

СОВРЕМЕННЫЕ ПОДХОДЫ К КОНСТРУИРОВАНИЮ ВАКЦИН ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ВИРУСНЫХ РЕСПИРАТОРНЫХ И ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЙ ТЕЛЯТ

П.А. КРАСОЧКО

*РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вьшелесского»,
Минск, РБ*

Поступила в редакцию 15.07.2015 г.

Современное ведение мясного и молочного скотоводства, сопровождающееся концентрацией поголовья на небольшой площади, комплектованием животноводческих ферм и комплексов одновозрастными и одновидовыми животными с генетическим потенциалом, приближенным к однородному, сопровождается быстрым распространением инфекционных заболеваний, которые поражают различные половозрастные группы животных.

Среди болезней крупного рогатого скота пневмоэнтериты наносят огромный экономический ущерб животноводству. Возбудителями таких инфекций являются вирусы, относящиеся к семействам герпесвирусов – вирус инфекционного ринотрахеита (ИРТ), парамиксовирусов – вирусы парагриппа-3 (ПГ-3), респираторно-синтициальный вирус (РСВ), флавивирусов – вирус диареи – болезни слизистых (ВД), аденовирусов, рота- и коронавируса и т.д. Это так называемые «малые» инфекции, которые у здоровых животных с нормальным функционированием иммунной системы протекают бессимптомно без выраженных клинических признаков, или животные вообще не переболевают данными инфекциями. Особенно тяжело болеют животные, когда в патологический процесс вовлекается 2 и более вирусов, то есть возникает смешанная или ассоциативная инфекция. Течение пневмоэнтеритов развивается в две фазы: первая – вирусная фаза, вторая – бактериальная. При тяжелом течении вирусной фазы инфекции наряду с поражением чувствительных клеток наступает значительное угнетение клеточного и гуморального звеньев иммунитета, на фоне чего условно-патогенная микрофлора активизируется и у животных развивается «энзоотическая пневмония», приводящая к значительному отходу заболевших животных, снижению их продуктивности. Особенностью распространения вирусов инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, респираторно-синтициальной инфекции является то, что данные возбудители у молодняка до 1 месяца могут вызывать энтериты, у более старших животных – респираторные заболевания, а у взрослых половозрелых коров и быков – нарушение воспроизводительной функции. Кроме того, вирус парагриппа-3 широко распространен у телят старшего возраста при нарушениях технологии выращивания, т.е. при стрессовых воздействиях на организм, вызывая поражения дыхательных путей, а рота- и коронавируса – у новорожденных телят вызывают тяжело протекающие энтериты [1, 3].

По тропизму все вышеуказанные возбудители могут репродуцироваться в клетках респираторного и желудочно-кишечного тракта, половых органах, иммунокомпетентных клетках, то есть они пантропны. Это обуславливает их высокую контагиозность и тяжесть течения болезни [2, 4].

Одним из пусковых механизмов поражения животных инфекционными заболеваниями в условиях современной промышленной технологии является снижение иммунологической реактивности организма, которая вызывается рядом факторов – недоразвитостью иммунной системы молодняка (первичный иммунодефицит), пищевые токсикозы, недостаточное и несбалансированное по различным компонентам кормление, а также сильное стрессовое воздействие – так называемый «технологический стресс», обусловленный современной технологией производства продукции животноводства. Составляющими современной промышленной технологии, способствующие вызвать стрессовые воздействия на организм животных, являются безвыгульное и безвыпасное содержание животных, транспортировка, изменение микроклимата, формирование больших групп животных, малый фронт кормления, интенсивная эксплуатация. Все такие факторы отрицательно отражаются на иммунной системе и обменных процессах организма животных, что приводит к значительному снижению устойчивости к инфекционным заболеваниям, особенно к заболеваниям, возбудителями которых являются условно-патогенные микроорганизмы и вирусы. Угнетенная иммунная система под воздействием вышеуказанных факторов не в состоянии противостоять вирусам-возбудителям даже с невысокой патогенностью. Вирусы-возбудители респираторных инфекций крупного рогатого скота каждый в отдельности, и особенно в ассоциациях, в свою очередь угнетают отдельные звенья иммунной системы – как клеточные, так и гуморальные. При переболевании животных вирусной диареей поражается, в основном, клеточное звено иммунитета – снижается количество и функциональная активность лимфоцитов, угнетается биосинтез антител, снижается концентрация общего белка в сыворотке крови [1, 2, 5, 6].

Важное место в комплексе лечебно-профилактических мероприятий при пневмоэнтеритах телят, вызванных ИРТ, ВД, РС, РСВ, рота- и корона-вирусами, играет специфическая профилактика (пассивная и активная). Однако использование моновакцин в профилактике ассоциаций не всегда дает положительный эффект, т.к. антитела вырабатываются против одного возбудителя, а патологический процесс вызывается ассоциацией вирусов и бактерий. В этой связи заслуживает интерес использование для специфической профилактики ассоциаций вакцин против 2–3 инфекций, что позволит повысить эффективность вакцинных препаратов. Так, в мировой науке и практике накоплен значительный опыт борьбы с вирусными респираторными и желудочно-кишечными заболеваниями молодняка крупного рогатого скота, однако для условий Республики Беларусь и стран СНГ он не всегда прирелем [4].

Цель настоящего исследования – разработать унифицированные технологии изготовления и применения моно- и ассоциированных живых и инактивированных культуральных вирус-вакцин для профилактики инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, рота- и коронави-

русной инфекций крупного рогатого скота.

В комплексе лечебно-профилактических мероприятий при вирусных респираторных и желудочно-кишечных инфекциях крупного рогатого скота специфическая профилактика занимает одно из ведущих мест.

Специфическая профилактика этих инфекций в современных условиях идет по 5 направлениям:

- активная специфическая профилактика живыми моно- и ассоциированными вакцинами;

- активная специфическая профилактика инактивированными моно- и ассоциированными вакцинами;

- активная специфическая профилактика с использованием рекомбинантных штаммов бактерий, имеющих в своем геноме геном вирусов;

- активная специфическая профилактика с использованием маркерных штаммов вирусов;

- пассивная профилактика респираторных и желудочно-кишечных с использованием гипериммунных сывороток и иммуноглобулинов, сывороток реконвалесцентов, молозивных сывороток и иммуноглобулинов.

Вакцинация телят позволяет создать напряженный специфический иммунитет (как местный, так и общий), а также неспецифический противовирусный иммунитет из-за высокой интерференогенной активности некоторых вакцинных штаммов вирусов, обусловленный созданием невосприимчивости к ряду возбудителей, не входящих в вакцину. Такое положение характерно для иммунизации живыми вирус-вакцинами. Постоянная иммунизация как молодняка крупного рогатого скота, так и взрослых животных способствует вытеснению из стада эпизоотических штаммов вирусов вакцинными и тем самым снижает степень инфицированности возбудителями респираторных инфекций. Это относится к таким вирусным инфекциям, как инфекционный ринотрахеит, вирусная диарея, парагрипп-3, респираторно-синцитиальная инфекция.

Но механизм действия при использовании инактивированных вакцин несколько иной. В основном инактивированные вакцины при вирусных инфекциях телят используют для иммунизации глубоко стельных коров с целью создания напряженного колострального иммунитета у телят, для иммунизации племенных животных, которым нежелательно применять живые вакцины, а также на заключительных стадиях оздоровления хозяйств от вирусных инфекций.

К таким вакцинам относятся инактивированные вакцины против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота- и коронавирусной инфекций. Проведенные исследования по изучению роли вирусов в возникновении респираторных и желудочно-кишечных инфекций показали, что в чистом виде (в виде моноинфекций) вирусные инфекции встречаются редко – от 0,5 до 15%, тогда как в ассоциациях значительно чаще – до 75–90%. В этой связи иммунизация животных моновакцинами не достигает желаемого профилактического эффекта, т.к. в патологическом процессе играют роль 2–3 возбудителя.

Однако практическим ветеринарным специалистам часто приходится сталкиваться с такой проблемой, как несоответствие компонентов вакцины с этиологической структурой заболеваний, имеющей место в хозяйстве.

В связи с вышеизложенным, нами проведен комплекс исследований по разработке универсальной технологии изготовления живых и инактивированных моно- и ассоциированных вирус-вакцин для иммунизации крупного рогатого скота различного возраста и физиологического состояния, а также принцип стимуляции иммунной системы при вакцинации вирус-вакцинами.

На основании многолетних исследований и литературных данных нами разработана и широко использована в конструировании и выпуске живых и инактивированных моно- и ассоциированных вирус-вакцин против ИРТ, ВД, ПГ-3, РС рота- и коронавирусной инфекций крупного рогатого скота универсальная технология, которая состоит из следующих этапов:

- подбор, селекционирование, и определения антигенной активности вакцинных штаммов вирусов крупного рогатого скота для конструирования вакцин;

- отработка режимов культивирования вирусов для широкомасштабного накопления большого количества вирусного материала;

- отработка методов лиофильного высушивания вирусов для изготовления живых вакцин;

- отработка оптимальных методов инактивации вирусов для конструирования инактивированных вакцин;

- подбор оптимальных адъювантов для конструирования инактивированных вакцин;

- отработка оптимальных доз и соотношений компонентов при конструировании ассоциированных живых и инактивированных вирус-вакцин;

- изучение антигенной активности живых и инактивированных штаммов вирусов на лабораторных и сельскохозяйственных животных;

- изучение иммунологической перестройки организма телят после иммунизации живыми и инактивированными вирус-вакцинами крупного рогатого скота;

- определение иммуногенности живых и инактивированных культуральных вирус-вакцин против вирусных инфекций крупного рогатого скота на лабораторных животных;

- изучение профилактической эффективности живых и инактивированных культуральных вирус-вакцин вирусных инфекций крупного рогатого скота при респираторных и желудочно-кишечных болезнях телят, заболеваниях репродуктивных органов коров.

При подборе, селекционировании и определении антигенной активности вакцинных штаммов вирусов – возбудителей пневмоэнтеритов крупного рогатого скота при конструировании вакцин используются изоляты вирусов, выделенные от больных животных на первично трипсинизированных культурах клеток почки эмбриона теленка или тестикул бычка, а в последние годы – перевиваемых культурах клеток (ПТ-линия "Таурис", МДБК, ПТ-80). В качестве питательных культуральных сред применяли среду 199; 0,5% лактальбумина гидролизат; среду Игла; ферментный гидролизат мы-

шечных тканей (ФГМС), гемогидролизат. Для изготовления вакцин против ИРТ крупного рогатого скота используются аттенуированные штаммы ТК-А и МВА 2/81, «4016», «Оренбург» и «Молдавский»; вирусной диареи – аттенуированный штамм ВК-№ 28, инактивированной – «Орегон С-24», парагриппа-3 – аттенуированные штаммы ПТК- 45, SF- 4, «Белорусский-9»; ротавирусной инфекции – штамм № 243, «Белорусский -7»; коронавиральной инфекции – «Линкольн», F-17 и «Белорусский-11».

Для накопления и адаптации вакцинных штаммов вирусов ИРТ, ВД, ПГ-3, коронавируса нами использованы первичные клетки почки эмбриона коровы (ПЭК), почки теленка (ПТ, линия «Таурус»); (ПТ-80) и МДБК. Ротавирус адаптировали к перевиваемым линиям клеток почек зеленой мартышки – *Vero*, почки теленка – МДБК, перевиваемые клетки почки поросенка – СПЭВ. В работе нами использованы адаптированные и аттенуированные штаммы вирусов, которые депонированы в Республиканской коллекции микроорганизмов и им присвоены номера: инфекционного ринотрахеита – КМИЭВ – 6, диареи – КМИЭВ – 7, парагриппа-3 – КМИЭВ- 8, ротавирус – КМИЭВ – 3, коронавирус – КМИЭВ – 1.

Для широкомасштабного накопления монокомпонентов вирусов для изготовления вакцин проведено сравнительное культивирование на 1,5-литровых матрасах и на 2–3-литровых роллерах. При этом цитопатическое действие (ЦПД), характерное для вируса ИРТ, наступало через 36–48 час, вируса диареи – 24–36 час, вируса парагриппа-3 – 60–72 час, ротавируса – через 24 час, коронавируса – через 72–96 час. К этому сроку отмечалась полная деструкция клеточного монослоя, его сползание со стекла и наличие в вирусосодержащей жидкости взвеси клеток. Титрация вирусосодержащей жидкости по Риду и Менчу показала, что после культивирования на матрасах титр вируса ИРТ составлял 5,5–6,0 lg ТЦД 50/1,0 мл; вируса диареи – 6,0–6,5 lg ТЦД 50/1,0 мл; вируса парагриппа-3 – 5,0–5,5 lg ТЦД 50/1,0 мл; ротавируса – 7,5–8,0 lg ТЦД 50/1,0 мл; коронавируса – 5,0 lg ТЦД 50/ 1,0 мл. Но при культивировании на роллерах – титр вируса был выше на 1,5–2,0 lg ТЦД 50/1,0 для каждого вируса.

Изучение антигенной активности адаптированных штаммов вирусов ИРТ, ВД и ПГ-3, рота- и коронавируса на кроликах и телятах в сравнении с исходными штаммами проводилось путем введения кроликам и телятам по 2 мл вирусосодержащей жидкости каждого из вирусов при инфекционном титре 6,0 lg ТЦД 50/мл. Установлено, что адаптация вирусов ИРТ, ВД, ПГ-3, рота- и коронавируса на новых клеточных линиях не влияет на их антигенную активность в сравнении с исходными штаммами. Штаммы не реактогенны, вызывают активную выработку противовирусных антител сельскохозяйственными (телята) и лабораторными (кролики) животными в достаточно высоких титрах – до 4–6 log₂.

Для изготовления живых вакцин, повышения сроков их хранения разработаны методы лиофильного высушивания вакцин. В качестве защитных сред использованы среда ВГНКИ № 3, состоящая из сахарозы, желатозы и агара; а также среды на основе сахарозы и лактальбумина, среды на основе сухого молока. Использование данных защитных сред позволило с наименьшей потерей инфекционной активности проводить высушивание

вакцин.

При изготовлении инактивированных вакцин для инактивации вирусов без снижения антигенной активности наиболее эффективным средством явился теотропин (1,8,3,6– диэндометилен – 1,3,6,8 – тетраазаиклодекан) в 0,1–0,2% концентрации. Теотропин в низких концентрациях необратимо инактивирует практически все вирусы животных. Механизм инактивации основан на разрушении нуклеиновых кислот (РНК и ДНК). В концентрациях до 5% не токсичен для млекопитающих и птиц, не раздражает кожные покровы и слизистые оболочки, при аэрозольном применении не вызывает раздражения дыхательных путей.

Для повышения иммунологической эффективности инактивированных вакцин на основании длительных исследований используются эмульсиген в 10% концентрации, Монтанид ИЗА 15 в 15% концентрации, Монтанид ИЗА 206 в 50% концентрации, активированная целлюлоза в 2% концентрации. Их использование позволит на 3–4, 4–6 \log_2 повысить уровень поствакцинальных антител по сравнению с введением вируса без адьювантов.

При отработке оптимальных доз и соотношений компонентов при конструировании ассоциированных живых и инактивированных вирусвакцин в зависимости от возраста и живой массы животного доза вакцины составляет от 2 до 5,0 см³ при двукратном введении с интервалом 21– +28 дней.

При изучении иммунологической перестройки организма крупного рогатого скота после иммунизации живыми и инактивированными вирусвакцинами установлено, что у всех животных уровень поствакцинальных антител достоверно повышался до 8 \log_2 , количество Т- и В-лимфоцитов – на 12–25%, иммуноглобулинов – на 10–20% и т.д.

На основании проведенных исследований нами разработаны:

- вирус-вакцина живая культуральная против инфекционного ринотрахеита (профилактическая эффективность – 88,2–91%);
- вирус-вакцина живая культуральная против вирусной диареи (профилактическая эффективность – 91– 96,9%);
- вирус-вакцина живая культуральная против парагриппа-3 (профилактическая эффективность – 88,0–90%);
- вирус-вакцина инактивированная против вирусной диареи (профилактическая эффективность для коров до 100% и для телят – до 95,6%);
- вирус-вакцина инактивированная против инфекционного ринотрахеита (профилактическая эффективность – 91,4–96,4%);
- вирус-вакцина бивалентная живая культуральная против инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи (профилактическая эффективность – 88,0–90,8%);
- вирусвакцина трехвалентная живая культуральная против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи и парагриппа-3 (профилактическая эффективность – 95,5–97,1%);
- ассоциированная вакцина против рота- и коронавирусной инфекций новорожденных телят (профилактическая эффективность – 85,0–95,6 %);

- поливалентная инактивированная культуральная вирус-вакцина против инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, рота- и коронавирусной инфекций крупного рогатого скота «Тетравак» (профилактическая эффективность – 93,3 – 95,1%);
- вирус-вакцина инактивированная для профилактики заболеваний репродуктивных органов коров и желудочно-кишечного тракта телят (профилактическая эффективность для коров – 87,5–100%, для телят 93,5% – 95,1%);
- вакцина поливалентная инактивированная вирусно-бактериальная для профилактики заболеваний репродуктивных органов коров и желудочно-кишечного тракта телят (профилактическая эффективность для коров – 100%, 94,9% – для телят).

ВЫВОДЫ

Разработана унифицированная технология изготовления и применения моно- и ассоциированных живых и инактивированных культуральных вирус-вакцин для профилактики инфекционного ринотрахеита, вирусной диареи, парагриппа-3, рота- и коронавирусной инфекций крупного рогатого скота.

С помощью унифицированной технологии разработано 11 биопрепаратов с профилактической эффективностью от 85 до 100%.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 *Болезни крупного рогатого скота и овец / П.А. Красочко, З.М. Джамбулатов, К.Б. Курбанмагомедов [и др.] – Под общей редакцией доктора ветеринарных наук, профессора П.А. Красочко. – Махачкала, 2007. – 657 с.*
- 2 *Ковалев, Н.А., Красочко, П.А. Вирусы и прионы в патологии животных и человека / Н.А. Ковалев, П.А. Красочко // Минск: Беларуская навука. – 2012. – 426 с.*
- 3 *Современная диагностика инфекционных заболеваний крупного рогатого скота: учебно-методическое пособие / А.Р. Камошенков, П.А. Красочко, Л.С. Кашко, С.М. Грибко, П.П. Красочко: под общей редакцией доктора ветеринарных наук, доктора биологических наук, профессора, академика РАЕН П.А. Красочко // Смоленск: ФГБОУ ВПО «Смоленская ГСХА», 2013. – 84 с.*
- 4 *Сывороточные и вакцинные препараты для профилактики и терапии инфекционных заболеваний животных / Е.В. Сусский, П.А. Красочко, А.П. Медведев, А.А. Вербицкий // Армавир, 2013. – 338 с.*
- 5 *Физиологические основы проявления стрессов и пути их коррекции в промышленном животноводстве: монография / Ф.И. Фурдуй, П.А. Красочко [и др.] // Под ред. П.А. Красочко. – В 2 ч. Ч. 1. – Горки : БГСХА, 2013. – 564 с.*
- 6 *Физиологические основы проявления стрессов и пути их коррекции в промышленном животноводстве: монография / Ф.И. Фурдуй, П.А. Красочко [и др.] // Под ред. П.А. Красочко. – В 2 ч. Ч. 2. – Горки : БГСХА, 2013. – 492 с.*