УДК 619:619.89:578:615.371.03:636.22/28

РАЗРАБОТКА БИВАЛЕНТНОЙ ИНАКТИВИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ ИНФЕКЦИОННОГО РИНОТРАХЕИТА И ВИРУСНОЙ ДИАРЕИ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

П. А. Красочко[1], А. М. Ламан[2]

[1] – УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»
г. Витебск, Республика Беларусь
(Республика Беларусь, 210026, г. Витебск, ул. 1-я Доватора, 7/11)
[2] – УО «Гродненский государственный аграрный университет»
г. Гродно, Республика Беларусь
(Республика Беларусь, 230008, г. Гродно, ул. Терешковой, 28; e-mail: ggau@ggau.by)

Ключевые слова: *вакцина, диарея, коровы, телята, иммунология, титр, антитела, биохимия, морфология, штаммы, инфекционный ринотрахеит.*

Аннотация. *Приведены результаты разработки бивалентной инактивированной вакцины против инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи крупного рогатого скота. Показаны результаты конструирования, отработки инактивации вирусов, подбора адъювантов, изучения безвредности, ректогенности и стерильности биопрепарата в лабораторных условиях.*

DEVELOPMENT OF BIVALENT INACTIVATED VACCINE AGAINST INFECTIOUS RHINOTRACHEITIS AND VIRAL DIARRHEA IN CATTLE

P. A. Krasochko[1], A. M. Laman[2]

[1] – EI «Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine»
Vitebsk, Republic of Belarus
(Republic of Belarus, 210026, Vitebsk, 7/11 first Dovatora st.)
[2] – EI «Grodno state agrarian University»
Grodno, Republic of Belarus
(Republic of Belarus, 230008, Grodno, 28 Tereshkova st.; e-mail: ggau@ggau.by)

Key words: *vaccine, diarrhea, cows, calves, immunology, dilution, antibodies, biochemistry, morphology, stains, infectious rhinotracheitis.*

Summary. *The results of the development of bivalent inactivated against infectious rhinotracheitis and viral diarrhea of cattle are presented. Shows the results of designing, testing inactivation of viruses, selection of adjuvants, studies harmlessness, reactogennosti and sterility of a biological product in the laboratory.*

(Поступила в редакцию 01.06.2018 г.)

Введение. Получение крепких жизнеспособных телят – важнейшая задача современного животноводства, т. к. от состояния их здоровья зависит последующий рост, развитие, адаптация к неблагоприятным факторам окружающей среды, оптимальное проявление генетического потенциала и получение доброкачественной в ветеринарно-санитарном отношении продукции [2, 5].

В этиологической структуре вирусных инфекций крупного рогатого скота, вызывающих поражение дыхательных путей, особое место занимают вирусы инфекционного ринотрахеита и диареи, а желудочно-кишечных инфекций – рота- и коронавирусы. Массовые болезни новорожденных телят обусловлены различными этиологическими агентами и протекают чаще всего в форме ассоциаций. Особенностью данных возбудителей является их способность преодолевать плацентарный барьер, репродуцироваться в эмбриональных тканях и иммунокомпетентных органах пораженных животных. При этом возбудители вирусных инфекций распространены как среди молодняка, так и среди взрослых животных. Такие инфекции развиваются у телят, как правило, в первые 3-5 дней жизни. И проявляются у новорожденных телят тромбоцитопенией и геморрагической болезнью. Вирус диареи размножается в тромбоцитах, лейкоцитах, лимфоцитах, нейронах коры головного мозга, селезенки, клетках гипофиза [1, 3]. После переболевания возникает иммуносупресия и, как следствие, повышается чувствительность животных к другим патогенам (хламидии, криптоспоридии, патогенные грибы и др.).

Возникновение болезни, степень охвата поголовья, тяжесть течения и исход зависит от состояния организма животного, уровня его естественной резистентности и тех условий, в которые теленок попадает после рождения и в последующие периоды выращивания. Высокий уровень резистентности новорожденных телят обеспечивается совокупностью многих факторов, среди которых первостепенное значение имеют: состояние организма матери, количество и качество получаемого после рождения молозива, санитарное состояние ферм. Даже нормально развитые (без признаков гипотрофии) новорожденные телята имеют ряд физиологических особенностей, которые делают их уязвимыми к желудочно-кишечным инфекциям, особенно при ассоциациях, когда в патологическом процессе участвует 2-3 вируса одновременно. При возникновении вспышек в хозяйстве заболеваемость достигает 100%, а отход – до 25% [2].

Одним из наиболее высокоэффективным методом борьбы с данными инфекциями является специфическая профилактика, направленная на использование живых и инактивированных вакцин для иммуни-

зации стельных коров и нетелей с целью повышения сохранности молодняка крупного рогатого скота. Используемые в настоящее время на территории Республики Беларусь вирусвакцины достаточно эффективны, но нередко применение их инфицированным или ослабленным животным приводит к заболеванию иммунизированных животных, кроме того, они не всегда подходят к тем вариантам ассоциаций, которые наиболее часто встречаются в хозяйствах. Эффективность вакцин зависит от совпадения антигенных структур вакцинных и эпизоотических штаммов [2, 6].

В связи с этим возникает необходимость в разработке новых эффективных, экологических безвредных препаратов и вакцин.

Цель работы – разработка бивалентной инактивированной вакцины против инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи крупного рогатого скота.

Материал и методы исследования. Исследования проводились в условиях отдела вирусных инфекций РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского НАН Беларуси», виварии института, а также в УО «Гродненском государственном аграрном университете» и СПК им. Деньщикова Гродненского района Гродненской области.

Для изучения ситуации по инфекционному ринотрахеиту и вирусной диарее исследовали фекалии и сыворотки крови от телят и коров различного клинического состояния. Наличие антител в сыворотках крови изучали в РНГА, наличие вирусных антигенов – в ИФА. Для постановки РНГА использовали эритроцитарные диагностикумы собственного изготовления. Антигены вируса диареи – с помощью набора диагностикумов производства Всероссийского НИИ и ТИ биологической промышленности (Щелково, Россия), ИРТ – тест-системами фирмы IDECS. Постановку ИФА проводили в соответствии с инструкциями по применению тест-систем. Накопление вирусов проводили на культуре клеток МДБК.

Результаты исследования и их обсуждение. При изучении распространения инфекционного ринотрахеита и вирусной диарее от телят различного клинического состояния, а также коров были получены сыворотки крови от больных энтеритами. Результаты проведенных исследований представлены в таблице 1.

Таблица 1 – Результаты исследования крупного рогатого скота на вирусные пневмоэнтериты

Группы животных	Вид биологического материала и метод исследования	Исследовано проб	Из них положительных, %	
			ИРТ	ВД
Коровы	сыворотка крови (РНГА)	65	68,5	72,0
Телята больные энтеритами	фекалии (ИФА)	40	35,0	54,0
	сыворотка крови (РНГА)	54	42,0	48,2
Телята переболевшие энтеритами	сыворотка крови (РНГА)	72	55,0	62,0

Из представленных в таблице данных видно, что у большинства обследованных животных были обнаружены противовирусные антитела к вирусам инфекционного ринотрахеита и диареи. Наличие противовирусных антител в диагностических титрах у невакцинированных животных указывает на персистенцию вышеуказанных вирусов в обследованных стадах.

Характерно, что у 54% новорожденных телят обнаруживаются антигены вируса диареи, а у 35% – вируса ИРТ, что указывает на недостаточную колостральную защиту из-за нарушения технологии выпойки молозива. Кроме того, у переболевших пневмоэнтеритами телят количество положительных проб было на 13-14% больше, чем у больных, что в свою очередь указывает на этиологическую роль вышеуказанных вирусов в возникновении заболевания.

Таким образом, удельный вес возбудителей инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи в этиологической структуре пневмоэнтеритов телят в современных производственных условиях является высоким.

В целях подбора и изучения особенностей культивирования штаммов для конструирования бивалентной инактивированной вакцины против ИРТ и ВД крупного рогатого скота использованы авирулентные вакцинные штаммы вирусов ИРТ (КМИЭВ-6), ВД (КМИЭВ-7). Выбор данных штаммов был обусловлен целесообразностью использования (согласно данным литературы и собственным исследованиям) аттенуированных штаммов вирусов для конструирования инактивированных вакцин.

Накопление вакцинных штаммов вирусов ИРТ и ВД проводили на первично-трипсинизированной культуре клеток почки эмбриона коровы (ПЭК) и на перевиваемых клетках почки теленка (МДБК). Для повышения титров вирусов использованы различные методы культивирования как на матрасах, так и на роллерах. Заражение матрасов и роллеров проводилось по общепринятым методикам. Для роллерного

культивирования использованы роллерная установки Weaton (рисунок).

Вирусы вносились на полностью сформированный клеточный монослой. В каждый матрас добавляли по 10,0-15,0 мл вируссодержащей жидкости – расплодки вируса. Инфекционный титр маточной расплодки для всех вирусов составлял 6,0-6,5 lg ТЦД 50/мл. За состоянием клеточного монослоя под действием каждого из вирусов судили по наличию характерного ЦПД, которое наступало через 24-72 ч.

После завершения репродукции вирусов, которая характеризовалась наступлением ЦПД и поражением клеточного монослоя на 75-100%, каждый матрас (роллер) повергали замораживанию для разрушения клеток и выхода созревших вирионов в поддерживающую среду, затем проводили объединение вирусов в одну емкость для хранения и проведения лабораторных исследований.



Рисунок – Роллерная установка «Weaton»

Титр каждого из вирусов определяли по Риду и Менчу. В результате проведенной титрации установлено, что инфекционный титр ви-

руса ИРТ на матрасах составлял 6,5 lg ТЦД 50/мл, вируса диареи – 7,0 lg ТЦД 50/мл. На роллерах титры вирусов были существенно выше – на 1-1,5 lg ТЦД 50/мл.

Таким образом, культивирование вирусов – компонентов инактивированной бивалентной вакцины необходимо проводить на роллерных культурах клеток.

Для отработки методов инактивации вакцинных штаммов – компонентов конструируемой вакцины были использованы инактиванты – теотропин и формалин.

Широко применяемый для инактивации вирусов формалин обладает такими отрицательными свойствами, как повышенная токсичность, реактогенность и имунодепрессия. Для их преодоления необходима нейтрализация формалина, что увеличивает стоимость вакцины и в то же время усложняет технологический процесс ее изготовления.

В настоящее время представляют большой интерес такие инактиванты, как теотропин и прополис. Теотропин – препарат нового поколения, используемый не только как дезинфектант, но и как препарат для инактивации вирусов и бактерий.

В целях отработки режимов инактивации вирусов в заранее оттитрованную вируссодержащую жидкость добавляли различные разведения инактивантов (от 0,1 до 0,5%). После контакта вирусов с инактивирующими веществами в течение 24, 48, 72, 96 и 120 часов была проверена полнота их инактивации на культуре клеток.

При изучении влияния инактивантов на культуру клеток ПЭК установлено, что добавление формалина в концентрации свыше 0,1%, а теотропина свыше 0,2% вызывает дегенерацию монослоя. Нейтрализацию формалина проводили 10% раствором тиосульфата натрия.

Режимы, при которых наступала полная инактивация вирусов и не происходила дегенерация монослоя, представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Режимы инактивации вирусов

Вид и штамм вируса	Титр вируса, lg ТЦД 50/мл	Инакти-вант	Режим инактивации	
			Концентрация инактиванта, %	Экспозиция, ч
ИРТ (КМИЭВ-6)	6,5	формалин	0,3	48
		теотропин	0,15	24
ВД (КМИЭВ-7)	7,0	формалин	0,25	48
		теотропин	0,1	24

Изученные инактиванты в небольших концентрациях (0,1-0,3%) вызывают инактивацию вирусов инфекционного ринотрахеита и диареи.

Для определения антигенной активности инактивированных и неинактивированных штаммов – компонентов бивалентной вакцины были проведены исследования на белых мышах. При этом было сформировано 9 групп белых мышей по 5 голов в группе. Через 21 день после введения вирусных антигенов мыши были тотально обескровлены. Титр противовирусных антител в сыворотках крови мышей был проверен в РНГА.

В таблице 3 представлены результаты изучения титров противовирусных антител у мышей при отработке оптимального метода инактивации вирусов.

Таблица 3 – Результаты изучения титров противовирусных антител у мышей при отработке оптимального метода инактивации вирусов

№п/п	Группы животных	Наименование вирусного антигена		Инактивант	Титр антител в РНГА
1	опытная группа № 1	ИРТ	инактивированный	формалин	1:16
2	опытная группа № 2			теотропин	1:32
3	опытная группа № 3		живой	-	1:8
4	опытная группа № 4	ВД	инактивированный	формалин	1:8
5	опытная группа № 5			теотропин	1:8
6	опытная группа № 6		живой	-	1:8
7	контрольная группа	ИРТ		-	1:2
		ВД		-	1:2

Таким образом, результаты исследований показали, что оптимальным инактивантом является теотропин, который после введения животным позволяет получить достаточно высокий титр противовирусных антител.

Для изучения иммунного ответа у лабораторных животных на введение им инактивированных вакцинных штаммов с различными адъювантами был отобран только вариант инактивации штаммов вирусов с помощью 0,2% раствора теотропина, который дал наивысший прирост антител в опытах на белых мышах.

Подбор адъювантов для изготовления инактивированных компонентов вакцины проводили на лабораторных животных, использовали 2 вида адъювантов – эмульсиген и суспензия мелкокристаллической активированной целлюлозы.

На основании проведенного изучения гуморального иммунитета после введения кроликам и крысам инактивированных вирусов инфек-

ционного ринотрахеита и вирусной диареи крупного рогатого установлено, что оптимальными адъювантами являются:

- для вируса инфекционного ринотрахеита – 1 и 2% суспензия целлюлозы (титры антител 4,0 $\log_2$ и 4,25 $\log_2$ у кроликов) и 10% эмульсиген (титр антител 3,25 $\log_2$ у кроликов и 4,25 $\log_2$ у крыс);
- для вируса диареи – 2% суспензия целлюлозы (титр антител 3,4 $\log_2$ у кроликов) и 10% эмульсиген (титр антител 3,25 $\log_2$ у кроликов).

Таким образом, для конструирования инактивированной вакцины против инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи крупного рогатого скота оптимальными являются 2% суспензия активированной целлюлозы (производства БГУ) и 10% эмульсия эмульсигена (производство США).

Таким образом, инактивированная вакцина против инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи крупного рогатого скота представляет собой инактивированные 0,2% теотропином штаммы вирусов (инфекционного ринотрахеита КМИЭВ-6 и вирусной диареи КМИТЭВ-7), накопленные на роллерных установках с титром 7,5-8,0 lg ТЦД 50/мл, и добавление адъювантов 10% эмульсигена или 2% суспензия целлюлозы.

Для изучения параметров качества вакцины определи ее стерильность, безвредность и реактогенность.

Стерильность бивалентной инактивированной вакцины против инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи крупного рогатого скота проводили путем высева ее на бактериологические питательные среды – мясо-пептонный агар (МПА), мясо-пептонный бульон (МПБ), агар Сабуро. Для этого в каждую питательную среду вносили по 1,0 мл вакцины. Пробирки с МПА и МПБ помещали в термостат при t+37°С, а агар Сабуро – при t+20+22°С на 7 сут. В результате проведенных исследований установлено, что вакцина являлась стерильным препаратом.

Безвредность и реактогенность вакцины изучалась на белых мышах. Для этого 20 белых мышей разделяли на 2 группы по 10 голов в каждой. Мышам первой группы было введено подкожно 0,4 мл вакцины, мыши второй группы служили контролем. После обработки за животными велось наблюдение в течение 10 дней. Все мыши, которым вводилась вакцина, остались живы.

Заключение. Таким образом, вакцина бивалентная инактивированная против инфекционного ринотрахеита и вирусной диареи крупного рогатого скота, предназначенная для профилактической иммуни-

зации коров, является стерильным, безвредным и ареактогенным биопрепаратом.

ЛИТЕРАТУРА

1. Красочко, П. А. Болезни крупного рогатого скота и овец / П. А. Красачко [и др.]. – Махачкала, 2007.
2. Ветеринарные и технологические мероприятия при содержании крупного рогатого скота / П. А. Красочко [и др.]. – Смоленск, 2016.
3. Зелютков, Ю. Г. Вирусно-бактериальный мониторинг ассоциативных инфекций у новорожденных телят / Ю. Г. Зелютков // Сельское хозяйство – проблемы и перспективы: сб. науч. трудов. – Т. 3 / под ред. В. К. Пестиса. – Гродно: ГГАУ, 2006. – С. 204-207.
4. Иванова, И. П. Инфицированность стад крупного рогатого скота возбудителями респираторных инфекций в хозяйствах Минской области / И. П. Иванова, П. А. Красочко // Актуальные проблемы патологии сельскохозяйственных животных: материалы Международной научно-практической конференции, посвященной 70-летию со дня образования БелНИИЭВ им. С.Н. Вышелесского: сб. науч. трудов. – 2000. – С. 105-106.
5. Красочко, П. А. Биотехнологические основы конструирования и использования иммунобиологических препаратов для молодняка крупного рогатого скота : автореф. дис. … д-ра биол. наук : 03.00.23 / П. А. Красочко; Всерос. науч.-исслед. и технол. ин-т биол. пром-сти. – Щелково, 2009. – 46 с.
6. Машеро, В. А. Этиологическая структура возбудителей респираторных и желудочно-кишечных инфекций телят в Республике Беларусь / В. А. Машеро, П. А. Красочко // Ученые записки: научно-практический журнал / УО ВГАВМ: сб. науч. трудов. – Витебск, 2007. – Т. 43, вып. 2. – С. 83-86.
7. Выращивание и болезни молодняка: практическое пособие / А. И. Ятусевич [и др.]; под общ. ред. А. И. Ятусевича [и др.] М-во сел. хоз-ва и продовольствия Респ. Беларусь, Учреждение образования «Витеб. гос. акад. ветеринар. Медицины». – Витебск: ВГАВМ, 2012. – 814 с.

УДК 619:593.06-085

СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ СКЕЛЕТНЫХ МЫШЦ ЖИВОТНЫХ ПОД ВОЗДЕЙСТВИЕМ НИЗКОИНТЕНСИВНОГО ЛАЗЕРНОГО ИЗЛУЧЕНИЯ (НИЛИ)

И. В. Кулеш[1], В. В. Малашко[1], Д. Л. Шенгаут[1], Я. Шенгаут[2], М. Анишаушкас[2], В. Латвис[2]

[1] – УО «Гродненский государственный аграрный университет»
г. Гродно, Республика Беларусь
(Республика Беларусь, 230008, г. Гродно, ул. Терешковой, 28; e-mail: ggau.by)
[2] – Jakovo veterinarijos centras
Lithuania, 03147, Vilnius

Ключевые слова: *лазер, скелетные мышцы, электронная микроскопия, телята, гистохимия, стереология, морфометрия, миогенез, ангиогенез.*

Аннотация. *Под воздействием НИЛИ происходит интенсификация регионального кровотока, что повышает метаболическую активность эндоте-*