R имеют схожие размеры – 431 и 432 пары нуклеотидов соответственно.

Испанские ученые, разработавшие внешнюю пару BALF и BARF, для своих исследований использовали вторую внутреннюю пару праймеров BALN и BARN, общую для обоих родов аденовируса КРС [113]. Однако, внутренняя пара праймеров является весьма вырожденной, что создает повышенные риски неспецифической реакции. Поэтому мы посчитали более целесообразным разработать индивидуальные внутренние пары праймеров для каждого из родов *Mastadenovirus* и *Atadenovirus*.

С похожими проблемами столкнулись шведские исследователи, которые разработали тест-систему ПЦР в реальном времени для обнаружения ДНК аденовируса КРС. Конструируя праймеры и зонд, общие для *Mastadenovirus* и *Atadenovirus*, они обнаружили, что чувствительность такой системы сильно

варьирует, в зависимости от типа обнаруживаемого аденовируса КРС. Наибольшие трудности возникли с чувствительностью тест-системы в отношении 2 типа аденовируса КРС [114].

Оптимизацию условий проведения реакции, а также оценку чувствительности проводили с использованием сконструированных нами рекомбинантных плазмид pGEM-*Mast* и pGEM-*At*, на основе векторной системы клонирования продуктов ПЦР pGEM T-Easy. Матрицей фрагментов ДНК служили культуральный аденовирус BAdV-1 и полевая положительная проба (которая была предварительно охарактеризована методом секвенирования, как аденовирус КРС BAdV-8) для родов *Mastadenovirus* и *Atadenovirus* соответственно.

Подобрав оптимальные условия проведения полимеразной цепной реакции, мы провели оценку ее чувствительности, используя панель последовательных десятикратных разведений плазмид pGEM-*Mast* и pGEM-*At*, при этом изначально мы определили молекулярную концентрацию каждой плазмиды на спектрофотометре. Чувствительность разработанной тест-системы составила  $5,4 \times 10^3$  мол/мкл для рода *Mastadenovirus* и  $4,3 \times 10^3$  мол/мкл для рода *Atadenovirus*. Полученная чувствительность по каждому роду аденовируса КРС является достаточной для обнаружения ДНК этого возбудителя в исследуемом материале.

Оценку специфичности разработанной тест-системы проверяли, с использованием панели образцов, содержащей наиболее часто встречающихся вирусных (ВД, ИРТ, ПГ-3, РС, рота- и коронавирусов КРС) и бактериальных (*P. multocida* типы А, В, D; *M. Haemolytica*; *E.coli* серогруппы O101 и O141) возбудителей, вызывающих заболевания со сходной клинической картиной. Кроме того, исследовали носовые смывы, полученные от клинически здоровой коровы и незараженные культуры клеток T1 и MDBK. В качестве положительного контроля использовали пробы, содержащие ДНК аденовируса BAdV-1 и BAdV-8, таблица 9.

Результаты оценки специфичности показали отсутствие ложноположительной реакции с другими источниками ДНК, не принадлежащей аденовирусам КРС.

Разработанную тест-систему использовали при проведении мониторинга эпизоотической ситуации для выявления ДНК аденовируса КРС в пробах материала, полученных от телят с характерной клинической картиной респираторного комплекса заболеваний. По результатам исследования 124 проб (носовые и глазные смывы) ДНК аденовируса КРС из рода *Mastadenovirus* была обнаружена в 11,3 %, ДНК аденовируса КРС из рода *Atadenovirus* - в 7,2 % исследованных проб.

В дальнейшем, порядка 20% проб, положительных на ДНК аденовируса КРС, мы исследовали методом геномного секвенирования с последующим сравнительным анализом полученных результатов с ДНК разных типов аденовируса КРС, представленных в GenBank. В итоге мы обнаружили в положительных полевых пробах присутствие следующих типов аденовируса КРС: 1-го (республика Мордовия); 3-го (Тамбовская область); 6-го (Московская область); 8-го (Воронежская область). Т.е. можно утверждать, что на территории Российской Федерации циркулируют как минимум четыре типа аденовируса КРС.

В научной литературе описаны многократные случаи заболевания и гибели телят, причиной которых стала аденовирусная инфекция [2, 9, 22, 38, 53, 58, 62, 68, 82, 88].

Так, по данным английских ученых, причиной вспышки респираторной инфекции на одной из ферм Англии стал аденовирус КРС 6 типа, который удалось выделить из тканей кишечника павшего теленка на культуре клеток тестикул бычка. В последующем методами ПЦР и геномного секвенирования удалось его типировать [88].

Американские ученые отмечали широкое распространение аденовируса КРС 3 типа у телят с заболеванием дыхательных путей (штат Айова). Вируснейтрализующие антитела к аденовирусу КРС 3 типа были выявлены у 19,1% обследованных животных в стадах, где были отмечены вспышки респираторных заболеваний телят [108].

В целях серологического мониторинга распространенности основных вирусных заболеваний телят, мы исследовали пробы сыворотки крови,

полученные от невакцинированных коров и телят из 15 животноводческих хозяйств, Вологодской, Воронежской, Калужской, Московской, Тамбовской областей, Алтайского и Краснодарского краев, Республики Башкортостан. Проведя исследования 1255 проб сыворотки крови, мы обнаружили наличие антител к возбудителям: аденовирусной инфекции в 26% исследуемых проб, инфекционного ринотрахеита – в 50%, парагриппа-3 - в 83%, вирусной диареи - в 87%, респираторно-синцитиальной болезни - в 60%, ротавирусной болезни - в 83%, коронавирусной болезни - в 84% исследуемых проб, рисунок 11.

Полученные результаты серологического обследования коррелируют с результатами многочисленных подобных исследований, проведенных другими учеными ранее [10, 11, 23, 33, 35, 41] и подтверждают широкое распространение указанных возбудителей на территории Российской Федерации. По данным ученых из Красноярского государственного аграрного университета при обследовании невакцинированных животных в период с 2012 по 2017 года на наличие антител к вирусам ИРТ, ВД, РС, ПГ-3 и аденовирусу КРС были выявлены сероположительные животные в разные годы от 30-50 до 100% от числа обследованных [37].

Проведя анализ рынка ветеринарных препаратов в РФ, мы не нашли зарегистрированных вакцинных препаратов, предназначенных для специфической профилактики аденовирусной инфекции КРС. Несмотря на то, что имеются литературные данные о создании подобных вакцин [3, 11, 15, 69] до выхода на рынок они не были доведены. Поэтому мы посчитали целесообразным разработку вакцины против аденовирусной инфекции крупного рогатого скота и внедрение ее в производственную практику.

Анализ результатов серологического мониторинга и обширные литературные данные свидетельствуют о том, что вирусные респираторные и кишечные заболевания КРС в большинстве случаев встречаются в виде смешанных полиинфекций с разным набором возбудителей. В зарубежной литературе существует такое понятие как BRDC (Bovine Respiratory Disease

Complex) – комплекс респираторных заболеваний КРС [12, 46, 47, 72, 79, 81, 129, 135].

Общепринятой практикой является использование для профилактики таких смешанных инфекций поливалентных комбинированных вакцин, содержащих максимально возможное количество актуальных антигенов [32]. Поэтому мы приняли решение разработать семикомпонентную вакцину против основных вирусных респираторных и кишечных заболеваний телят, включая аденовирусную инфекцию КРС. За основу мы взяли уже существующую и хорошо себя зарекомендовавшую шестикомпонентную вакцину «КОМБОВАК», разработанную авторским коллективом НПО «НАРВАК» во главе с профессорами Сергеевым В.А. и Алипером Т.И.

Однако, увеличение антигенных составляющих в препарате ведет к уменьшению объемного количества каждого антигена в единице объема вакцины, что потребовало поиска другого адъюванта, который бы обеспечил достаточно выраженный поствакцинальный иммунный ответ. Вместе с тем в последние годы появилось большое количество новых, как готовых (коммерческих), так и экспериментальных адъювантных продуктов, использование которых позволяет повысить эффективность вакцинации, сохраняя безвредность и безопасность вакцинных препаратов. Поэтому мы посчитали интересным и научно обоснованным провести сравнительную оценку традиционных и новых перспективных адъювантов.

Всего мы осуществили исследование 11 кандидатных адъювантов для новой вакцины:

- готовые масляные адъюванты французской компании SEPPIC (ISA 50, ISA 61, ISA 70, ISA 71, ISA 206, ISA 773);
- 6% гель ГОА с добавлением сапонины (стандартный адъювант для вакцины «КОМБОВАК»);
- ISCOM (на основе липосом с добавлением растительных гликозидов);
- полисахаридные адъюванты грибного и растительного происхождения;

- высокомолекулярный синтетический полиэлектролит (карбомер) со смесью поверхностно-активных гликозидов.

Традиционные адъюванты (минеральные масла, ГОА, сапонин) обладают своими характерными преимуществами и недостатками. Так гидроокись алюминия является безвредным адъювантом, обуславливающим приемлемую местную реактогенность для вакцинных препаратов. Во многих странах мира ГОА принят в качестве «золотого» стандарта по безвредности при изготовлении вакцин медицинского назначения [31, 56, 78]. Однако, многие исследователи отмечают тот факт, что ГОА не всегда обеспечивает приемлемый уровень индуцируемого иммунного ответа, особенно это актуально для вирусных и низкомолекулярных антигенов, например, рекомбинантных белков [1, 31].

С другой стороны, минеральные масла, особенно с добавлением клеточной стенки микобактерий (полный адъювант Фрейнда) являются мощнейшими стимуляторами иммунного ответа, однако зачастую это компенсируется повышенной местной реактогенностью. Т.е. на месте инъекции образуются длительно рассасывающиеся гранулемы. Описаны случаи, когда при использовании некоторых бактериальных компонентов, обладающих собственной высокой реактогенностью (например, бактериальные клетки *P. multocida*) в сочетании с масляными адъювантами, на месте введения вакцины образовывались абсцессы и/или очаги разлитого воспаления [31, 45, 56]. Так полный адъювант Фрейнда используется только в лабораторной практике и не вводится в состав серийных вакцинных препаратов.

В последнее время многие компании, занимающиеся разработкой адъювантов, ведут активные работы по поиску компромисса между активностью и реактогенностью. В состав современных масляных адъювантов добавляются неминеральные масла, подбираются соответствующие сурфактанты (эмульгаторы), обеспечивающие устойчивую связь между масляной и водной фазами в вакцине. Появляются новые (в том числе и синтетические) перспективные адъюванты [28, 42].

На настоящий момент все более широкое распространение в качестве адьюванта получают различные синтетические полиэлектролиты, такие как карбомер (ИНГЕЛЬВАК, ЦиркоФЛЕКС®; Вакцина против рожи и парвовирусной болезни свиней инактивированная «ВЕРРЕС-ЭП», ООО «Ветбиохим»), полиоксидоний (вакцина «Гриппол», ФГУП «НПО «Микроген», предназначенная для вакцинации людей против гриппа).

Для первоначальной оценки выбранных 11 адьювантов мы с каждым из них изготовили экспериментальные образцы трехкомпонентной вакцины против вирусной диареи, инфекционного ринотрахеита и аденовирусной инфекции КРС, которые оценивали по следующим показателям:

- антигенная активность указанных компонентов в опыте на лабораторных животных (морских свинках);
- безвредность и местная реактогенность в опыте на лабораторных животных (морских свинках);
- технологичность изготовления;
- вязкость конечного продукта (для эмульгированных образцов);
- стабильность в процессе хранения;
- качество эмульсии (для эмульгированных образцов).

На основании комплексного отбора были отсеяны следующие адьюванты:

- масляный адьювант ISA 70 (нестабильная эмульсия);
- полисахаридный адьювант растительного происхождения (низкая антигенная активность);
- полисахаридный адьювант грибного происхождения (недостаточная антигенная активность, значительное изменение внешнего вида препарата в процессе хранения);
- адьювант ISCOM (низкая антигенная активность).

Остальные семь адьювантов мы использовали в дальнейших исследованиях, для этого с каждым из них изготовили экспериментальные образцы семикомпонентной вакцины против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота-, коронавирусной болезнью



и аденовирусной инфекции крупного рогатого скота с использованием соответствующих инактивированных вирусов. Основными критериями оценки новых образцов были: безвредность и антигенная активность в опытах на лабораторных (морские свинки) и естественно-восприимчивых (коровы до осеменения) животных.

Результаты проведенных исследований показали, что разные адъюванты оказывали неодинаковый иммуностимулирующий эффект на подопытных животных. Наиболее антигенно активными были образцы вакцины, изготовленные с масляными адъювантами. Сравнив полученные результаты, а также принимая во внимание дополнительные характеристики, полученные в предыдущих исследованиях (стабильность, вязкость и пр.) мы сделали выбор в пользу адъюванта ISA 61.

Одним из факторов выбора являлся экономический, поскольку использование этого адъюванта снижает объемное использование антигенной части (на одну дозу препарата) по сравнению с прототипной сорбированной вакциной КОМБОВАК (готовится на основе ГОА с добавлением сапонина). При этом благоприятным обстоятельством стало то, что активность эмульгированного образца является более высокой.

В дальнейшем были изготовлены новые серии экспериментальной семикомпонентной вакцины на основе ISA 61, которые использовали для отработки оптимальной иммунизирующей дозы (на телятах и коровах), а также для оценки колострального иммунитета и эффективности нового препарата.

Исследования по отработке иммунизирующей дозы показали, что оптимальной является доза 3,0 мл для коров и 2,0 мл для телят. Меньший объем вводимой вакцины не обеспечивал должного уровня гуморального иммунного ответа, а увеличение дозы, выше озвученной не вызывало достоверного увеличения выработки поствакцинальных вируснейтрализующих антител.

Одним из важнейших свойств вакцины, предназначенной для профилактики инфекционных заболеваний, которым подвержен молодняк животных, является ее способность обеспечивать формирование колострального иммунитета.

Сравнительные испытания показали, что у телят, полученных от двукратно вакцинированных коров, уровень вируснейтрализующих антител в сыворотке крови был в 5-15 раз выше, чем у животных в контрольной группе, полученных от невакцинированных коров (при своевременной выпойке молозива в обеих группах).

Выраженная антигенная активность ассоциированных вакцин, содержащих аденовирусный компонент была отмечена в других исследованиях, посвящённых данной тематике [3, 6, 11, 69, 115]. Однако, в указанных работах количество антигенных компонентов не превышало трех. Нам же удалось сконструировать вакцинный препарат, содержащий семь вирусных компонентов, каждый из которых обладает высокой антигенной активностью.

В ходе испытаний по оценке эффективности в условиях хозяйства, неблагополучного по основным респираторным заболеваниям телят, были получены следующие показатели: в опытной (вакцинированной) группе заболеваемость телят составила 19,9%, смертность и вынужденная выбраковка 2,8%, в то время как в контрольной (невакцинированной) группе данные показатели составили 54% и 7,4% соответственно. Т.е. в производственных условиях была показана высокая эффективность новой вакцины.

Полученные данные по эффективности вакцины в производственных условиях согласуются с подобными исследованиями, проведенными ранее другими учеными. Так применение ассоциированных многокомпонентных (содержащих смесь нескольких вирусных антигенов с добавлением бактериальных компонентов) вакцин в условиях животноводческих хозяйств, неблагополучных по респираторным заболеваниям инфекционной этиологии позволяло снизить заболеваемость и смертность телят в 2-4 раза [12].

Последним этапом разработки вакцины стало изучение сохранности ее физических и иммунобиологических свойств в процессе хранения. Исследования проводили в течение 2 лет с интервалом 6 месяцев (со второго года хранения), для чего использовали образцы экспериментальной серии вакцины, хранившиеся при

температуре 2-8°C. Критериями оценки служили следующие параметры: внешний вид (структура и стабильность эмульсии) и антигенная активность.

Полученные результаты продемонстрировали стабильность физических и иммунобиологических свойств препарата в течение 24 месяцев хранения, на основании чего был установлен гарантийный срок годности вакцины – 18 месяцев.

В последующем новый препарат - вакцина инактивированная комбинированная против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота-, коронавирусной болезней и аденовирусной инфекции крупного рогатого скота, получивший коммерческое название КОМБОВАК-А успешно прошел первичную и повторную (через 5 лет) регистрацию в ФГБУ «ВГНКИ» и регулярно проходил сертификационные испытания (там же). В настоящее время выпущено и реализовано более 4 миллионов доз вакцины КОМБОВАК-А, в том числе и в Республику Беларусь.

## 9. Заключение.

Изучая эпизоотическую обстановку в животноводческих хозяйствах, мы обнаружили, что в некоторых случаях использование комбинированных поливалентных вакцин против основных вирусных респираторных и кишечных заболеваний телят, не снимает полностью проблемы, связанные с поражением органов дыхания у молодняка. Мы попытались выяснить причину таких патологий, сконцентрировав внимание на поиске возбудителя.

В ходе проведенной работы нами был выделен полевой штамм аденовируса КРС. Изучение фрагмента генома, кодирующего гексон позволило его идентифицировать, установив принадлежность к I типу аденовируса КРС. Исследования, направленные на адаптацию выделенного штамма к перевиваемой культуре клеток, имели цель оптимизировать процесс культивирования по следующим показателям и параметрам: время заражения после пересева клеточной культуры, заражающая доза, продолжительность культивирования, проведение «контакта» при заражении клеточной культуры. В результате была отработана методика получения культурального аденовируса КРС с инфекционной активностью на уровне 7,23-7,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл. Изучив биологические свойства (включая антигенные) выделенного штамма, мы пришли к выводу о возможности его использования в качестве вакцинного в составе инаktivированных препаратов, для чего предварительно были отработаны методы его инаktivации. Выделенный штамм при депонировании получил название – Альфа.

Для проведения рутинных диагностических исследований, направленных на выявление ДНК аденовируса КРС мы разработали диагностическую тест-систему ПЦР. Из-за того, что в настоящее время классифицировано 11 типов аденовируса КРС, относящихся к двум родам (*Mastadenovirus* и *Atadenovirus*), мы остановились на гнездовом варианте ПЦР с использованием внешней пары праймеров (общих для обоих родов) и внутренними парами праймеров (специфичных для каждого рода). Такой подход позволил разработать специфичную и высокочувствительную ( $5,4 \times 10^3$  мол/мкл для рода *Mastadenovirus*

и  $4,3 \times 10^3$  мол/мкл для рода *Atadenovirus*) тест-систему ПЦР для выявления ДНК аденовируса КРС.

В последующем, разработанную тест-систему мы использовали для мониторинга эпизоотической ситуации исследуя пробы, полученные от телят с характерной клинической картиной респираторных заболеваний. В результате было установлено наличие ДНК аденовируса КРС из рода *Mastadenovirus* в 11,3 % исследованных проб, ДНК аденовируса КРС из рода *Atadenovirus* - в 7,2 % исследованных проб. Часть из положительных проб были дополнительно исследованы методом геномного секвенирования, который показал присутствие в полевых пробах аденовируса КРС 1-го, 3-го, 6-го и 8-го типов.

Параллельно мы провели серологические исследования, целью которых было выявления вируснейтрализующих антител к основным вирусным возбудителям. Всего исследовали 1255 проб сыворотки крови, в которых были обнаружены антитела к возбудителям: аденовирусной инфекции в 26% случаев, инфекционного ринотрахеита – в 50%, парагриппа-3 - в 83%, вирусной диареи - в 87%, респираторно-синцитиальной болезни - в 60%, ротавирусной болезни - в 83%, коронавирусной болезни - в 84% случаев.

Антитела к возбудителям инфекционного ринотрахеита, респираторно-синцитиальной болезни и вирусной диареи также выявляли в реакции иммуноферментного анализа, с применением соответствующих коммерческих диагностических ИФА-наборов. В результате количество положительных проб составило: к возбудителю инфекционного ринотрахеита – 51%, респираторно-синцитиальной болезни – 61%, вирусной диареи – 85% от общего количества исследованных проб, что согласовывалось с результатами РН.

Результаты эпизоотологического мониторинга и данные по распространенности основных вирусных заболеваний телят послужили основой принятия решения о создании семивалентной вакцины, включающей в себя аденовирусный компонент. В ходе решения этой задачи мы провели исследование 11 экспериментальных и готовых адъювантов – кандидатов для создания новой

вакцины. По итогам сравнительных испытаний был выбран масляный адьювант ISA61, обеспечивающий конструирование эмульсий типа вода в масле.

В результате проведенных исследований была разработана вакцина инактивированная комбинированная против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота-, коронавирусной болезней и аденовирусной инфекции крупного рогатого скота (КОМБОВАК-А). Отработаны иммунизирующие дозы для телят и взрослых животных, доказана высокая антигенная активность всех вирусных компонентов, входящих в состав вакцины. Показана способность препарата вызывать формирование напряжённого колострального иммунитета у телят, полученных от вакцинированных животных, а также ее высокая эффективность в условиях неблагополучного животноводческого хозяйства.

В настоящее время вакцина «КОМБОВАК-А» успешно прошла повторные регистрационные испытания в ФГБУ «ВГНКИ» и широко применяется на территории РФ, а также Республики Беларусь.

## ВЫВОДЫ.

1. Изучение распространенности основных вирусных респираторных и кишечных заболеваний телят в хозяйствах восьми субъектов РФ серологическими методами показало наличие антител к аденовирусу КРС I-го типа в 26% исследуемых проб, к вирусу инфекционного ринотрахеита в 50%, к вирусу парагриппа-3 в 83%, к вирусной диареи в 87%, к вирусу респираторно-синцитиальной болезни в 60%, к ротавирусу – 83%, коронавирусу – 84%.

2. Разработана родоспецифическая тест-система ПЦР для выявления ДНК аденовируса КРС. Чувствительность составила  $5,4 \times 10^3$  мол/мкл для рода *Mastadenovirus* и  $4,3 \times 10^3$  мол/мкл для рода *Atadenovirus*.

3. При помощи родоспецифической тест-системы ПЦР ДНК аденовируса КРС из рода *Mastadenovirus* была обнаружена в 11,3 % исследованных проб, ДНК аденовируса КРС из рода *Atadenovirus* - в 7,2 % исследованных проб.

4. Выделен, охарактеризован и адаптирован к перевиваемой культуре клеток MDBK полевой штамм аденовируса КРС I-го типа. Оптимизация условий культивирования позволила повысить инфекционную активность выделенного вируса до  $7,5 \lg \text{ТЦД}_{50}/\text{мл}$ . Показана возможность его использования в качестве вакцинного штамма, при производстве инаktivированных вакцин. Выделенный штамм аденовируса КРС I-го типа, получивший название «Альфа» депонирован в Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, номер депонента ГKB № 2732. В дальнейшем штамм «Альфа» аденовируса КРС I-го типа был включен в состав многокомпонентной вакцины против респираторных и кишечных инфекций КРС.

5. Проведение сравнительного анализа 11 адъювантов для включения в состав многокомпонентной вакцины, показало, что наиболее иммунологически эффективным и безопасным является адъювант ISA61.

6. Установлена безвредность и антигенная активность семикомпонентной инаktivированной комбинированной вакцины против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота-, коронавирусной болезней и аденовирусной инфекции крупного рогатого скота, а также сохранность указанных свойств вакцины в процессе хранения (до 18 месяцев) при соблюдении температурного режима 2-8°C.

7. В результате исследований, проведенных на естественно-восприимчивых животных установлено, что введение семикомпонентной инаktivированной комбинированной вакцины против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота-, коронавирусной болезней и аденовирусной инфекции крупного рогатого скота вызывает формирование поствакцинального гуморального иммунного ответа у коров, что в свою очередь обеспечивает формирование колострального иммунитета у телят, полученных от вакцинированных животных. Опытным путем определены оптимальные иммунизирующие дозы (для коров - 3,0 мл, для телят - 2,0 мл) и схемы вакцинации.

8. При использовании разработанного вакцинного препарата в хозяйстве, неблагополучном по кишечным и респираторным заболеваниям КРС было установлено, что в опытной группе заболеваемость телят составила 19,9%, смертность и вынужденная выбраковка 2,8%, в то время как в контрольной группе данные показатели составили 54,0% и 7,4%.



## **10. Практические предложения.**

Материалы проведенных исследований вошли в следующие нормативные документы:

- СТО «Тест-система для выявления аденовируса крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции».

- Инструкция по применению Тест-системы для выявления аденовируса крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции.

- Документация на лекарственный препарат «Вакцина инактивированная комбинированная против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота-, коронавирусной болезней и аденовирусной инфекции крупного рогатого скота (КОМБОВАК-А)» (Регистрационное удостоверение №77-1-14.18-4278№ПВР-1-35.13/02985 от 23 января 2019 года).

- Инструкция по применению вакцины инактивированной комбинированной против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота-, коронавирусной болезней и аденовирусной инфекции крупного рогатого скота (КОМБОВАК-А), утвержденная Россельхознадзором 20 сентября 2018 года.

- Промышленный регламент 76418883-01-004-2018 производства вакцины инактивированной комбинированной против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота-, коронавирусной болезней и аденовирусной инфекции крупного рогатого скота «КОМБОВАК-А».

## **11. Рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы.**

Выделенный штамм «Альфа» аденовируса КРС I-го типа рекомендован к использованию в качестве контрольно-производственного при разработке средств специфической профилактики аденовирусной инфекции крупного рогатого скота и контроле антигенной активности препаратов

При проведении лабораторных диагностических исследований для индикации и идентификации родовой принадлежности аденовируса КРС рекомендуется использовать разработанную тест-систему для выявления аденовируса крупного рогатого скота методом полимеразной цепной реакции.

Для профилактики вирусных и респираторных заболеваний крупного рогатого скота рекомендуется использовать вакцину инаktivированную комбинированную «КОМБОВАК-А» внутримышечно в дозе 2 мл телятам до года и 3 мл взрослым животным.

Результаты научной работы могут быть использованы при разработке технологии изготовления иммунобиологических лекарственных средств против вирусных инфекций крупного рогатого скота.

## 12. Список сокращений.

BAdV – Bovine adenovirus (аденовирус КРС)

DMEM – питательная среда (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)

FCA – Freund's complete adjuvant

FIA – Freund's incomplete adjuvant

MDBK – перевиваемая культура клеток почки телят

pH – уровень водородных ионов

A – аденин

T – тимин

AB – аденовирус

АПК – антигенпрезентирующие клетки

ВД – вирусная диарея

ГКГС – главный комплекс гистосовместимости

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИРТ – инфекционный ринотрахеит

ИФА – иммуноферментный анализ

КРС – крупный рогатый скот

КВ – коронавирус

мкг – микрограмм

мкл – микролитр

мМ - миллимоль

мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота

НАФ – неполный адъювант Фрейнда

нм – нанометр

ПГ-3 – парагрипп-3

пМ – пикомоль

п.н. – пара нуклеотидов

ПЦР – полимеразная цепная реакция

РВ – ротавирус

РГА – реакция гемагглютинации

РДП – реакция диффузной преципитации

РИФ – реакция иммунофлюоресценции

РЛА – реакция латекс-агглютинации

РН – реакция нейтрализации

РНГА – реакция непрямой гемагглютинации

РНК – рибонуклеиновая кислота

РС – респираторно-синцитиальная вирусная инфекция

РСК – реакция связывания комплемента

РТГА – реакция торможения гемагглютинации

Т-1 – перевиваемая культура клеток почки телят

ТЦД<sub>50</sub> – 50%-ная тканевая цитопатогенная доза

ЦПД – цитопатическое действие вируса

### 13. Список использованной литературы.

1. Алипер, Т.И. Актуальные инфекционные болезни свиней. Иммуитет при инфекционных болезнях: теория и прикладные аспекты. / Т.И. Алипер, О.А. Верховский, Е.В. Шемельков // М.: ЗооВетКнига – 2019. – С. 87-127.
2. Белоусова, Р.В. Аденовирусная инфекция крупного рогатого скота / Р.В. Белоусова, Р.З. Нургазиев, В.С. Фролов // Ветеринария. – 1989. – № 1. – С. 29-30.
3. Белоусова, Р.В. Антигенные свойства ассоциированной инактивированной вакцины против аденовирусной инфекции и вирусной диареи крупного рогатого скота / Р.В. Белоусова, В. Ясер, И.В. Третьякова, М. С. Калмыкова, Е.И. Ярыгина // РВЖ СХЖ. – Специальный выпуск – 2009. – № 3. – С. 49-51.
4. Белоусова, Р.В. Ветеринарная вирусология. / Р.В. Белоусова, Э.А. Преображенская, И.В. Третьякова // М.: КолосС – 2007. – 424 с.
5. Белоусова, Р.В. Иммуноферментный метод диагностики аденовирусной инфекции КРС / Р.В. Белоусова, И.В. Третьякова // Достижения науки и техники АПК. – 1990. – № 1. – С.25-27.
6. Белоусова, Р.В. Инактивированная вакцина против аденовирусной инфекции крупного рогатого кота / Р.В. Белоусова // Вестн. с.-х. науки. – 1989. – №8. – С. 91-95.
7. Белоусова, Р.В. Лабораторная диагностика и специфическая профилактика аденовирусной инфекции крупного рогатого скота // автореф. дисс. ... док. вет. наук / Р.В. Белоусова. – Москва, 1989.
8. Белоусова, Р.В. Профилактика аденовирусной инфекции крупного рогатого скота / Р.В. Белоусова // Информ. листок. – Моск. обл. террит. центр, науч.- тех. информации и пропаганды. – 1988. – № 413. – С. 88.
9. Бессарабов, Б.Ф. Инфекционные болезни животных: учебник для студентов высших учебных заведений / Б.Ф. Бессарабов, А.А Вишутин, Е.С. Воронин и др.; под ред. А.А. Сидорчука // М.: Колос – 2007. – 671 с.

10. Будулов, Н. Р. Респираторные болезни крупного рогатого скота в Дагестане // автореф. дисс. ... док. вет. Наук / Н.Р. Будулов. – Краснодар, 2009.
11. Вазир, Я. Технология приготовления и антигенные свойства ассоциированной инактивированной вакцины против аденовирусной инфекции и вирусной диареи крупного рогатого скота // дисс. ... канд. вет. наук / Я. Вазир. – М., 2008.
12. Верховская, А.Е. Разработка и оценка эффективности вакцин Комбовак-Р и Комбовак-К // дисс. ... канд. вет. наук / А.Е. Верховская. – Владимир, 2008.
13. Воронин, Е.С. Иммунология / Е.С. Воронин и др. // М.: Колос-пресс – 2002. – 406 с.
14. Галактионов, В.Г. Иммунология / В.Г. Галактионов // М.: Академия – 2004. – 528 с.
15. Гаффаров, Х.З. Определение оптимальной иммунизирующей дозы ассоциированной вакцины, сконструированной на основе антигенов аденовируса I-ой и II-ой подгрупп, герпесвируса типа I, вируса парагриппа-3 и вируса вирусной диареи - болезни слизистых оболочек крупного рогатого / Х.З. Гаффаров, А.В. Иванов, Л.Ш. Дуплева, А.И. Яруллин, М.А. Ефимова // Живые и биокосные системы. – 2014. – № 9. – С. 12.
16. Глотов, А.Г. Вирусные болезни крупного рогатого скота при интенсивном ведении молочного животноводства / А.Г. Глотов, Т.Н. Глотова, И.Я. Строганова // Краснояр. гос. аграр. ун-т. – 2010. – 188 с.
17. Гулюкин, М.И. Система ветеринарно-санитарных, профилактических и лечебных мероприятий против инфекционных болезней крупного рогатого скота в хозяйствах Российской Федерации / М.И. Гулюкин, К.П. Юров, Ю.Д. Караваев и др. // ГНУ ВИЭВ, ФГУ «Центр ветеринарии». – М., – 2007. – 14 с.
18. Ефанова, Л.И. Противовирусный колостральный иммунитет и респираторные болезни у телят первого месяца жизни / Л.И. Ефанова, А.И. Золотарев, А.Е. Черницкий, О.А. Манжурина, И.В. Парфенова, М.И. Адодина // Актуальные вопросы ветеринарной биологии. – 2013. – № 3 (19). – С. 30-36.

19. Зверев, В.В. Вакцины и вакцинация / В.В. Зверев, Р.М. Хаитов и др. // М.: «ГЭОТАР-Медиа». – 2014. – 640 с.
20. Зверев, В.В. Медицинская микробиология, вирусология и иммунология / В.В. Зверев, А.С. Быков // М.: «Медицинское информационное агентство». – 2016. – 816 с.
21. Ковалишин, Г.Г. Сравнительное изучение гексонов некоторых аденовирусов рода *Mastadenovirus* / Г.Г. Ковалишин, С.Н. Хилько, Б.С. Народицкий // Микробиология. – 1986. – Т. 48 – № 2. – С. 50-55.
22. Коленкова, Л.М. Патогенность полевых изолятов аденовирусов телят / Л.М. Коленкова, Р.В. Белоусова, В.Н. Сюрин // Проблемы вет. биологии: сб. науч. тр. Моск. вет. акад. – 1984. – С.23-28.
23. Лобова, Т.П. Усовершенствование лабораторной диагностики аденовирусной инфекции крупного рогатого скота // дисс. ... канд. биол. наук: 16.00.03 / Т.П. Лобова – Москва, 2006.
24. Львов, Д.К. Руководство по вирусологии / Д.К. Львов, Т.И. Алипер, О.А. Верховский и др.; под ред. Д.К. Львова. // М.: ООО «Издательство «Медицинское информационное агенство». – 2013. – 1200 с.
25. Медуницын, Н.В. Вакцинология / Н.В. Медуницын // М.: Триада-Х – 2004. – 448 с.
26. Олейник, А.В. Стратегия профилактики респираторных болезней телят / А.В. Олейник // Ветеринария. – 2009. – № 2. – С. 16-18.
27. Орлянкин, Б.Г. Основы противовирусного иммунитета / Б.Г. Орлянкин, Е.А. Непоклонов, Т.И. Алипер // М.: «ЗooВетКнига» – 2015. – 356 с.
28. Петров, Р.В. Иммуногены и вакцины нового поколения / Р.В. Петров, Р.М. Хаитов // М.: «ГЭОТАР-Медиа» – 2011. – 608 с.
29. Прудников, В. С. Изучение иммуноморфогенеза при болезнях и вакцинациях животных / В. С. Прудников, Ф.Д. Гуков, И.М. Луппова, А.И. Жуков, В.Н. Грушин // Ветеринария. – 2005. – № 4. – С. 20-23.
30. Пчельников, А.В. Некоторые результаты изучения этиологии респираторных болезней телят в хозяйствах Московской области / А.В.

Пчельников, С.В. Алексеев, К.А. Диас Хименес, К.П. Юров // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. – 2015. – № 1. – С. 16-18.

31. Самуйленко, А.Я. Адьюванты / А.Я. Самуйленко и др. // М.: ВНИТИБП – 2016. – 167 с.

32. Сергеев, В.А. Вирусы и вирусные вакцины / В.А. Сергеев, Е.А. Непоклонов, Т.И. Алипер. – М.: Библионика – 2007. – 524 с.

33. Строганова, И.Я. Вирусные болезни крупного рогатого скота в Средней Сибири / И.Я. Строганова // Ветеринарная медицина. Современные проблемы и перспективы развития: междунар. науч.–практ. конф. – Саратов. – 2010. – С. 408-410.

34. Строганова, И.Я. Вирусные болезни крупного рогатого скота: учеб. пособие / И.Я. Строганова, А.Г. Глов, Т.И. Глотова // Красноярск, 2011. – 192 с.

35. Строганова, И.Я. Распространение аденовирусной инфекции крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах Восточной Сибири / И.Я. Строганова // Вестник КрасГАУ. – 2011. – № 4. – С.108-110.

36. Строганова, И.Я. Распространение вирусных и микоплазменных инфекций крупного рогатого скота в животноводческих хозяйствах Средней Сибири / И.Я. Строганова, А.Г. Хлыстунов, А.А. Трухоненко, Е.Ю. Гуменная // Вестник КрасГАУ. – 2013. – № 8. – С. 41–43.

37. Счисленко, С.А. Напряженность колострального иммунитета у телят к респираторным вирусам / С.А. Счисленко, О.И. Щербак, А.А. Мороз, И.О. Сивков, М.А. Сушкова, Я.И. Щербак // Вестник КрасГАУ. – 2018. – № 4. – С.82-85.

38. Сюрин, В.Н. Вирусные болезни животных / В.Н. Сюрин, Р.В. Белоусова, Б.В. Соловьев, Н.В. Фомина. // Москва: ВНИИТИБП – 1998. – 928 с.

39. Сюрин, В.Н. Ветеринарная вирусология / В.Н. Сюрин, Р.В. Белоусова, Н.В. Фомина. // Москва: Агропромиздат – 1991. – 432 с.

40. Сюрин, В.Н. Методы лабораторной диагностики вирусных болезней животных / В.Н. Сюрин, Р.В. Белоусова, Н.В. Фомина. // М.: Наука – 1986. – 351 с.



41. Трухоненко, А.А. Вирусные ассоциации у телят в хозяйстве Красноярского Края, неблагополучном по вирусным респираторным болезням крупного рогатого скота / А.А. Трухоненко, И.Я. Строганова // Сборник трудов VI Международной научно-практической конференции молодых ученых. – 2013. – С. 39-41.
42. Хаитов, Р.М. Иммунология: структура и функции иммунной системы / Р.М. Хаитов // М.: «ГЭОТАР-Медиа» – 2013. – 280 с.
43. Шабунин, С.В. Респираторные болезни телят: современный взгляд на проблему / С.В. Шабунин, А.Г. Шахов, А.Е. Черницкий, А.И. Золотарев, М.И. Рецкий // Ветеринария. – 2015. – № 5. – С. 3–13.
44. Шамшева, О.В. Клиническая вакцинология / О.В. Шамшева, В.Ф. Учайкин, Н.В. Медуницын // М.: «ГЭОТАР-Медиа» – 2016. – 575 с.
45. Шемельков, Е.В. Влияние различных типов адъювантов на эффективность вакцин против инфекционных болезней свиней // дисс. ... канд. вет. наук / Е.В. Шемельков. – М., 2010.
46. Юров, К.П. Профилактика инфекционных болезней телят / К.П. Юров, А.Ф. Шуляк // Болезни сельскохозяйственных животных вирусной и других этиологий и меры борьбы с ними / Материалы науч.- прак. конф. Иркутск – 2001. – С. 9-10.
47. Юров, К.П. Этиология, диагностика и профилактика массовых респираторных болезней телят / К.П. Юров, А.Ф. Шуляк, С.В. Алексеенкова, Г.К. Юров, И.Ю. Ткачев, И.А. Осмаев // Международная научно-практическая конференция "Актуальные проблемы инфекционной патологии и иммунологии животных". Сборник трудов. – 2006. – С. 128-132.
48. Юров, К.П. Профилактика вирусных болезней молодняка крупного рогатого скота с использованием вакцин и природных иммуномодуляторов / К.П. Юров, А.Ф. Шуляк, Г.Н. Величко, И.А. Осмаев, Г.К. Юров, С.В. Алексеенкова // Труды Всероссийского НИИ Экспериментальной Ветеринарии Им. Я.Р. Коваленко. – 2010. – № 76. – С. 131-136.

49. Abbas, A. Cellular and Molecular Immunology 9th Edition /A. Abbas, A.H. Lichtman, S. Pillai // Elsevier. – 2018. – 579 p.
50. Adair, B.M. Bovine adenovirus type 10: properties of viruses isolated from cases of bovine haemorrhagic enterocolitis / B.M. Adair, E.R. McKillop, J.A. Smyth, W.L. Curran, M.S. McNulty // Vet. Rec. – 1996. – V. 138. – P. 250–252.
51. Adair, B.M. Effects of two adenoviruses (type 1 and type 8) on functional properties of bovine alveolar macrophages in vitro / B.M. Adair, M.S. McNulty, J.C. Foster // Am. J. Vet. Res. – 1992. – V. 53. – P. 1010–1014.
52. Ahmed, W. Human and bovine adenoviruses for the detection of source-specific fecal pollution in coastal waters in Australia / W. Ahmed, A. Goonetilleke, T. Gardner // Water Res. – 2010. – V. 44. – P. 4662–4673.
53. Aldasy, P. Pneumoenteritis in calves caused by adenoviruses / P. Aldasy, A. Bartha // Acta. Vet. Hung. – 1965. – V. 15. – P. 167-175.
54. Allard, A. Rapid typing of human Adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis / A. Allard, B. Albinsson, G. Wadell // J Clin Microbiol. – 2001. – V. 39. – P. 498-505.
55. Apostólico, J. Adjuvants: Classification, Modus Operandi, and Licensing / J. Apostólico, V. Lunardelli, F. Coirada, S. Boscardin, D. Rosa // J. Immunol Res. – 2016. – V. 6. – P. 1-16.
56. Aucouturier, J. Adjuvants designed for veterinary and human vaccines / J. Aucouturier, L. Dupuis, V. Ganne // Vaccine. – 2001. – V. 19. – P. 2666-2672.
57. Autio, T. Etiology of respiratory disease in non-vaccinated, non-medicated calves in rearing herds / T. Autio, T. Pohjanvirta, R. Holopainen, U. Rikula, J. Pentikäinen, A. Huovilainen, H. Rusanen, T. Soveri, L. Sihvonen, S. Pelkonen // Vet. Microbiol. – 2007. – V. 119(2-4). – P. 256-65.
58. Babiuk, L.A. Experimental inoculation of heifers with bovine adenovirus type 3 / L.A. Babiuk, S.K. Mittal, S.K. Tikoo, J. Van Donkersgoed, T. Beskorwayne, D.L. Godson // Can J Vet Res. – 1999. – V. 63(2). – P. 153-6.

59. Babiuk, L.A. Nucleotide sequence genome organization and transcription map of bovine adenovirus type 3 / L.A. Babiuk et al. // *J. Virol.* – 1998. – V. 72. – P. 1394–1402.
60. Babiuk, L.A. Veterinary applications of DNA vaccines / L.A. Babiuk, S. van Drunen Littel-van den Hurk, B.I. Loehr, R. Uwiera // *Dev. Biol. (Basel).* – 2000. – V. 104. – P. 73-81.
61. Beacock-Sharp, H. A role for dendritic cells in the priming of antigen-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes by immune-stimulating complexes in vivo / H. Beacock-Sharp, A.M. Donachie, N.C. Robson, A.M. Mowat // *Int Immunol.* – 2003. – V. 15. – P. 711-720.
62. Belak, S. Experimental infection of calves with an adenovirus isolated from sheep and related to bovine adenovirus type 2. I. Clinical and virological studies. / S. Belak, V. Palfi, T. Szekeres, E. Tury. // *Zentralbl. Veterinarmed. B.* – 1977. V. 24. – P. 542-547.
63. Belak, S. Molecular diagnosis of animals' disease: some experiences over the past decade / S. Belak, P. Thoren // *Exp Rev Mol. Diagn.* – 2001. – V. 1. – P. 434-443.
64. Benkő, M. Adenoviruses: pathogenesis. In: Mahy BWJ, van Regenmortel MHV, editors. *Encyclopedia of virology*, 5 vols. Third edition, vol.1. Oxford: Elsevier. – 2008. – P. 24–9.
65. Benkő, M. Molecular evolution of adenoviruses / M. Benkő, B.D. Harrach // *Curr Top Microbiol Immunol.* – 2003. – V. 272. – P. 30-35.
66. Brock, K.V. The persistence of bovine viral diarrhea virus / K.V. Brock // *Biologicals.* – 2003. – V. 31(2). – P. 133-5.
67. Brogden, K.A. Polymicrobial Diseases. Chapter 12. Respiratory Viruses and Bacteria in Cattle/ K.A. Brogden, J.M. Guthmiller, editors. D.C. Hodgins, J.A. Conlon, P.E. Shewen // 2002. – Washington (DC). – ASM Press.
68. Burki, F. Bovine adenoviruses. *Virus Infections of Ruminants.* / F. Burki, Z. Dinter, B. Morein // Elsevier. – 1990. – P. 161–169.

69. Burki, F. Experimental Adenovirus Vaccines in Cattle. / F. Bürki // J. Amer. Vet. Med. Assoc. – 1973. – V. 163(7). – P. 897–900.
70. Burmester, G.R. Color atlas of immunology / G.R. Burmester, A. Pezzutto // перевод под ред. проф. Л.В. Козлова. – М.: «БИНОМ» – 2014.
71. Caldow, G.L. Associations between viral infections and respiratory disease in artificially reared calves / G. L. Caldow, S. Edwards, A. R. Peters, P. Nixon, G. Ibata, R. Sayers // Vet. Rec. – 1993. – V. 133. – P. 85–89.
72. Callan, R.J. Biosecurity and bovine respiratory disease / R.J. Callan, F.B. Garry // Vet. Clin. N. Am. Food Anim. Pract. – 2002. – V.18. – P. 57-77.
73. Coffman, R.L. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work / R.L. Coffman, A. Sher, R.A. Seder // Immunity. – 2010. – V. 33(4). – P. 492–503.
74. Constable, P. D. Veterinary Medicine. A textbook of the diseases of cattle, horses, sheep, pigs, and goats. 11 edition / P.D. Constable, K.W. Hinchcliff, S.H. Done, W. Grünberg // Elsevier. – 2017. – 2339 p.
75. Dan, A. Four new inverted terminal repeat sequences from bovine adenoviruses reveal striking differences in the length and content of the ITRs / A. Dan, P. Elo, B. Harrach, Z. Zadori, M. Benko // Vir. Gen. – 2001. – V. 22. – P. 175-179.
76. Davison, A.J. Genetic content and evolution of adenoviruses / A.J. Davison, M. Benko, B. Harrach // J. Gen. Virol. – 2003. – V. 84. – P. 2895-2908.
77. Day, M. J. Veterinary Immunology – Principles and Practice, Second edition / Michael J. Day, Ronald D. Schultz // Department of Pathobiological Sciences School of Veterinary Medicine University of Wisconsin-Madison, USA. – 2014.
78. De Gregorio, E. Vaccine adjuvants: mode of action. / E. De Gregorio, E. Caproni, J.B. Ulmer // Front Immunol. – 2013. – V. 4. – P. 214.
79. Duman, R. Seroprevalence of viral upper respiratory infections in dairy cattle / R. Duman, S. Yavru, M. Kale, O. Avci // Kafkas Univ Vet Fak Derg. – 2009. – V.15. – P. 539-42.
80. Ebner, K. Comparative sequence analysis of the hexon gene in the entire spectrum of human adenovirus serotypes: phylogenetic, taxonomic, and clinical

implications / K. Ebner, W. Pinsker, T. Lion // J. Virol. – 2005. – V. 79. – P. 12635–12642.

81. Edwards, T.A. Control methods for bovine respiratory disease for feedlot cattle / T.A. Edwards // Vet Clin. North Am. Food Anim Pract. – 2010. – V. 26(2). – P. 273-84.

82. Fent, G.M. Bovine adenoviruses serotype 7 infections in postweaning calves / G.M. Fent, R.W. Fulton, J.T. Saliki, S.L. Caseltine, H.D. Lenmkühl, A.W. Confer, C.W. Purdy, R.E. Briggs, R.W. Loan, G.C. Duff // Am J Vet Res. – 2002. – V. 63. – P. 976-978.

83. Freshney, R. Ian. Culture of animal cells: A manual of basic technique / R. Ian Freshney // by John Wiley & Sons. – 2005.

84. Fulton, R.W. Bovine respiratory disease research (1983-2009) / R.W. Fulton / Anim Health Res Rev. – 2009. – V. 10(2). – P. 131-9.

85. Gartlana, K.H. Sterile inflammation induced by Carbopol elicits robust adaptive immune responses in the absence of pathogen-associated molecular patterns/ K.H. Gartlana, G. Krashiasa, F. Wegmanna et al. // Vaccine. – 2016. – V. 34. – P. 2188–2196.

86. Gasper, D. J. Effective respiratory CD8 T-cell immunity to influenza virus induced by intranasal carbomer-lecithin-adjuvanted nonreplicating vaccines / D. J. Gasper, B. Neldner, E. H. Plisch, H. Rustom et al. // PLoS Pathog. – 2016. – 12(12).

87. Glenny, A.T. The antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. / A.T. Glenny, C.G. Pope, H. Waddington, U. Wallace // Journal of Pathology and Bacteriology. – 1926. – V. 29 – P. 38-45.

88. Graham, D.A. Isolation of bovine adenovirus serotype 6 from a calf in the United Kingdom / D.A. Graham, V. Calvert, M. Benkö, W. Curran, M. Wylie, D.A. Snodden, D.A. Moffet, T. Papp, B.M. Adair, J.A. Smyth // Vet. Rec. – 2005. – V. 156. – P. 82-6.

89. Ghirotti, M. Seroprevalences of selected cattle disease in the Kafue flats of Zambia / M. Ghirotti, G. Semproni, D. De Meneghi, F.N. Mungaba, D. Nannini, G. Calzetta, G. Paganico // Vet. Res. Commun. – 1991. – V. 15. – P. 25-36.

90. Guy, B. The perfect mix: recent progress in adjuvant research / B. Guy // *Nature Reviews Microbiology*. – 2007 – V. 5(7). – P. 505–517.
91. Hakansson, A. Adenovirus infection enhances in vitro adherence of *Streptococcus pneumoniae* / A. Hakansson, A. Kidd, G. Wadell, H. Sabharwal, C. Svanborg // *Infect. Immun.* – 1994. – V. 62. – P. 2707–2714.
92. Harrach, B. Adenoviruses: general features. / B. Harrach // *Reference Module in Biomedical Sciences*. – Elsevier. – 2014.
93. Harrach B. Available adenovirus sequences <http://www.vmri.hu/~harrach/ADENOSEQ.HTM> Accessed 24 May 2019
94. Harrach, B. Family Adenoviridae Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses. Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. / B. Harrach, M. Benkő, G.W. Both, M. Brown, A.J. Davison, M. Echavarría et al // Elsevier. – 2011. – P. 125-41.
95. Harrach, B. Identification and sequence analysis of the core protein genes of bovine adenovirus 2 / B. Harrach, M. Benko, M. Rusvai, A. Bánrévi, P.S. Evans // *Virus. Res.* – 2000. – V. 70(1-2). – P. 25-30.
96. Harrach, B. Reptile adenoviruses in cattle? / B. Harrach // *Acta Vet. Hung.* – 2000. – V. 48. – P. 485–90.
97. Hodgson, P.D. Effect of stress on viral–bacterial synergy in bovine respiratory disease: novel mechanisms to regulate inflammation / P.D. Hodgson, P. Aich, A. Manuja, K. Hokamp, F.M. Roche, F.S. Brinkman, A. Potter, L.A. Babiuk, P.J. Griebel // *Comp. Funct. Genomics* – 2005. – V. 6. – P. 244–50.
98. Horner, G.W. A new subgroup 2 bovine adenovirus proposed as the prototype strain 10 / G.W. Horner, R. Hunter, A. Bartha, M. Benkő // *Archives of Virology*. – 1989. – V.109. – P. 121–124.
99. Hundesa, A. Identification of human and animal adenoviruses and polyomaviruses for determination of sources of fecal contamination in the environment. / A. Hundesa, C. Maluquer de Motes, S. Bofill-Mas, N. Albinana-Gimenez, R. Girones. // *Appl. Environ. Microbiol.* – 2006. – V. 72. – P. 7886–7893.

100. Kale, M. Serological evaluation of viral infections in bovine respiratory tract / M. Kale, S. Yavru, A. Simsek, O. Yapkic // *Acta Veterinaria*. – 2005. – V. 2-3. – P. 219-226.
101. Kale, M. Some viral and bacterial respiratory tract infections of dairy cattle during the summer season / M. Kale, D. Ozturk, S. Hasircioglu, F. Pehlivanoglu, H. Turutoglu // *Acta Veterinaria* – 2013. – V. 63 (2-3). – P. 227-236.
102. Kumar, S. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets / S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura // *Mol. Biol. Evol.* – 2016. – V. 33(7). – P.1870-4.
103. Lazić, S. Complex of respiratory diseases in cattle from the aspect of parainfluenza-3 virus / S. Lazić, T. Petrović, D. Bugarski, N. Kendrišić // *Biotechnology in Animal Husbandry*. – 2009. – V. 25 (5-6). – P. 703-711.
104. Lee, S. Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases / S. Lee, M.T. Nguyen // *Immune Network*. – 2015. – V. 15(2). – P.51–57.
105. Lehmkuhl, H.D. A bovine adenovirus type 3: isolation, characterization, and experimental infection in calves / H.D. Lehmkuhl, M.H. Smith, R.E. Dierks // *Arch. Virol.* – 1975. – V. 48. – P. 39–46.
106. Lehmkuhl, H.D. Characterization of a new adenovirus isolated from black-tailed deer in California / H.D. Lehmkuhl, L.A. Hobbs, L.W. Woods // *Arch. Virol.* – 2001. – V. 146. – P. 1187–1196.
107. Lehmkuhl, H.D. Isolation of a bovine adenovirus serotype 10 from a calf in the United States / H.D. Lehmkuhl, R.C. Cutlip, B.M. DeBey // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 1999. – V. 11. – P. 485–490.
108. Lehmukhul, H.D. Neutralizing antibody to bovine adenovirus serotype 3 in healthy cattle and cattle with respiratory tract disease / H.D. Lehmukhul, M.H. Smith, P.M. Gough // *Am J Vet Res.* – 1979. – V. 40(4). – P. 580-3.
109. Lehmkuhl, H.D. Serologic and hexon phylogenetic analysis of ruminant adenoviruses / H.D. Lehmkuhl, L.A. Hobbs // *Arch. Virol.* – 2008.– V. 153. – P. 891-7.

110. Lehmkuhl, H.D. Survey for antibodies to bovine adenoviruses in six- to nine-month-old feedyard cattle / H.D. Lehmkuhl, R.E. Briggs, R.C. Cutlip // *Am. J. Vet. Res.* – 1998. – V. 59. – P. 1579–1580.
111. Liu, H. Adenovirus DNA replication / H. Liu, J.H. Naismith, R.T. Hay // *Curr Top Microbiol Immunol.* – 2003. – V. 272. – P. 131–164.
112. Male, D. Immunology, eighth edition / David Male, Milton Keynes, David B. Roth, Ivan M Roitt. // ELSEVIER. – 2013. – 482 p.
113. Maluquer, C.M. Detection of bovine and porcine adenoviruses for tracing the source of fecal contamination / C.M. Maluquer, P. Clemente-Casares, A. Hundesa, M. Martín, R. Girones // *Applied and environmental microbiology.* – 2004. – V. 3. – P. 1448-54.
114. Mamadatokhonova, G. Detection of Adenoviruses in cattle / G. Mamadatokhonova // Uppsala. – 2006.
115. Mattson, D.E. Vaccination of dairy calves with bovine adenovirus type 3 / D.E. Mattson, J.R. Wangelin, R.L Sweat // *Cornell Vet.* – 1987. – V. 77. – P. 351–361.
116. Narita, M., Immunohistopatologe of calf pneumonia induced by endobronchiak inoculation with bovine adenovirus 3 / M. Narita, M. Yamada, T. Tsuboi, K. Kawashima // *Vet. Pathol.* – 2002. – V. 39. – P. 565.
117. Nguyen, T.H. Crystal structure of the fibre head domain of bovine adenovirus 4, a ruminant atadenovirus / T.H. Nguyen, M.Z. Vidovszky, M.Z. Ballmann, M. Sanz-Gaitero, A.K. Singh, B. Harrach, M. Benkő, M.J. van Raaij // *Viol. J.* – 2015. – V. 12. – P. 81.
118. Okur-Gumusova, S. Seroprevalence of bovine viral respiratory diseases / S. Okur-Gumusova, Z. Yazici, H. Albayrak, D. Cakiroglu // *Acta Veterinaria* – 2007. – V. 57. – P. 11-6.
119. Pardon, B. Prevalence of respiratory pathogens in diseased, non-vaccinated, routinely medicated veal calves / B. Pardon, K. De Bleecker, J. Dewulf, J. Callens, F. Boyen, B. Catry, P. Deprez // *Veterinary Record.* – 2011. – V. 169(11). – P. 278.
120. Pasquale, A.D. Vaccine adjuvants: from 1920 to 2015 and beyond / A.D. Pasquale, S. Preiss, F. Silva, N. Garçon // *Vaccines.* – 2015. – V. 3(2). – P. 320–343.



121. Reed, S.G. Key roles of adjuvants in modern vaccines / S.G. Reed, M.T. Orr, C.B. Fox // *Nature Medicine*. – 2013. – V. 19(12). – P. 1597–1608.
122. Rein, D.T. Current developments in adenovirus-based cancer gene therapy / D.T. Rein, M. Breidenbach, D.T. Curiel // *Future Oncol.* – 2006. – V. 2(1). – P. 137-143.
123. Roshtkhari, F. Serological evaluation of relationship between viral pathogens (BHV-1, BVDV, BRSV, PI-3V, and Adeno3) and dairy calf pneumonia by indirect ELISA / F. Roshtkhari, G. Mohammadi, A. Mayameei // *Tropical animal health and production*. – 2012. – V. 44(5). – P. 1105-10.
124. San Martin, C. Structural studies on adenoviruses / C. San Martin, R.M. Burnett // *Curr Top Microbiol Immunol*. – 2003. – V. 272. – P. 57–94.
125. San Martin, C. Latest insights on adenovirus structure and assembly / C. San Martin // *Viruses*. – 2012. – V. 4(5). – P. 847-77.
126. Sakhaee, E. Serological study of bovine viral respiratory diseases in dairy herds in Kerman province, Iran / E. Sakhaee, M. Khalili, S. Kazemi nia // *Iranian Journal of Veterinary Research*. – 2009. – V. 10(1) – P. 49-53.
127. Sibley, S.D. Detection of Known and Novel Adenoviruses in Cattle Wastes via Broad-Spectrum Primers / Sibley S D, Goldberg T L and Pedersen J A// *Appl. Environ. Microbiol.* – 2011. – V. 77. – P. 5001-8.
128. Smyth, J.A. Examination of adenovirus-types in intestinal vascular endothelial inclusions in fatal cases of enteric disease in cattle, by in situ hybridization / J.A. Smyth, D.A. Moffett, E. van Garderen, J.P. Orr // *Vet. Microbiol.* – 1999. – V. 70. – P. 1–6.
129. Srikumaran, S. Immune evasion by pathogens of bovine respiratory disease complex / S. Srikumaran, C.L. Kelling, A. Ambagala // *Anim. Health Res. Rev.* – 2007. – V. 8(2). – P. 215-29.
130. Tizard, I. R. *Veterinary Immunology*, ninth edition / I.R. Tizard et al. // Elsevier. – 2013. – 568 p.
131. URL: <https://viralzone.expasy.org/>

132. Ursu, K. DNA sequencing and analysis of the right-hand part of the genome of the unique bovine adenovirus type 10 / K. Ursu, B. Harrach, K. Matiz, M. Benko // *Journal of General Virology*. – 2004. – V. 85. – P. 593-601.
133. Vaatstra, B.L. Clinicopathological features of 11 suspected outbreaks of bovine adenovirus infection and development of a real-time quantitative PCR to detect bovine adenovirus type 10 / B.L. Vaatstra, D.J. Tisdall, M. Blackwood, R.A. Fairley // *N. Z. Vet. J.* – 2016. – V. 64(5). – P. 308-13.
134. Valarcher, J.F. Viral respiratory infections in cattle / J.F. Valarcher, S. Hagglund // *Proceedings of XXIVth World Buiatric Congress, France*. – 2006. – P. 384-97.
135. Van der Fels-Klerx, H.J. An economic model to calculate farm-specific losses due to bovine respiratory disease in dairy heifers / H.J. Van der Fels-Klerx, J.T. Sorensen, A.W. Jalvingh, R.B. Huirne // *Prev. Vet. Med.* – 2001. – V. 51. – P. 75-94.
136. Weber, J.M. Adenovirus endopeptidase and its role in virus infection / J.M. Weber // *Curr Top Microbiol Immunol*. – 1995. – V. 199. – P. 227–235.
137. Wegmann, F. The carbomer-lecithin adjuvant adjuplex has potent immunoactivating properties and elicits protective adaptive immunity against influenza virus challenge in mice / F. Wegmann, A. E. Moghaddam, T. Schiffner // *Clinical and Vaccine Immunology*. – 2015. – V. 22(9). – P.1004-1012.
138. Wong, K. Quantitative PCR assays to survey the bovine adenovirus levels in environmental samples / K. Wong, I. Xagorarakis // *J. Appl. Microbiol.* – 2010. – V. 109. – P. 605–612.
139. Woods, L.W. Evaluation of the pathogenic potential of cervid adenovirus in calves / L.W. Woods, H.D. Lehmkuhl, L.A. Hobbs, J.C. Parker, M. Manzer // *J. Vet. Diagn. Invest.* – 2008. – V. 20. – P. 33–37.
140. Xing, L. Identification of cis-acting sequences required for selective packaging of bovine adenovirus type 3 DNA / L. Xing, L. Zhang, J. Van Kessel, Sk. Tikoo // *Journal of General Virology*. – 2003. – V. 84. – P. 2947-56.

141. Yesilbag, K. Prevalence of antibodies to bovine respiratory viruses in cattle infected with bovine immunodeficiency virus / K. Yesilbag, Z. Yilmaz, B. Güngör // Veterinary Record. – 2008. – V. 162. – P. 660-1.
142. Zhu, Yuan-Mao Isolation, identification, and complete genome sequence of a bovine adenovirus type 3 from cattle in China / Zhu Yuan-Mao, Yu Zuo, Cai Hong, Gao Yu-Ran, Dong Xiu-Mei, Li Zhao-Li, Shi Hong-Fei, Meng Qing-Feng, Lu Chuang, Xue Fei // Virology Journal. – 2011. – V. 8. – P. 557.

### 14. Приложения.

К диссертационной работе прилагаются следующие копии документов:

| №  | Документ                                                                                                                                                                                                                                                            | Стр. |
|----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1. | Удостоверение о депонировании в Государственную коллекцию вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России авторского штамма «Альфа» аденовируса КРС I-го типа                                                     | 133  |
| 2. | Регистрационное удостоверение «Вакцины инактивированной комбинированной против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота-, коронавирусной болезней и аденовирусной инфекции крупного рогатого скота (КОМБОВАК-А)» | 134  |



## Государственная Коллекция Вирусов

123098, Москва, ул. Гамалеи, 16  
Тел.: (499) 1903060, (499) 2777820 Факс.: (499) 2777819  
<http://www.viruscollection.ru> E-mail: [info@viruscollection.ru](mailto:info@viruscollection.ru)

31 января 2013

## УДОСТОВЕРЕНИЕ

НАСТОЯЩЕЕ выдано в том, что в Государственную коллекцию вирусов 31 января 2013 года депонирован оригинальный авторский штамм «Альфа» аденовируса крупного рогатого скота I-го типа, выделенный в 2011 г из смыва носовой полости больного теленка в возрасте 17 суток. Штамм прошел 27 пассажей и поддерживается в перевиваемой культуре клеток почки теленка (MDBK). Цитопатогенное действие проявляется на 5-7 сутки культивирования.

Штамм хранится в лиофилизированном виде. Расфасован 19.12.2012 г.  
Инфекционная активность 6,5 lg ТЦД<sub>50</sub>/мл.

Штамму присвоен номер депонента ГКВ № 2732

Штамм не контаминирован бактериальной и грибной микрофлорой, микоплазмами, посторонними вирусами

Авторами штамма являются: Шемелькова Г.О., Корицкая М.А., Алипер Т.И.; Верховский О.А..

Директор ФГБУ НИИ вирусологии  
им.Д.И.Ивановского Минздрава РФ,  
академик РАНН



 Д.К.Львов

Заведующий Государственной коллекцией  
вирусов, профессор, д.м.н.

 П.Г.Дерябин





**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВETERИНАРНОМУ И ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ**

**Регистрационное удостоверение  
лекарственного препарата для ветеринарного применения**

№ **005086**

Номер регистрационного удостоверения:  
**77-1-14.18-4278 №ПВР-1-35.13/02985**

Дата государственной регистрации: « 23 » января 2019 г.

Наименование и адрес держателя или владельца регистрационного удостоверения  
лекарственного препарата: ООО "Ветбиохим" Российская Федерация, 123098, г.  
Москва, Гамалеи ул., д. 16

Наименование и адрес юридического лица - разработчика лекарственного препарата:  
ООО "Ветбиохим" Российская Федерация, 123098, г. Москва, Гамалеи ул., д. 16

Торговое наименование лекарственного препарата: **КОМБОВАК-А**

Международное непатентованное, или группировочное, или химическое  
наименование лекарственного препарата: Вакцина инактивированная комбинированная  
против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи,  
респираторно-синцитиальной, рота-, коронавирусной болезней и аденовирусной инфекции крупного  
рогатого скота - КОМБОВАК-А

Лекарственная форма: **эмульсия для инъекций**

Дозировка: **10 мл (5 доз), 100 мл (50 доз)**

Регистрационное удостоверение выдано бессрочно, со сроком действия 5 лет  
(нужное подчеркнуть)

Заместитель Руководителя  
(должность)



Н.А. Власов  
(Ф.И.О.)

М.П.