

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»

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2021

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН).

Научный руководитель:

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

Официальные оппоненты:

Глотова Татьяна Ивановна – доктор биологических наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Сибирский федеральный центр агробιοтехнологий Российской академии наук, главный научный сотрудник.

Шмаров Максим Михайлович – доктор биологических наук, Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи" Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий лабораторией молекулярной биотехнологии.

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина»

Защита диссертации состоится «___» _____ 2021 г. в «___» часов на заседании диссертационного совета Д 006.033.02 на базе ФГБНУ «Федеральный научный центр - Всероссийский научно-исследовательский институт экспериментальной ветеринарии имени К.И. Скрябина и Я.Р. Коваленко Российской академии наук» (ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН) по адресу: 109428, г. Москва, Рязанский проспект, д. 24, корп. 1, тел.: +7 (495) 970-03-67.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБНУ ФНЦ ВИЭВ РАН и на сайте <http://www.viev.ru>.

Автореферат разослан «___» _____ 2021 г.

Учёный секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Ездакова Ирина Юрьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ.

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 (Львов Д.К. с соавт., 2013; Venko M., 2008).

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 (Белоусова Р.В. с соавт., 1989; Строганова И.Я с соавт., 2011; Allard A. et al., 2001; Brogden K.A. et al., 2002; Valarcher J.F. et al., 2006).

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 (Бессарабов Б.Ф. с соавт., 2007).

Одним из факторов, осложняющих диагностику аденовируса крупного рогатого скота, является большое количество его типов, характеризующихся генетическим разнообразием. В настоящий момент классифицировано 11 ти-

пов аденовируса крупного рогатого скота, относящихся к родам *Mastadenovirus* и *Atadenovirus* (Harrach B. et al., 2011).

Современным методом, позволяющим быстро и достоверно установить наличие любого возбудителя в исследуемом материале является - обнаружение ДНК при помощи полимеразной цепной реакции. Особенно часто её применяют при осуществлении мониторинга биозагрязненности окружающей среды и для выявления источников аденовируса. 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 (Maluquer C.M. et al., 2004; Sibley S.D. et al., 2011).

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, манхемией, 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 (Глотов А.Г. с соавт., 2010; Constable P.D. et al., 2017). 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 (Юров К.П. с соавт., 2010; Гулюкин М.И. с соавт., 2007). 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 инактивированные вакцинные препараты, которые содержат два обязательных

компонента: антиген (смесь антигенов), отвечающий за специфичность иммунного ответа и адъювант, отвечающий за силу и продолжительность этого ответа (Сергеев В.А. с соавт., 2007). 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 (Apostolico J. et al., 2016; Pasquale A.D., 2015).

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 (Белоусова Р.В. с соавт., 2007; Лобова Т.П., 2006;).

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 адьювантов 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 адьюванта. 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 полиэлектролита (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-, корона-вирусной болезнью 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 семикомпонентной

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 поливалентной вакцины, содержащей аденовирусный компонент и новый адъювант. Экспериментально установлена безвредность, антигенная и иммуногенная активность препарата для лабораторных и естественно-восприимчивых животных и возможность его использования для формирования колострального иммунитета у телят. Установлено, что применение разработанного вакцинного препарата в условиях животноводческого хозяйства, неблагоприятного 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), полу-

ченые 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 свиней 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, 2010-2019 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, в том числе 1 работа в журнале, индексируемом в базе SCOPUS.

Объем и структура 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, 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 том числе 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 адьювантов в составе инактивированной 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.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ.

1. Материалы и методы. В работе использовали перевиваемые культуры клеток почки теленка Т-1 и MDBK; питательную среду ДМЕМ; вак-

цинные штаммы вирусов: «Т» вируса ИРТ, «BC-05» вируса ПГ-3, «Т-04» вируса ВД, «ТИ» вируса РС, «К-88» ротавируса, «KB-90» коронавируса, «Альфа» аденовируса (АВ) КРС I-го типа. Накопление вирусов оценивали по цитопатическому действию, инфекционную активность (титр) вирусов вычисляли по методу Рида и Менча и выражали в lg ТЦД₅₀/мл. В работу брали вирусы с инфекционной активностью не менее: ИРТ –7,0 lg, ВД – 6,5 lg, ПГ-3 – 7,0 lg, РС – 5,5 lg, РВ – 6,5 lg, KB –5,5 lg, АВ – 6,0 lg.

В работе использовали **адьюванты:** MONTANIDE ISA 50, ISA 61, ISA 70, ISA 71, ISA 206, ISA 773; синтетический полиэлектролит (карбомер) со смесью поверхностно-активных гликозидов; гидроокись алюминия (ГОА) с добавлением сапонины; комплексный адьювант из липосом и сапонины (IS-COM); полисахаридные грибные и растительные адьюванты.

Выделение аденовирусных изолятов проводили, исследуя смывы с конъюнктивы глаза и слизистой носовой полости от телят 2-4 недельного возраста с характерной клинической картиной острых респираторных заболеваний. Смывы центрифугировали, смешивали с антибиотиками и антимикотиками, проводили стерилизующую фильтрацию, добавляли смесь ГИС от морских свинок, содержащие вируснейтрализующие антитела к вирусам ИРТ, ПГ-3, ВД, РС, РВ и KB КРС и заражали культуру клеток Т1. Для каждой пробы проводили 4 слепых пассажа, затем их идентифицировали в РН и методом ПЦР с последующим секвенированием фрагмента генома.

Выделение ДНК вируса осуществляли с использованием коммерческого набора для выделения ДНК, производства ООО «Ветбиохим» (РФ). Для **проведения ПЦР** использовали набор «High Fidelity PCR Enzyme mix» («Fermentas», Литва) с применением праймеров, фланкирующих фрагмент генома, кодирующего гексон АВ КРС (Maluquer С.М. et al., 2004). Выявление продуктов ПЦР осуществляли методом горизонтального электрофореза. 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 секве-

нирование полученных в ПЦР фрагментов ДНК. **Секвенирование** проводили по методу Сэнгера, с использованием указанных праймеров и флюоресцентно-меченых терминирующих нуклеотидов на автоматическом секвенаторе ABI Prism3130 («Applied Biosystems», США).

Для определения **оптимального времени культивирования клеточной культуры до заражения** выделенным штаммом аденовируса КРС заражали 24-, 48-, 96-часовые культуры клеток MDBK. Объем и концентрация вносимого вируса во всех случаях были идентичны, культивировали при температуре $37\pm 1^\circ\text{C}$, визуально оценивая цитопатическое действие вируса.

Для установления **оптимальной инфицирующей дозы** проводили заражение 48 часовой культуры клеток MDBK, выращенной в культуральном матрасе площадью 75 см^2 . Для инокуляции использовали вирусосодержащую суспензию с инфекционной активностью от 10^4 до 10^7 ТЦД₅₀/мл, в объеме 1 мл на один матрас, добавляли поддерживающую среду в объеме 35 мл.

Для определения **оптимальной продолжительности культивирования** аденовируса использовали несколько матрасов с 48 часовой культурой клеток MDBK, которые одномоментно заражали одинаковой дозой вируса. Через 48 ч. и далее каждые 24 ч. прекращали культивирование одного из матрасов и определяли инфекционную активность полученного вируса.

Для **разработки тест-системы ПЦР** использовали штамм «Альфа» аденовируса КРС, носовые и глазные смывы от телят. Оценку специфичности тест-системы проводили с использованием указанных выше штаммов вирусов ВД, ИРТ, ПГ-3, РС, РВ и КВ КРС, а также бактериальных штаммов *P. multocida* типов А, В, D; *M. Haemolytica*; *E.coli* серогруппы O101 и O141. Подбор праймеров осуществляли с использованием программы Primer premier 6.25 (PREMIER Biosoft International, США) на основании анализа нуклеотидных последовательностей разных типов аденовируса КРС, представленных в информационной базе данных GenBank. Амплифицированные фрагменты ДНК выделяли из геля с использованием набора для очистки ПЦР-продуктов Silica Bead DNA Gel Extraction Kit (ThermoScientific, USA).

Рекомбинантные плазмиды для оценки чувствительности тест-системы конструировали с использованием векторной системы клонирования продуктов ПЦР pGEM T-Easy (Promega, США). Корректность конструирования плазмид и соответствие встроенных фрагментов ДНК ВAdV-1 или ВAdV-8 (АВ КРС I-го или VIII-го типов) проверяли секвенированием по Сэнгеру.

В ходе **серологического мониторинга** использовали пробы сыворотки крови КРС, полученные от невакцинированных животных из животноводческих хозяйств субъектов РФ. Распространенность аденовируса КРС среди поголовья оценивали, исследуя смывы из носовой полости и с конъюнктивы глаза от телят и взрослых животных методом ПЦР. Часть проб, давших положительный результат, идентифицировали секвенированием по Сэнгеру.

Оценку **безвредности и антигенной активности** образцов семикомпонентной вакцины, изготовленных с разными адъювантами, проводили на:

- морских свинок (n=10), которых вакцинировали в/м, в дозе 1,0 мл, однократно, кровь брали до и через 21 сутки после вакцинации;
- коровах до осеменения (n=30), которых вакцинировали в/м в дозе 3,0 мл двукратно с интервалом 21 сутки, кровь брали выборочно у 10 голов из каждой группы перед вакцинацией (D₀) и через 21 сутки после первой (D₂₁) и второй иммунизаций (D₄₂).

За всеми животными наблюдали, отмечая общую и местную реакцию.

Для **определения оптимальной иммунизирующей дозы** вакцины использовали три группы коров (n=15 в каждой) за 1-2 месяца до осеменения, которых вакцинировали в/м двукратно с интервалом 21 сутки в дозах 2,0 мл, 3,0 мл и 4,0 мл. А также две группы телят (n=15 в каждой) в возрасте 2,5-3 месяца, которых иммунизировали двукратно в/м в дозах 1,0 мл и 2,0 мл. Кровь у всех животных брали перед вакцинацией (D₀) и через 21 сутки после второй иммунизаций (D₄₂). В качестве контроля использовали группы не вакцинированных животных (по 10 голов коров и телят).

Оценку напряженности **колострального иммунитета и эффективности** применения вакцины проводили в животноводческом хозяйстве, небла-

гополучном по респираторным и кишечным инфекционным заболеваниям телят, в том числе где были выявлены вируснейтрализующие антитела к аденовирусу КРС. Стельных коров вакцинировали дважды: за 50-60 суток до отела, повторно через 14-21 сутки, в дозе 3,0 мл. Полученных телят первый раз вакцинировали в 25-30 суток, повторно через 20-25 суток, в дозе 2,0 мл. В качестве контроля использовали группы невакцинированных животных. **Эффективность** применения вакцины определяли по эпизоотологическим и хозяйственным показателям: заболеваемость телят респираторными и кишечными инфекциями, смертность телят, а также их вынужденная выбраковка.

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с использованием программ Microsoft Office Excel 2010 (Microsoft, США), StatPlus 2009 (AnalystSoft Inc., США).

2. Выделение и идентификация полевого изолята аденовируса КРС. Оптимизация технологии его культивирования, оценка биологических свойств. Отработка методов инаktivации. Изучение антигенных свойств. При исследовании 174 полевых проб (смывы от телят) в культуре клеток Т1, были выделены 4 изолята, один из которых в РН и методом ПЦР с использованием специфических праймеров (Maluquer С.М. et al., 2004), был определен как условно-положительный на аденовирус КРС. В дальнейшем методом секвенирования фрагмента генома размером 644 п.н. и последующего филогенетического анализа было установлено, что выделенный изолят относится к первому типу аденовируса КРС (род *Mastadenovirus*).

Выделенный штамм АВ КРС I типа (ВAdV-1) использовали для заражения перевиваемой культуры клеток MDBK. Всего провели 27 пассажей, которые сопровождались характерной микрокартиной цитопатических изменений в культуре клеток, рисунок 1.

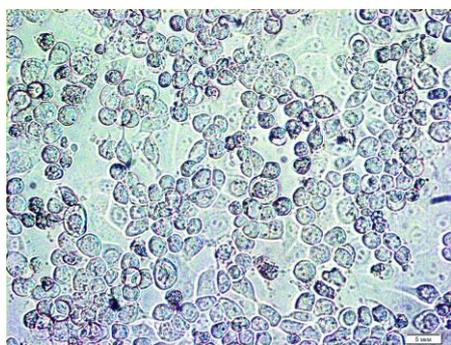


Рисунок 1.
Цитопатические изменения в культуре клеток MDBK, вызванные выделенным аденовирусом КРС

В ходе проведенных культуральных исследований установили, что:

- наиболее подходящее время культивирования клеточной культуры MDBK для заражения выделенным штаммом АВ КРС составляет 48 ч.;
- оптимальная заражающая доза АВ КРС на матрас с 48 часовой культурой, площадью 75 см² составляет 1 мл – 10^{6,0} ТЦД₅₀/мл, что соответствует 1,5 ТЦД₅₀ на одну клетку;
- оптимальное время после заражения, позволяющее получить максимальное накопление вируса в суспензии составляет 120±4 часов;
- заражение культуры клеток с проведением «контакта» позволяет повысить активность получаемого вируса на 0,5-0,77 lg.

В результате проведенных работ по адаптации и последующей оптимизации условий культивирования удалось получить вирусосодержащую суспензию с инфекционной активностью 7,23-7,5 lg ТЦД₅₀/мл. Выделенный штамм аденовируса КРС I-го типа получил название «Альфа».

При отработке способов инактивации штамма «Альфа» были определены следующие эффективные режимы (при температуре 37±1°C): формалин (0,3 % при времени экспозиции - 72 ч.); димерэтиленмин (0,2 % - 24 ч.); β-пропиолактон (0,3 % - 48 ч). Для дальнейшей работы мы выбрали формалин.

Для изучения антигенных свойств выделенного АВ КРС изготовили 4 образца моновакцины с разным содержанием количества вирусной суспензии и двумя разными адьювантами: неполным адьювантом Фрейнда (НАФ) и ГОА, которые оценивали в опыте на морских свинках и телятах (n=5 и n=7 соответственно на каждый образец). Исследования показали, что все образцы обладали выраженной антигенной активностью и вызывали выработку специфических вируснейтрализующих антител у морских свинок и телят. Наиболее антигенно-активными были образцы на основе НАФ.

3. Разработка родоспецифичной тест-системы ПЦР для выявления ДНК аденовируса КРС. Поскольку классифицировано большое количество типов аденовируса КРС, относящихся к родам *Mastadenovirus* и *Atadenovirus*, мы решили использовать гнездовой вариант ПЦР. Для проведения первой

амплификации использовали праймеры, общие для всех типов аденовируса КРС (BALF и BARF) (Maluquer C.M. et al., 2004), а для проведения второй – индивидуальные пары для каждого рода (Mast-F + Mast-R и At-F + At-R), таблица 1.

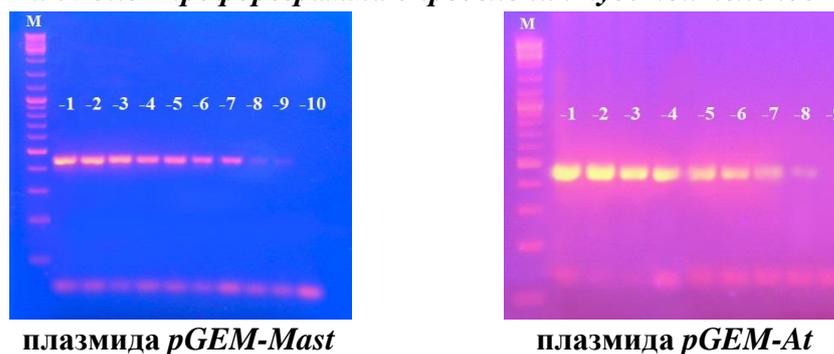
Таблица 1. Набор праймеров, для выявления ДНК аденовируса КРС

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

Для оптимизации условий проведения ПЦР и оценки чувствительности сконструировали две рекомбинантные плазмиды: pGEM-Mast и pGEM-At, с использованием культурального АВ КРС - ВAdV-1 (род *Mastadenovirus*) и полевого (полевая проба) АВ КРС - ВAdV-8 (род *Atadenovirus*).

В ходе проведенной работы мы подобрали оптимальные температурно-временные режимы для всех стадий реакции. Чувствительность тест-системы составила $5,4 \times 10^3$ мол/мкл для рода *Mastadenovirus* и $4,3 \times 10^3$ мол/мкл для рода *Atadenovirus*, рисунки 2 и 3.

Рисунки 2 и 3. Электрофореграмма определения чувствительности ПЦР



М - маркер молекулярной массы ДНК; (-1) – (-10) / (-9) - последовательные десятикратные разведения соответствующей рекомбинантной плазмиды.

Специфичность тест-системы проверяли, используя панель образцов, содержащую, наиболее часто встречающиеся вирусные и бактериальные патогены, вызывающие заболевания со сходной клинической картиной, носовые смывы, полученные от клинически здоровой коровы, незараженные культу-

ры клеток Т1 и MDBK. В качестве положительного контроля использовали пробы, содержащие ДНК аденовируса ВAdV-1 и ВAdV-8. Результаты показали 100% специфичность, разработанной тест-системы в отношении к использованной панели образцов. В последующем данную тест-систему использовали для исследования полевых проб материала – носовых и глазных смывов от телят с клинической картиной респираторных заболеваний.

4. Изучение эпизоотической ситуации по основным респираторным и желудочно-кишечным заболеваниям телят вирусной этиологии в хозяйствах РФ. В ходе серомониторинга исследовали 1255 проб сыворотки крови от невакцинированных коров и телят из 15 хозяйств 8 субъектов РФ, неблагополучных по респираторным и кишечным инфекционным заболеваниям телят. В результате выявили наличие специфических антител к возбудителям: АВ КРС I типа (род *Mastadenovirus*) в 26% исследуемых проб, ИРТ- в 50%, ПГ-3 - в 83%, ВД - в 87%, РС - в 60%, РВ - в 83%, КВ - в 84%, рис. 4.

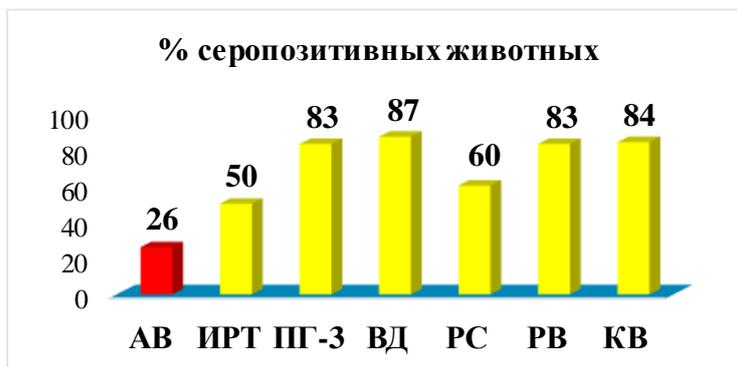


Рисунок 4.
Количество положительных проб сыворотки крови КРС к вирусам в РН

При оценке распространенности аденовирусов КРС, циркулирующих на территории РФ исследовали 124 полевые пробы (носовые и глазные смывы от телят с характерной клинической картиной) 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 5.

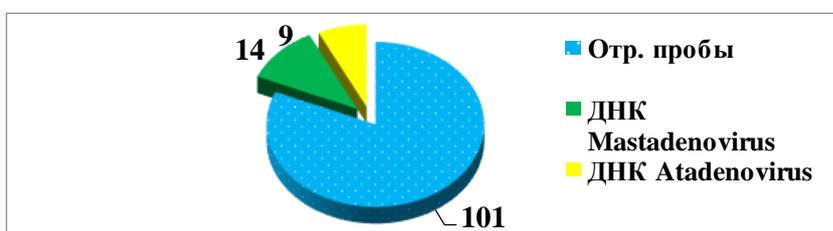


Рисунок 5.
Обнаружение ДНК аденовируса КРС в полевых пробах

Часть проб, давших положительный результат, подвергли частичному геномному секвенированию. Сравнительный анализ полученных результатов с нуклеотидными последовательностями разных типов аденовируса КРС, представленных в базе данных GenBank показал присутствие 1 (республика Мордовия), 3 (Тамбовская обл.), 6 (Московская обл.), 8 (Воронежская обл.) типов аденовируса КРС среди положительных образцов, рисунок 6.

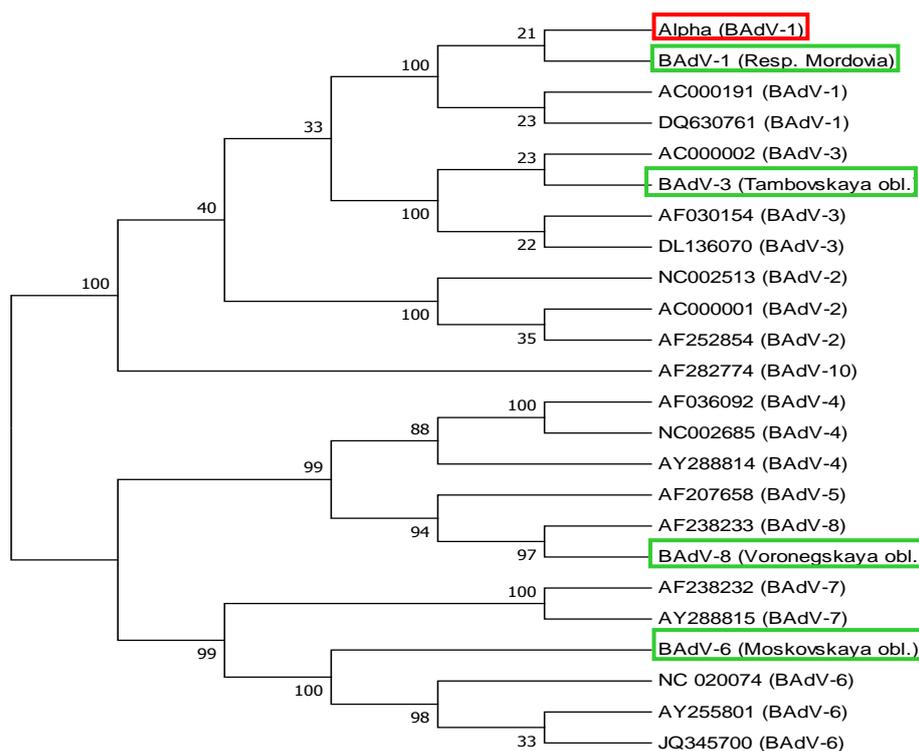


Рисунок 6.
Филогенетический анализ изолятов аденовируса КРС разных типов на основе фрагмента генома (431 и 432 п.н.), кодирующего гексон, обнаруженных во время проведенных исследований

Обнаруженные в ходе исследований типы аденовируса КРС выделены зеленой рамкой, выделенный ранее штамм аденовируса КРС *Alpha* выделен красной рамкой.

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

5. Разработка инактивированной комбинированной вакцины против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота-, коронавирусной болезней и аденовирусной инфекции крупного рогатого скота КОМБОВАК-А. С учетом проведенных исследований и литературных данных, мы посчитали целесооб-

разным создание комбинированной вакцины против основных респираторных и кишечных вирусных заболеваний телят, включающей в себя аденовирус КРС. В качестве прототипа использовали вакцину «КОМБОВАК», производства ООО «Ветбиохим». В новой вакцине было увеличено количество вирусных антигенов, что потребовало найти более эффективный адъювант, способный обеспечить выраженный иммунный ответ на каждый из них.

В ходе первоначально проведенных экспериментов были исследованы одиннадцать новых готовых и экспериментальных адъювантов: ISA 50, ISA 61, ISA 70, ISA 71, ISA 206, ISA 773, ГОА с добавлением сапонины, ISCOM, грибные и растительные полисахаридные адъюванты, карбомер со смесью поверхностно-активных гликозидов. Оценку вели по параметрам: антигенная активность (на лабораторных животных), безвредность и местная реактогенность, технологичность изготовления, вязкость вакцины, стабильность в процессе хранения, качество эмульсии (для эмульгированных образцов). Для этого с каждым адъювантом изготовили образцы трехкомпонентной вакцины с использованием инактивированных вирусов ИПТ, ВД и АВ КРС.

По результатам исследований, для дальнейшей работы отобрали семь наиболее перспективных адъювантов: ISA 50, ISA 61, ISA 71, ISA 206, ISA 773, карбомер со смесью поверхностно-активных гликозидов и ГОА с добавлением сапонины, с которыми изготовили экспериментальные образцы семи-компонентной вакцины против инфекционного ринотрахеита, парагриппа-3, вирусной диареи, респираторно-синцитиальной, рота-, коронавирусной болезни и аденовирусной инфекции крупного рогатого скота. Оценку образцов проводили по показателям безвредность и антигенная активность.

Все образцы вакцины не вызывали заболевания или гибели животных, но у отдельных особей наблюдали образование плотных ограниченных припухлостей на месте введения образцов с масляными адъювантами.

В опытах на лабораторных и естественно-восприимчивых животных установили, что введение всех образцов вакцины вызывало развитие выраженного иммунного ответа. При этом разные типы адъювантов оказывали

неодинаковый иммуностимулирующий эффект, что выразилось в различном уровне содержания специфических антител ($P < 0,02$), таблицы 2 и 3.

Таблица 2. Сравнительная оценка антигенной активности семикомпонентной вакцины с разными адьювантами в опыте на лабораторных животных

| № п/п | Адьювант | Титр антител к вирусу* | | | | | | |
|-------|--------------------|------------------------|-----|-----|------|----|-----|-----|
| | | АВ | ИРТ | ВД | ПГ-3 | РС | РВ | КВ |
| 1 | ГОО+ 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 |

* здесь и далее приведены среднегеометрические титры по группе вируснейтрализующих антител у морских свинок после вакцинации, до вакцинации антител обнаружено не было.

Таблица 3. Сравнительная оценка антигенной активности семикомпонентной вакцины с разными адьювантами в опыте на крупном рогатом скоте

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

Самой высокой антигенной активностью в опытах на лабораторных и естественно-восприимчивых животных обладали образцы вакцины, изготовленные на основе адьювантов ISA 50, ISA 61 и ISA 71 ($P < 0,02$). Остальные образцы были менее эффективны. На основе анализа полученных данных, а также ряда дополнительных показателей, полученных в ходе предыдущих исследований, в качестве адьюванта для дальнейшей работы был выбран масляный адьювант ISA 61.

Опыты по определению оптимальной иммунизирующей дозы вакцины показали, что она составляет для коров - 3,0 мл, для телят - 2,0 мл.

При изучении влияния разработанной вакцины на формирование колострального иммунитета и оценки эффективности ее применения в хозяйстве 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). В каждой группе (вакцинированной и контрольной) были выбраны по 10 голов животных у которых брали кровь до вакцинации (D₀), через 14-21 сутки (I) после первой вакцинации (во время проведения второй вакцинации) и сразу после отела (II). У контрольных животных брали пробы крови в тоже время, что и у вакцинированных. Кровь у телят, полученных от выбранных коров брали в первые 24-48 часов после рождения, обязательно отслеживая своевременную выпойку молозива, таблица 4.

Таблица 4. Результаты оценки колострального иммунитета.

| № п/п | Адьювант | Срок исслед. | Титр антител к вирусу | | | | | | |
|-------|--------------------------|----------------|-----------------------|-----|-----|------|----|-----|-----|
| | | | АВ | ИРТ | ВД | ПГ-3 | РС | РВ | КВ |
| 1 | Вакцинированные коровы | D ₀ | 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 | Невакцинированные коровы | D ₀ | 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 |

Полученные результаты свидетельствуют о том, что двукратная вакцинация стельных коров вызывает образование специфических антител к соответствующим возбудителям, которые затем с молозивом передаются телятам, тем самым обеспечивая формирование колострального иммунитета. Невакцинированные животные не смогли обеспечить формирование колострального иммунитета у потомства на приемлемом уровне (P<0,01).

При оценке эффективности применения вакцины 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% соответственно.

Таким образом, 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.

Заключительным этапом разработки вакцины стала оценка стабильности ее физических и иммунобиологических свойств в процессе длительного хранения при температуре 2-8°C на основании которой был установлен срок годности препарата – 18 месяцев.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.

По результатам проведенной работы были сделаны следующие 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 диарее 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 $7,5 \text{ lg TЦД}_{50}/\text{мл}$. Показана возможность его использования в качестве вакцинного штамма, при производстве инактивированных

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 ГКВ № 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 адьювантов для включения в состав многокомпонентной вакцины, показало, что наиболее иммунологически эффективным и безопасным является адьювант ISA 61.

6. Установлена безвредность и антигенная активность семикомпонентной инактивированной 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 инактивированной 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%.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ.

Материалы проведенных исследований вошли в следующие нормативные документы:

- СТО и 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 болезни 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 (утвержденная Россельхознадзором 20 сентября 2018 года); Промышленный регламент 76418883-01-004-2018 производства вакцины «КОМБОВАК-А».

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.

1. Шемелькова Г.О., Шемельков Е.В., Южаков А.Г., Соболева Г.Л., Корицкая М.А., Иванов Е.В., Алипер Т.И. Выделение и изучение биологических свойств аденовируса крупного рогатого скота I-го типа // Ветеринария.- 2013.- №4.- С. 8-11

2. Шемелькова Г.О. Верховская А.Е., Соболева Г.Л., Шемельков Е.В., Иванов Е.В., Непоклонова И.В., Алипер Т.И. Специфическая профилактика аденовирусной инфекции крупного рогатого скота с использованием комбинированной вакцины // Ветеринария Кубани.- 2013.- №3.- С. 3-5

3. Шемелькова Г.О., Алипер Т.И. Сравнительная оценка эффективности разных типов адьювантов в составе вакцины против респираторных болезней телят // Труды ВИЭВ том 77.- М., 2013.- 204-208с.

4. Шемелькова Г.О., Южаков А.Г., Забережный А.Д., Шемельков Е.В., Алипер Т.И. Разработка тест-системы для обнаружения ДНК аденовируса КРС на основе полимеразной цепной реакции // IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science 315 (2019) 042027 doi:10.1088/1755-1315/315/4/042027.