

ИЗУЧЕНИЕ БЕЗВРЕДНОСТИ РАЗЛИЧНЫХ ВАРИАНТОВ АССОЦИИРОВАННОЙ ВИРУСНО-БАКТЕРИАЛЬНОЙ ВАКЦИНЫ

КРАСОЧКО П. А., КРАСОЧКО П.П., ИВАЩЕНКО И. А.

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»,
г. Витебск, Республика Беларусь

Целью исследований явилось изучение безвредности различных вариантов поливалентной ассоциированной инактивированной культуральной вирусно-бактериальной вакцины против инфекционного ринотрахеита (ИРТ), вирусной диареи (ВД), парагриппа-3 (ПГ-3), респираторно-синцитиальной инфекции (РС) и пастереллезов молодняка крупного рогатого скота. Установлено, что введение различных вариантов вакцин мышам и морским свинкам показало их безвредность и ареактогенность.

Ключевые слова: вакцина, инактивант, адъювант, пастереллез, вирус, культура клеток, телята.

HARMLESSNESS STUDY OF DIFFERENT VARIANTS OF THE ASSOCIATED VIRUS-BACTERIAL VACCINE

KRASOCHKO P.A., KRASOCHKO P.P., IVASHCHENKO I.A.

EI "Vitebsk Order of the Badge of Honor State Academy of veterinary medicine",
Vitebsk, Republic of Belarus

The aim of the research was to study the harmlessness of different variants of poly-valent associated inactivated culture virus-bacterial vaccines against infectious rhinotracheitis (IRT), viral diarrhea (VD), parainfluenza-3 (PG-3), respiratory syncytial infection (RS) and pasteurellosis of young cattle. It was found that administration of different vaccine variants to mice and guinea pigs showed their harmlessness and areactogenicity.

Keywords: Vaccine, inactivant, adjuvant, pasteurellosis, virus, cell culture, calves.

Введение. В современных условиях ведения животноводства вирусные пневмоэнтериты новорожденных телят широко регистрируются практически во всех хозяйствах страны. Они причиняют животноводству большой экономический ущерб, обусловленный снижением продуктивности у заболевших животных, расходами на их лечение, проведения комплекса противозооэпизоотических мероприятий, высоким уровнем падежа телят.

В структуре заболеваний крупного рогатого скота инфекции молодняка вирусной этиологии занимают одно из ведущих мест. При традиционной технологии ведения скотоводства на долю этих болезней приходится 34,1–47%, а при промышленной – свыше 60% всех случаев заболевания молодняка. Наиболее часто регистрируются заболевание и падеж телят, возбудителями которых являются инфекционный ринотрахеит, вирусная диарея, парагрипп-3, респираторно-синцитиальная, рота- и коронавирусная инфекция, пастереллы, сальмонеллы, эшерихии крупного рогатого скота, и они зачастую протекают в ассоциации. Указанные болезни характеризуются высоким уровнем распространения и заболеваемости, которая в зависимости от условий кормления и содержания животных в первые дни жизни колеблется от 30 до 90%, а летальность составляет от 10,0 до 60,0%.

Проведенными ранее исследованиями установлено, что у коров инфекционный ринотрахеит встречается у 61–65% обследованных животных, вирусная диарея у 80–85%, ротавирусная инфекция у 75–80%, респираторно-синцитиальная инфекция у 45–55%, коронавирусная инфекция у 65–70%, парагрипп-3 у 65–74% телят. При этом в основном заболевания протекают в виде ассоциаций, течение которых более тяжелое.

Респираторные инфекции чаще протекают как смешанные вирусные и вирусно-бактериальные инфекции, отличающиеся особенно злокачественным течением, которое трудно

диагностировать, так как вторичная бактериальная инфекция «маскирует» первичное вирусное заболевание.

Болеют телята от 30 до 90-дневного возраста, но массовые вспышки респираторных инфекций в основном возникают среди молодняка 30-45-дневного возраста, спустя 5-7 дней после перевода их из профилактория в группу доращивания. Большая концентрация разновозрастных телят на ограниченной территории, неудовлетворительные ветеринарно-зооигиенические условия содержания, неполноценное кормление и различные стресс-факторы способствуют массовому заражению за короткое время восприимчивого поголовья животных.

Вышеуказанные болезни характеризуются лихорадкой, катаральным воспалением слизистых оболочек органов дыхания, сильным кашлем, потерей аппетита, угнетением, обезвоживанием, поражением легких.

В современных условиях наиболее эффективным средством борьбы с вышеуказанными болезнями молодняка крупного рогатого скота является применение вакцинации. Учитывая тот факт, что в хозяйствах в основном болезнь протекает в виде смешанных инфекций, применение многокомпонентных ассоциированных вакцин оправдано и широко используется.

Классическая технология изготовления противовирусных вакцин состоит из следующих этапов: накопление вирусов – монокомпонентов вакцины на культуре клеток; определение инфекционной и антигенной активности каждого из вирусов; инактивация вирусов; составление вакцины; внесение адъюванта; фасовка, этикетировка и контроль.

Одним из наиболее важных и ответственных этапов при изготовлении вакцин является накопление вирусов. Однако не все вирусы накапливаются в высоких титрах в культуре клеток. Так, если вирусы инфекционного ринотрахеита, диареи и ротавирусы могут накапливаться до титра 7,5-8,5 lg ТЦД 50/мл, что достаточно для изготовления вакцин, то репродукция таких вирусов, как вирус парагриппа-3, респираторно-синцитиальный и коронавирус не всегда высокая и после культивирования их титр часто не достигает и 4,5 lg ТЦД 50/мл, что требует концентрирования вирусосодержащего материала для получения высокоактивной вакцины.

В этой связи для повышения эффективности вакцин с целью замены вирусов, имеющих невысокий выход вирусной массы в последние годы используется генно-инженерные технологии. Их используют как для получения рекомбинантных антигенов, которые могут быть компонентами ассоциированных вакцин.

Учитывая тот момент, что респираторно-синцитиальный вирус накапливается на культуре клеток с невысоким титром (до 4,5 lg ТЦД 50/мл), возникла необходимость замены его рекомбинантным антигеном. В ГНУ «Институт микробиологии НАН Беларуси» совместно с учеными УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», проведены исследования по конструированию рекомбинантного штамма *Escherichia coli* – продуцента белка F1 респираторно-синцитиального вируса крупного рогатого скота путем создания новой плазмиды, несущей ген F1, кодирующий белок F1 вируса.

При проведении исследований проведены исследования по конструированию поливалентной ассоциированной инактивированной культуральной вирусно-бактериальной вакцины против инфекционного ринотрахеита (ИРТ), вирусной диареи (ВД), парагриппа-3 (ПГ-3), респираторно-синцитиальной инфекции (РС) и пастереллезов молодняка крупного рогатого скота с заменой культурального РС-вируса рекомбинантным антигеном.

Целью исследований явилось изучение безвредности различных вариантов поливалентной ассоциированной инактивированной культуральной вирусно-бактериальной вакцины против инфекционного ринотрахеита (ИРТ), вирусной диареи (ВД), парагриппа-3 (ПГ-3), респираторно-синцитиальной инфекции (РС) и пастереллезов молодняка крупного рогатого скота.

Материалы и методы исследований. Исследования проводились в условиях кафедры эпизоотологии и инфекционных болезней, отраслевой лабораторией ветеринарной биотехнологии и заразных болезней животных УО ВГАВМ совместно с ОАО «БелВитунифарм».

Для конструирования вирусно-бактериальной вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, респираторно-синцитиальной инфекции и

пастереллезов молодняка крупного рогатого скота использовали следующие авирулентные штаммы вирусов:

- инфекционного ринотрахеита (ИРТ-ВБФ-ВГАВМ №404);
- диареи (ВД-ВБФ-ВГАВМ №406);
- парагриппа-3 (ПГ-ВБФ-ВГАВМ №403);
- респираторно-синцитиального вируса (РСВ-ВБФ-ВГАВМ №405);
- рекомбинантный штамм кишечной палочки продуцента белка F1 респираторно-синцитиального вируса;
- штаммы *P. Multocida* (793 и 1231) и *M. haemolytica*.

Накопление авирулентных вакцинных штаммов вирусов проводили с использованием общепринятых вирусологических методов на культуре клеток MDBK (клеток монослоя почек быка). Для инактивации вирусов компонентов конструируемой вирус-вакцины были использованы следующие инактиваны – формалин в 0,3% и теотропин в 0,3% концентрации. Накопление *M. haemolytica* и *P. Multocida* проводили на бульоне Хоттингена. Для инактивации *M. haemolytica* и *P. Multocida*, также использовали формалин и теотропин в тех же концентрациях.

При подборе оптимального соотношения компонентов разрабатываемой ассоциированной вирусно-бактериальной вакцины были использованы результаты ранее проведенных исследований Красочко П.А. и др. (2001-2023 гг.), а также результаты собственных исследований.

Так, согласно проведенным ранее исследованиям, оптимальным соотношением компонентов вирусов инфекционного ринотрахеита, диареи, парагриппа-3 и РС-вируса является соотношение 1:1:1:1. При этом титр вирусов должен составлять 5,0-5,5 lg ТЦД 50/мл.

В 2-х вариантах нами проводилась замена культурального РС вируса рекомбинантным штаммом кишечной палочки - продуцентом белка F1 респираторно-синцитиального вируса

M. haemolytica и *P. Multocida* вводились в концентрации 5,0 млрд. микробных тел в 1 мл из расчета, что каждого штамма будет в количестве 1,5 млрд. в 1 мл. Для этого было взято по 0,33 мл каждого бактериального штамма и внесено в вакцину 1 мл.

В качестве адъювантов нами использованы адъюванты - Монтаниды ИЗА 61 в 15% концентрации и ИЗА 201 в 50% концентрации.

В этой связи, нами теоретически предположено, что в 5,0 мл вакцины (без адъюванта) на 4 вируса будет приходиться 4,26 мл вирусов, т.е. на каждый компонент должно приходиться 0,71 мл каждого вируса.

Составлены следующие варианты вакцины с разными соотношениями вирусов (таблица 1):

Таблица 1 – Схема подбора соотношений вирусов ассоциированной вирусно-бактериальной вакцины (мл)

Варианты вакцины	ИРТ	ВД	ПГ-3	РС-вирус	Рекомбинантный штамм РС-вируса	<i>M. haemolytica</i>	<i>P. Multocida</i> (тип А)	<i>P. Multocida</i> (тип В)	Адъювант
Адъювант ИЗА 61									
№1	81	81	81	81	-	33	33	33	77
№2	108	108	108	-	33	33	33	33	77
Адъювант ИЗА 201									
№3	38	38	38	38	-	33	33	33	251
№4	39	39	39	-	33	33	33	33	251

Примечание: концентрация бактерий – 3,0 млрд. микробных тел в 1 мл.

Титр вирусов - 4,5-6,0 Ig ТЦД 50/мл

После соединения монокомпонентов и добавления адъювантов итоговый объем вакцины составил 5,0 мл.

Для изучения безвредности каждого варианта вакцины было взято 5 групп мышей по 5 голов в каждой и 5 групп морских свинок по 5 голов в каждой. Каждой группе животных вводили: мышам - по 0,2 мл каждого варианта вакцины внутримышечно в область бедра (по 0,1 мл в каждую ногу) ; морским свинкам - по 0,5 мл каждого варианта вакцины внутримышечно в область бедра. Животным 5-й (контрольной группы вводили соответственно изотонический раствор натрия хлорида в тех же дозах)

Наблюдение за животными проводили в течение 10 дней.

Результаты исследований. По результатам исследований было установлено, что наиболее после введения различных вариантов вакцины морским свинкам и мышам на месте инъекции припухлости и болезненности не было установлено.

В табл. 2 приведены результаты клинического наблюдения за животными.

Таблица 2 - Реакция животных на введения различных вариантов вирусно-бактериальной вакцины

Дни наблюдения	Мыши			Морские свинки		
	Вариант вакцины № 1	Вариант вакцины № 2	Контроль	Вариант вакцины № 1	Вариант вакцины № 2	Контроль
До обработок	Мыши клинически здоровы, припухлост и на месте введения нет	Мыши клинически здоровы, припухлост и на месте введения нет	Мыши клинически здоровы, припухлост и на месте введения нет	Морские свинки клинически здоровы, припухлост и на месте введения нет	Морские свинки клинически здоровы, припухлост и на месте введения нет	Морские свинки клинически здоровы, припухлост на месте введения нет
Через 1 сутки	Мыши клинически здоровы, припухлост и на месте введения нет	Мыши клинически здоровы, припухлост и на месте введения нет	Мыши клинически здоровы, припухлост и на месте введения нет	Морские свинки клинически здоровы, припухлост и на месте введения нет	Морские свинки клинически здоровы, припухлост и на месте введения нет	Морские свинки клинически здоровы, припухлост на месте введения нет
Через 2 суток	Мыши клинически здоровы, припухлост и на месте введения нет	Мыши клинически здоровы, припухлост и на месте введения нет	Мыши клинически здоровы, припухлост и на месте введения нет	Морские свинки клинически здоровы, припухлост и на месте введения нет	Морские свинки клинически здоровы, припухлост и на месте введения нет	Морские свинки клинически здоровы, припухлост на месте введения нет
Через 3 суток	Мыши клинически здоровы, припухлост и на месте введения нет	Мыши клинически здоровы, припухлост и на месте введения нет	Мыши клинически здоровы, припухлост и на месте введения нет	Морские свинки клинически здоровы, припухлост и на месте введения нет	Морские свинки клинически здоровы, припухлост и на месте введения нет	Морские свинки клинически здоровы, припухлост на месте введения нет

Полученные данные свидетельствуют, что разработанные варианты вирусно-бактериальных вакцин против вирусных респираторных инфекций молодняка крупного рогатого скота были безвредны и ареактогенны. 1 в 50% концентрации.

Литература

1. Глотов А.Г., Глотова Т.И., Нефедченко А.В. Этиологическая структура массовых респираторных болезней молодняка крупного рогатого скота в хозяйствах, занимающихся производством молока // *Сибирский вестник сельскохозяйственной науки*. – 2008. -- №3(183). – С. 72-78.
2. Дифференциальная диагностика болезней сельскохозяйственных животных / А. И. Ятусевич, [и др.] ; Кубанский государственный аграрный университет имени И. Т. Трубилина, Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины. – Краснодар : Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина, 2021. – 808 с. – ISBN 978-5-907430-77-8. – EDN KEMFFU.
3. Ефанова Л.И. и др. Противовирусный колостральный иммунитет и респираторные болезни у телят первого месяца жизни // *Актуальные вопросы ветеринарной биологии*. – 2013. -- № 3 (19). – С. 30-36.
4. Инфекционные болезни животных, регистрируемые в Союзном государстве / П. А. Красочко, [и др.] - Кубанский государственный аграрный университет им. И. Т. Трубилина, Чеченский государственный университет, Витебская государственная академия ветеринарной медицины. – Краснодар : Кубанский государственный аграрный университет имени И.Т. Трубилина, 2020. – 385 с. – ISBN 978-5-907373-70-9. – EDN NVEVJY
5. Красочко, П. А. Биотехнологические основы конструирования и использования иммунобиологических препаратов для молодняка крупного рогатого скота : дис. ... д-ра биол. наук : 03.00.23 / П. А. Красочко. – Щелково, 2009. – 439 с.
6. Лисицын В.В. Проблемы респираторных болезней молодняка крупного рогатого скота и пути их решения // *Ветеринария сельскохозяйственных животных*. – 2010. -- № 5. – С. 12-16.
7. Лисицын, В.В. Проблемы респираторных болезней молодняка крупного рогатого скота и пути их решения / В.В. Лисицын // *Ветеринария сельскохозяйственных животных*. – 2010. – № 5. – С. 12-16.
8. Мищенко В.А., Павлов Д.К., Мищенко А.В. Состояние проблемы респираторных болезней молодняка крупного рогатого скота // *Ветеринария Кубани*. – 2008. -- №5. – С. 46-50.
9. Мищенко, В.А. Этиопатогенез респираторных болезней КРС / В.А. Мищенко [и др.] // *Ветеринарный консультант*. – 2008. – № 11. – С. 3–5.
10. Сисягин П.Н. и др. Иммунологический статус телят при респираторных болезнях и способ его коррекции // *Аграрная наука Евро-Северо-Востока*. – 2011. -- № 1 (20). – С. 62-66.
11. Сисягин, П.Н. Иммунный статус у клинически здоровых и больных смешанными респираторными болезнями телят в зависимости от ассоциации возбудителей / П.Н. Сисягин [и др.] // *Ветеринария сельскохозяйственных животных*. – 2012. – № 9. – С. 54–59.
12. Определение микробиоценоза кишечного тракта животных в норме и при дисбактериозах : рекомендации / В. Н. Алешкевич, И. А. Субботина, П. А. Красочко [и др.] ; Учреждение образования "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины". – Витебск : Учреждение образования "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины", 2017. – 40 с. – ISBN 978-985-512-991-3. – EDN ORVONF.
13. Рекомендации по изучению микрофлоры желудочно-кишечного тракта животных / П. А. Красочко, А. А. Гласкович, Е. А. Капитонова, Ю. В. Ломако ; Учреждение образования "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины". – Витебск : Учреждение образования "Витебская ордена "Знак Почета" государственная академия ветеринарной медицины", 2008. – 20 с. – ISBN 978-985-512-188-7. – EDN ZDHCBL.