

## ИММУНОГЕННОСТЬ МОНОКОМПОНЕНТОВ, ПРЕДНАЗНАЧЕННЫХ ДЛЯ КОНСТРУИРОВАНИЯ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ И ЭШЕРИХИОЗА КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

Яромчик Я. П.

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

*При вакцинации стельных коров определена оптимальная доза монокомпонента для инактивированных ротавирусов крупного рогатого скота при инфекционном титре  $7,0 \lg \text{TCID}_{50/\text{мл}}$  -  $2,5-5,0 \text{ см}^3$ . Наиболее высокие титры специфических антител для *E.coli* с концентрацией бактериальных клеток  $10^9/\text{мл}$  для K99 и A20 получены при введении антигена в объеме  $2,5 \text{ см}^3$ , а для *E.coli* с адгезивными антигенами K88 -  $1,0 \text{ см}^3$ .*

*At vaccination pregnant cows the optimum doze of a monocomponent, for inactivated rotaviruses cattle at an infectious titre  $7,0 \lg \text{TCID}_{50/\text{ml}}$  -  $2,5-5,0 \text{ см}^3$ . The highest titers of specific antibodies for *E.coli* with concentration of bacterial cells of  $10^9/\text{ml}$  for Att25 and F5 are received at introduction antigens in volume -  $2,5 \text{ см}^3$  and for *E.coli* with fimbrial antigens F4 -  $1,0 \text{ см}^3$ .*

**Введение.** В странах ближнего и дальнего зарубежья и в Республике Беларусь ведущее место в структуре болезней телят в неонатальном периоде занимают ротавирусная инфекция и эшерихиоз [1], [2], [6], [7].

Вакцинация стельных коров и нетелей против данных болезней позволяет значительно повысить сохранность телят за счет создания у них напряженного коллострального иммунитета при выпойке новорожденным иммунного молока в первые часы после рождения [3], [6], [7].

В настоящее время доказано, что конструирование вакцин против эшерихиоза по одному или нескольким O- и K антигенам, без введения в их состав адгезивных антигенов, не обеспечивает достаточную иммунологическую эффективность данных биопрепаратов в условиях производства. Разработка биопрепаратов на основе адгезивных антигенов позволяет повысить их активность и, следовательно, эффективность специфической профилактики колибактериоза телят [1], [2], [3].

При конструировании ассоциированных вирусно-бактериальных вакцин важной задачей является определение иммуногенных свойств компонентов, входящих в состав биопрепаратов, и определение их оптимальных доз, вызывающих максимальный иммунный ответ при введении животным [4], [5].

Целью нашей работы явилось определение оптимальных доз монокомпонентов разрабатываемой вакцины против ротавирусной инфекции и эшерихиоза крупного рогатого скота.

**Материалы и методы.** Экспериментальная работа проводилась в условиях СПК «Ласицк» и СПК «Ставоцкий» Пинского района Брестской области.

В опыт было взято 80 стельных коров живой массой 400-450 кг, которых разделили на 16 опытных групп по 5 животных в каждой. Животным первой, четвертой, седьмой и десятой опытных групп монокомпоненты ротавируса и эшерихий с адгезивными антигенами K99, K88 и A20 вводили соответственно в объеме  $1,0 \text{ см}^3$ . Коровам второй, пятой, восьмой и одиннадцатой опытных групп введение исследуемых монокомпонентов применяли соответственно в объеме  $2,5 \text{ см}^3$ . Для животных третьей, шестой, девятой и двенадцатой опытных групп монокомпоненты разрабатываемой вакцины вводили соответственно в объеме  $5,0 \text{ см}^3$ . Монокомпоненты разрабатываемого биопрепарата вводили данным опытным группам двукратно, с интервалом 21 день.

Коровам 13-й, 14-й, 15-й и 16-й опытных групп монокомпоненты ротавируса и эшерихий вводили в объеме  $7,0 \text{ см}^3$  однократно. Животным контрольной группы биопрепараты не вводились.

После введения инактивированных антигенов за животными опытных и контрольной групп на протяжении 60 дней вели клиническое наблюдение. Ежедневно, 2 раза в сутки (утром и вечером), в течение первых пяти дней после первичного и вторичного введения компонентов, у коров проводили термометрию, клинический осмотр, вели учет показателей их продуктивности. Место введения биопрепаратов обследовали методом пальпации.

Для контроля иммунного ответа у животных были отобраны пробы сыворотки крови до введения компонентов, через 21 день после первой и на 21 день после второй инъекции. Исследования сывороток крови проводили в вирусологическом и бактериологическом отделах РУП «НИИ экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеселского НАН Беларуси», а также в научной лаборатории кафедры эпизоотологии УО «Витебская государственная ордена «Знак Почета» академия ветеринарной медицины».

Для определения уровня противовирусных антител использовали РНГА, а противозэшерихиозных антител – РА в полистироловых планшетах. Постановку реакций осуществляли по общепринятым методикам. В качестве антигенов применяли стандартные диагностикумы, используемые в ветеринарных лабораториях для серологической диагностики ротавирусной инфекции и эшерихиоза.

Для изготовления вирусного монокомпонента был использован аттенуированный штамм ротавируса, накопление которого проводили на перевиваемой культуре клеток почки эмбрионов свиньи – СПЭВ (по Сюрину, 1986 г.). При культивировании вирусов в поддерживающую среду добавляли трипсин в концентрации  $5 \text{ мкг}/\text{см}^3$ . Инфекционный титр ротавируса после титрации на культуре клеток по Риду и Менчу составил  $7,0 \lg \text{TCID}_{50}/\text{см}^3$ .

При приготовлении монокомпонентов эшерихий использовали штаммы с адгезивными антигенами A20, K88 и K99, которые культивировали в матрасных колбах в течение 48 часов на агаровой питательной среде, доводя концентрацию бактериальных клеток до  $10^9/\text{мл}$  стерильного физиологического раствора.

В качестве инактиванта эшерихий и ротавирусов использовали теотропин в 0,1% и 0,2% концентрации соответственно, а адьюванта – эмульсиген в количестве 10% от общего объема полученных образцов антигенов.

Полноту инактивации, стерильность, безвредность и реактогенность монокомпонентов разрабатываемого биопрепарата определяли по общепринятым методикам.

**Результаты исследований.** После введения коровам инактивированных монокомпонентов разрабатываемой вакцины в дозе 1,0, 2,5 и 5,0 см<sup>3</sup> не отмечено общих и местных изменений в клиническом состоянии животных.

При введении опытным животным каждого биопрепарата в дозе 7,0 см<sup>3</sup> у них отмечены: повышение температуры от 40,2 до 41,2°C на протяжении трех-пяти суток с последующим снижением до нормы, а на месте введения антигенов - горячие, отечные и болезненные припухлости диаметром 5-8 см, которые исчезали в течение четырех-пяти дней. Повторного введения монокомпонентов в данной дозе животным этих групп не проводили.

Результаты серологических исследований сыворотки крови коров опытных и контрольных групп представлены в таблице.

**Таблица — Титры антител после введения различных доз инактивированных монокомпонентов ротавируса и E. coli с адгезивными антигенами**

Группа №/№	Антиген	Доза при введениях, см <sup>3</sup>	Титр антител (log <sub>2</sub> )		
			до введения компонента	21 день после введения	45 день после введения
I	Ротавирусы	1,0	2,6±0,4	3,8±0,37	3,8±0,37
II		2,5	2,6±0,4	4,2±0,37*	6,2±0,37**
III		5	2,8±0,2	4,4±0,24*	6,4±0,4**
IV	E.coli K99	1,0	2,2±0,2	5,8±1,77	6,8±1,24*
V		2,5	2,6±0,24	9,0±1,58*	11,2±0,2***
VI		5	2,4±0,24	8,2±0,86**	9,4±0,51***
VII	E.coli K88	1,0	2,4±0,24	8,0±0,77***	9,8±0,2***
VIII		2,5	2,4±0,24	7,2±0,65*	7,6±0,4***
IX		5	2,8±0,2	7,8±0,37***	8,8±0,58***
X	E.coli A20	1,0	2,2±0,2	6,0±0,71**	7,2±0,37***
XI		2,5	2,2±0,2	6,8±0,86**	10,8±0,7***
XII		5	2,3±0,2	7,0±0,63**	10,2±0,3***
Контроль	Ротавирус	-	2,6±0,4	2,6±0,4	2,6±0,4
	E.coli K99	-	2,4±0,24	2,6±0,24	2,4±0,24
	E.coli K88	-	2,8±0,2	2,4±0,24	2,4±0,24
	E.coli A20	-	2,2±0,2	2,4±0,24	2,2±0,2

Примечание: P - \*—≤0,05; \*\*—≤0,01; \*\*\*—≤0,001.

После введения полученных монокомпонентов разрабатываемого биопрепарата в разных дозах не во всех опытных группах отмечен выраженный биосинтез специфических антител. Так, из данных, приведенных в таблице видно, что в сыворотке крови коров первой опытной группы отмечено увеличение уровня антител к ротавирусам на 1,2±0,06 log<sub>2</sub> или 45,2% после первичной инъекции ротавирусного антигена. Уровень специфических антител после вторичного введения антигена остался на том же уровне, что и после первой инъекции.

В сыворотке крови животных второй группы установлено достоверное повышение уровня противоротавирусных антител до значения 6,2±0,37 log<sub>2</sub>, что выше фонового показателя на 60,3% после первого, и на 135,8% после второго введения компонента.

В сыворотке крови коров третьей группы отмечено достоверное повышение уровня противовирусных антител до значения 6,4±0,4 log<sub>2</sub>, что по сравнению с исходными данными выше на 59,6% после первичной и на 135,9% после вторичной инъекции вирусного монокомпонента.

Полученные результаты после введения коровам опытных групп ротавирусного монокомпонента наглядно отображены на рис. 1.

В сыворотке крови коров четвертой группы отмечено достоверное увеличение уровня специфических антител к E.coli K99 до значения 6,8±1,24 log<sub>2</sub>, что составило, по сравнению с фоновыми показателями, повышение на 150,0% после первого, и на 191,7% после второго введения бактериального монокомпонента.

Уровень противозерихозных антител к E.coli K99 в сыворотках крови коров пятой опытной группы достиг значения 11,2±0,2 log<sub>2</sub>, что достоверно выше исходных показателей на 266,7% после первичного и на

В сыворотке крови коров шестой опытной группы уровень специфических антибактериальных антител достоверно повысился до значения  $9,4 \pm 0,51 \log_2$ , что выше на 241,6% после первичной и на 291,7% после вторичной инъекции антигена, по сравнению с фоновым уровнем защитных антител, установленным до введения биопрепарата.

Полученные результаты после введения коровам опытных групп эшерихий с адгезивными антигенами K99 отображены на рис.2.

Наиболее высокие титры антител к E.coli K88 выявлены в сыворотке крови коров седьмой опытной группы. Так, на 21 день после введения антигена уровень противозшерихиозных антител достоверно повысился до значения  $9,8 \pm 0,2 \log_2$ , что, по сравнению с исходными данными, выше на 215,3% после первого и на 284,6% после второго введения монокомпонента.

В сыворотке крови животных восьмой опытной группы достоверно определено увеличение уровня специфических антител до значения  $7,6 \pm 0,4 \log_2$ , что, по сравнению с фоновыми показателями, выше на 184,6% после первого, и на 200,0% после второго введения биопрепарата.

У коров девятой опытной группы в сыворотке крови отмечено достоверное увеличение уровня титра противозшерихиозных антител до  $8,8 \pm 0,58 \log_2$ , что выше исходных показателей на 192,4% после первичной, и на 230,8% после повторной инъекции антигена.

Полученные результаты после введения коровам опытных групп эшерихий с адгезивными антигенами K88 отображены на рис.3.



Рисунок 1 — Уровень специфических антител в сыворотке крови коров опытных групп, которым вводили инактивированные ротавирусы



В сыворотке крови животных десятой опытной группы достоверно установлено увеличение уровня антибактериальных антител к E.coli A20 до значения  $7,2 \pm 0,37 \log_2$ , что выше на 170,8% после первого и на 224,75% после второго введения биопрепарата.

Уровень противозшерихиозных антител к E.coli A20 в сыворотке крови коров 11-й опытной группы достоверно увеличился до  $10,8 \pm 0,7 \log_2$  или на 206,8% через 21 день после первой и на 381,2% после второй инъекции антигена.

В сыворотке крови коров 12-й опытной группы достоверно установлено повышение уровня антител до значения  $10,2 \pm 0,3 \log_2$ , что выше на 211,3% после первого и на 355,1% после повторного введения биопрепарата.

Полученные результаты после введения коровам опытных групп эшерихий с адгезивными антигенами A20 отображены на рис.4.

Рисунок 2 — Уровень специфических антител в сыворотке крови коров опытных групп, которым вводили инактивированные E.coli K99

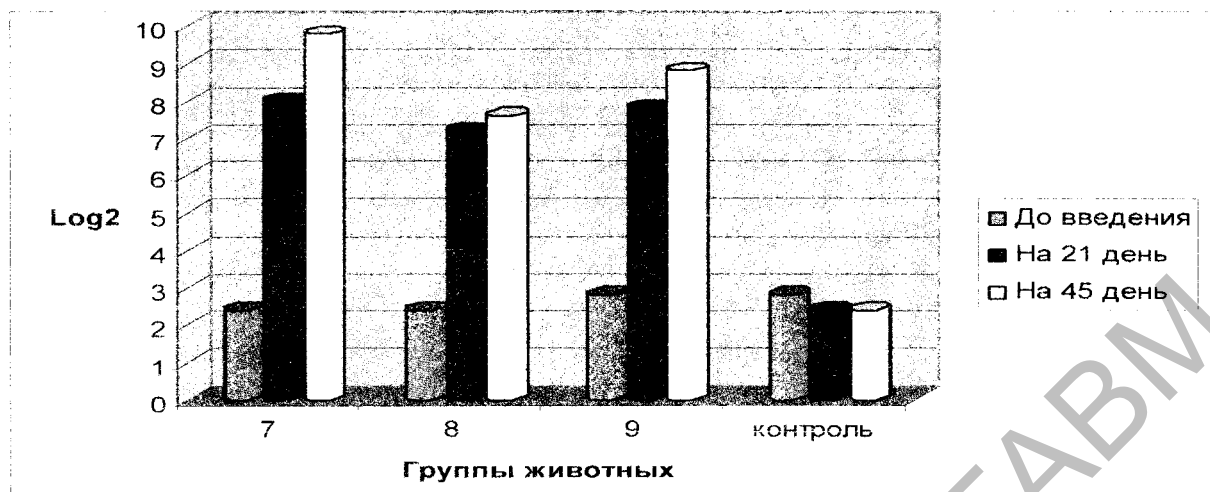


Рисунок 3 — Уровень специфических антител в сыворотке крови коров опытных групп, которым вводили инактивированные E.coli K88



Рисунок 4 — Уровень специфических антител в сыворотке крови коров опытных групп, которым вводили инактивированные E.coli A20

В сыворотке крови коров контрольной группы уровень специфических антител к ротавирусам оставался практически без изменений и составил  $2,6 \pm 0,4 \log_2$  на протяжении всего опыта, отмечены незначительные колебания уровня противозшерихиозных антител от 0,2 до 0,4  $\log_2$  к E.coli K99, A20 и K88 соответственно.

**Заключение.** Иммунологическую эффективность препаратов оценивают по нарастанию титров специфических антител до и после вакцинации как в опытной, так и в контрольной группе [4], [5].

В результате проведенных исследований было установлено, что наиболее выраженный иммунный ответ к монокомпонентам наблюдался у коров, вакцинированных в объеме  $2,5 \text{ см}^3$ . Увеличение дозы до  $5,0 \text{ см}^3$  не оказывало существенного влияния на прирост уровня специфических антител в сыворотке крови иммунизированных животных. Уменьшение дозы до  $1,0 \text{ см}^3$  приводило к менее интенсивному биосинтезу антител, за исключением животных седьмой опытной группы, которым вводили антиген E.coli K88.

У коров большинства опытных групп в сыворотке крови установлено повышение уровня специфических антител после повторного введения монокомпонентов. Полученные нами результаты подтверждают необходимость двукратного введения разрабатываемого биопрепарата против ротавирусной инфекции и эшерихиоза крупного рогатого скота.

Таким образом, в результате проведенных исследований определен выбор доз монокомпонентов вакцины против ротавирусной инфекции и эшерихиоза крупного рогатого скота. Оптимальной дозой монокомпонента для ротавирусов крупного рогатого скота при инфекционном титре  $7,0 \text{ lg TЦД}_{50/\text{см}^3}$  явилось  $2,5\text{-}5 \text{ см}^3$  на животное.

Наиболее высокие титры специфических противозшерихиозных антител для E.coli с концентрацией бактериальных клеток  $10^9/\text{мл}$  для K99 и A20 получены при введении антигена в объеме -  $2,5 \text{ см}^3$ , а для E.coli с адгезивными антигенами K88 -  $1,0 \text{ см}^3$ .

**Литература.** 1. Анализ данных ветеринарной отчетности по эшерихиозу телят в Республике Беларусь / В.В. Максимович [и др.] // Ученые записки / УО ВГАВМ. – Витебск, 2007. – Т. 43, вып. 2. – С. 81–83. 2. Антигенный состав и патогенные свойства штаммов *E.coli*, изолированных от телят и поросят в Краснодарском крае / В.И. Терехов [и др.] // Российский ветеринарный журнал – 2008. – № 4. – С. 6–7. 3. Головки, А.Н. Производственные испытания субъединичной вакцины против колибактериоза / А.Н. Головки // Общая эпизоотология: иммунологические, экологические и методологические проблемы: материалы международной научной конференции 20-22 сентября, 1995 г. Харьков, 1995. – С. 440–442. 4. Красочко, П.А. Иммуногенность компонентов поливалентной инактивированной вакцины против инфекционного ринотрахеита, диареи, рота- и коронавирусной инфекций крупного рогатого скота / П.А. Красочко, С.С. Кабась, С.В. Бойчук // Актуальные проблемы патологии сельскохозяйственных животных: материалы международной научно-практической конференции, Минск, 23-24 октября 2003 года. – Минск, 2003. – С. 160–163. 5. Медунцын, Н.В. Вакцинология / Н.В. Медунцын. – М.: Триада-Х, 1999. – 272 с. 6. Мищенко, В.А. Меры борьбы с диареями новорожденных телят / В.А. Мищенко [и др.] // Ветеринария. – 2002. – № 4. – С. 16–19. 7. Neonatal enterites of calf. Epidemiology and control measures / S. Cavirani [et al.] // Dipartimento di Salute Animale Italian Association for Buiatrics. Meeting on role of veterinary practitioner in calf rearing. Udine (Italy). 2 Mar 2002. Atti-della-Societa'-Italiana-di-Buiatria. – Parma Univ, 2003. –Vol. 35. – P. 525–536.