



На правах рукописи



ДУПЛЕВА ЛИЛИЯ ШАМИЛЕВНА

**РАЗРАБОТКА И ОЦЕНКА ЭФФЕКТИВНОСТИ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ
ИНФЕКЦИОННОГО КЕРАТОКОНЪЮНКТИВИТА КРУПНОГО
РОГАТОГО СКОТА НА ОСНОВЕ АНТИГЕНОВ БАКТЕРИЙ
MORAXELLA BOVIS И ГЕРПЕСВИРУСА ТИПА 1**

16.00.03 – ветеринарная микробиология, вирусология, эпизоотология,
микология с микотоксикологией и иммунология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

03 СЕН 2009

Казань – 2009

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении "Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных" (г. Казань)

Научный руководитель: кандидат ветеринарных наук
Спиридонов Г.Н.

Официальные оппоненты: доктор биологических наук, профессор
Хисматуллина Н.А.

доктор ветеринарных наук, профессор
Госманов Р.Г.

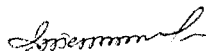
Ведущее учреждение: Чувашская государственная сельскохозяйственная академия

Защита состоится "12" сентября 2009 г. в 10⁰⁰ часов на заседании диссертационного совета Д-220.012.01 при ФГУ "Федеральный центр токсикологической и радиационной безопасности животных" (420075, г.Казань, Научный городок-2, ФГУ "ФЦТРБ-ВНИВИ")

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГУ "ФЦТРБ-ВНИВИ" (г. Казань)

Автореферат разослан "18" августа 2009 г.

Ученый секретарь диссертационного совета, кандидат ветеринарных наук



В.И.Степанов

1 ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

1.1 Актуальность темы. Инфекционный кератоконъюнктивит (ИКК) крупного рогатого скота (КРС), вызываемый бактериями *Moraxella bovis*, наносит значительный экономический ущерб скотоводческим хозяйствам за счет выбраковки животных из-за потери племенной ценности, снижения удоев и прироста массы тела вследствие частичной или полной потери зрения, затрат на проведение лечебных и оздоровительных мероприятий (Какоулин Т.Е., 1982; Русинов А.Ф., 1995; Гаффаров Х.З. с соавт., 1998; Henson J.B. et al., 1960; Slatter D.H. et al., 1982).

Частота проявления этой острой высококонтагиозной болезни в Российской Федерации (РФ) резко увеличивается в летние месяцы, когда крупный рогатый скот находится на пастбище или открытых выгулах. Наиболее высока заболеваемость среди молодняка в группах дорацивания и откормочных площадках с большой плотностью поголовья на фоне интенсивного облучения их солнечными ультрафиолетовыми лучами (Андриасян В.Б., 1988; Черванев В.А. с соавт., 1995; Валебная Л.В., 2007; Barth T. et al., 1986; Kehnscherper G., 1987).

Современный уровень интенсификации животноводства в РФ, завоз импортного племенного поголовья КРС - скрытых носителей возбудителя, перемещение инфицированного скота из одного региона в другой и из одних хозяйств в другие привели к значительному распространению и появлению стационарно неблагополучных очагов ИКК КРС.

Приступая к разработке ассоциированной вакцины против ИКК КРС, исходили из единого современного представления о ведущей роли бактерий *Moraxella bovis* в возникновении этой формы патологии. Как известно, жизнеспособные бактерии *Moraxella bovis* сохраняются в глазных и носовых выделениях животных в течение многих месяцев после клинического выздоровления, являясь постоянным источником инфекции. В этой связи, становится очевидной актуальность проблемы организации контроля и борьбы с данной патологией крупного рогатого скота.

Вместе с тем, отводится важное значение герпесвирусу в инфекционной патологии крупного рогатого скота, вызывающего различные клинически выраженные заболевания (Сюрин В.Н. с соавт., 1991, 1998; Dahme E., 1984). Кроме того, высказывалось мнение, что герпесвирус типа 1 создает наиболее благоприятную среду для патогенного действия основного возбудителя ИКК - бактерий *Moraxella bovis* (Rebnum W. et al., 1978).

В мировой практике для специфической профилактики ИКК крупного рогатого скота используют ряд вакцин, отличающихся по принципам получения и по способу проведения вакцинации (Rebnum W. et al., 1978; Brinton C.C. et al., 1983; Gwin R., 1985; Lepper A.W.D. et al., 1988, 1995).

В РФ вакцины против ИКК КРС на основе антигенов бактерий *Moraxella bovis* и герпесвируса типа 1 не создано.

В связи с вышеизложенным, разработка вакцины против ИКК КРС на основе антигенов бактерий *Moraxella bovis* и герпесвируса типа 1 является весьма актуальной проблемой.

1.2 Цель и задачи исследований. Целью данной работы явилась разработка технологии изготовления ассоциированной вакцины против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота на основе антигенов бактерий *Moraxella bovis* и герпесвируса типа 1 и оценка эффективности применения.

В соответствии с целью работы были поставлены следующие задачи:

1. Провести мониторинг инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота и изучить этиопатогенез его проявления в неблагополучных хозяйствах Среднего Поволжья.

2. Изготовить опытные серии биопрепарата, используя наиболее перспективные штаммы бактерий *Moraxella bovis*, отличающиеся высокой иммуногенной активностью, признанные пригодными для изготовления ассоциированной вакцины.

3. Изучить антигенные и иммуногенные свойства ассоциированной вакцины на лабораторных животных и естественно восприимчивом поголовье скота.

4. Испытать в производственных условиях профилактическую эффективность опытно-производственных серий ассоциированной вакцины против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота на основе антигенов бактерий *Moraxella bovis* и герпесвируса типа 1.

5. Разработать нормативную документацию на ассоциированную вакцину против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота на основе антигенов бактерий *Moraxella bovis* и герпесвируса типа 1.

1.3 Научная новизна работы. На основе результатов клинико-эпизоотологического мониторинга ИКК установлено значительное распространение этой болезни среди поголовья крупного рогатого скота в ряде хозяйств Среднего Поволжья.

Впервые разработана технология изготовления и способы контроля ассоциированной вакцины против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота на основе антигенов бактерий *Moraxella bovis* и герпесвируса типа 1 (Патент РФ на изобретение № 2264227 от 24.02.2004).

Установлены оптимальные концентрации и соотношения инактивированных антигенов бактериальных клеток каждого штамма в вакцинном препарате.

Установлена высокая антигенная и иммуногенная активность ассоциированной вакцины в лабораторно-производственных условиях. Получены данные, свидетельствующие, что иммунизация вызывает иммунологическую перестройку организма у привитых животных и активизирует их специфические защитные механизмы. Показана эффективность разработанной вакцины в широком производственном опыте.

1.4 Практическая значимость работы. Научно обоснованы принципы изготовления и биологического контроля ассоциированной вакцины против

инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота на основе антигенов бактерий *Moraxella bovis* и герпесвируса типа 1. Определена иммунизирующая доза препарата, показана эффективность и возможность оценки на лабораторных и естественно-восприимчивых животных. Установлено, что в производственных условиях вакцинация обладает выраженным защитным эффектом, значительно снижая заболеваемость крупного рогатого скота различных возрастных групп. На основе проведенных исследований предложена для внедрения в ветеринарную практику "Ассоциированная вакцина против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота на основе антигенов бактерий *Moraxella bovis* и герпесвируса типа 1".

Разработаны нормативные документы, регламентирующие изготовление, контроль и применение данного биопрепарата, утвержденные Россельхознадзором в 2008 году. Разработанная вакцина зарегистрирована в РФ (№ ПВР-1-4.7/ 02047 от 4 мая 2008 г.).

1.5 Апробация работы. Основные положения диссертации доложены на: научных сессиях Ученого совета Федерального центра токсикологической и радиационной безопасности животных (ФГУ "ФЦТРБ-ВНИВИ") по итогам НИР за 2001-2005 гг.; международной научно-производственной конференции, посвященной 130-летию образования Казанской государственной академии ветеринарной медицины (КГАВМ) (Казань, 2003); международной научно-производственной конференции "Актуальные проблемы эпизоотологии на современном этапе" (С.-Петербург, 2004); международной научно-производственной конференции, посвященной 80-летию ФГУП "Щелковский биокombинат" - "Ветеринарная биотехнология: настоящее и будущее" (Щелково, 2004); научно-практической конференции молодых ученых и специалистов "Достижения молодых ученых - в производство" - ФГУ "ФЦТРБ-ВНИВИ" (Казань, 2008).

1.6 Публикации результатов исследований. По теме диссертации опубликовано 8 научных работ, в т.ч. 3 статьи в изданиях, рекомендованных ВАК РФ, а также получен патент РФ на изобретение № 2264227 "Ассоциированная вакцина для специфической профилактики инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота на основе бактерий *Moraxella bovis* и герпесвируса типа 1" от 24.02.2004.

1.7 Основные положения диссертации, выносимые на защиту.

1. Клинико-эпизоотологическая характеристика инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота в хозяйствах Среднего Поволжья.

2. Технология изготовления ассоциированной вакцины против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота на основе антигенов *Moraxella bovis* и герпесвируса типа 1.

3. Антигенная и иммуногенная активность ассоциированной вакцины на кроликах и телятах.

4. Оценка эффективности ассоциированной вакцины в производственных условиях.

1.8 Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 160 страницах компьютерного текста и включает следующие разделы: общая характеристика работы, обзор литературы, материалы и методы исследований, результаты собственных исследований, обсуждение результатов исследований, выводы, практические предложения, библиографический список использованной литературы, состоящий из 247 источников, в том числе 138 иностранных авторов и приложение. Диссертация содержит 15 таблиц и иллюстрирована 8 рисунками.

2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Работа выполнялась в 2001-2009 гг. в лаборатории по изучению возбудителей болезней молодняка с.-х. животных ФГУ "ФЦТРБ-ВНИВИ" (№ госрегистрации 01200202602). Производственные опыты проведены в учебно-опытном хозяйстве КГАВМ и ряде хозяйств Республики Татарстан (РТ) и Чувашской Республики (ЧР), неблагополучных по кератоконъюнктивиту КРС инфекционной этиологии. Отдельные этапы работы были выполнены с участием н.с., к.б.н. Валебной Л.В., с.н.с., к.в.н. Ефимовой М.А., с.н.с., к.в.н. Гумерова В.Г., которым выражаю искреннюю признательность.

Выражаю глубокую благодарность профессору Гаффарову Х.З. за оказание научно-методической помощи при выполнении и оформлении данной работы.

Эпизоотологическому обследованию были подвергнуты 10 сельскохозяйственных предприятий, из них девять - в Республике Татарстан, одно - в Чувашской Республике, неблагополучных по инфекционному кератоконъюнктивиту крупного рогатого скота. Анализ эпизоотической ситуации по ИКК КРС в неблагополучных хозяйствах проводили согласно рекомендациям И.А. Бакулова с соавт. (1975) и С.И. Джупина (1991).

В процессе изучения этиологических аспектов ИКК в обследованных хозяйствах провели бактериологическое исследование 58 смывов, полученных из конъюнктивальных мешков глаз больных телят в острой стадии болезни. Идентификацию выделенных микроорганизмов осуществляли по результатам изучения морфологических, тинкториальных, культуральных, ферментативных, антигенных и патогенных свойств.

В работе применяли: 5 штаммов бактерий *Moraxella bovis*: "Г97-ВНИВИ", "ШЗ-01", АТСС 10900, 17947 и 17948, а также производственный штамм "ТКА-ВИЭВ-В2" герпесвируса типа 1.

В экспериментах использовали: 40 кроликов, массой 2,0-2,5 кг; 400 белых мышей, массой 16-20 г; 50 голов крупного рогатого скота.

Определение ID_{50} каждого бактериального компонента ассоциированной вакцины осуществляли на белых мышках путем подкожного введения им последовательных двукратных разведений моновакцин с дальнейшим заражением по методу Кербера (1931). С учетом ID_{50} каждого компонента проводили компоновку ассоциированной вакцины.

Антигенную активность биопрепарата контролировали путем двукратного введения вакцины кроликам и молодняку крупного рогатого скота

6-8-месячного возраста. Вакцину вводили подкожно, двукратно с интервалом 14 дней: телятам в область средней трети шеи по 5 см³, кроликам - в область спины по 2 см³. Через каждые 7 дней производили забор крови и исследовали сыворотку в тест-системе ИФА с целью определения уровня специфических антител к антигенам герпесвируса типа 1 и бактерий *Moraxella bovis*.

Растворимые антигены для ИФА готовили по методу В. Bishop et al. (1982) из культуры штаммов бактерий *Moraxella bovis*, смытой 0,01М ФБР (рН 7,2-7,6), путем дезинтеграции на УЗДН-2Т при техническом уровне звука 44 кГц с экспозицией 10 минут. Реакцию ИФА ставили непрямым методом на 96-луночных полистироловых планшетах однократного применения "LinbroTitertek" (Flow laboratories, USA) по общепринятой методике (Егоров А.М. с соавт., 1991). Результаты реакции учитывали по показаниям оптической плотности при длине волны 492 (ОП₄₉₂) на считывающем устройстве Titertek Multiskan (USA) или визуально. За положительный результат принимали коэффициент специфичности (отношение оптической плотности раствора в лунке с исследуемой сывороткой к таковой в лунке с отрицательной сывороткой) равный или превышающий 2,0.

Уровень клеточного иммунитета вакцинированных животных определяли по процентному соотношению Т- и В-лимфоцитов до вакцинации и через 14 дней после первой и второй вакцинации. Т- и В- лимфоциты выделяли на градиенте плотности (4%-ный поливиниловый спирт и 32,8%-ный верографин в соотношении 1:1 при плотности 1,071 г/см³) методом центрифугирования. Идентификацию Т- и В- лимфоцитов проводили в одном препарате по образованию реакции розеткообразования лимфоцитов с эритроцитами (Е-РОК) и розеткообразования лимфоцитов с зимозаном (ЗС₃-РОК) (Блинов Н.И., 1985).

Бактерицидную активность сыворотки крови определяли фотоэлектрокалориметрическим методом по Мишелю Грэффену в модификации О.В. Смирнова и Г.А. Кузьмина (цит. Романов Е.А., 1999).

Превентивные свойства сыворотки крови вакцинированных кроликов и телят исследовались на белых мышах. Иммунизацию проводили подкожно, вводя каждой белой мышши по 0,5 см³ свежеприготовленной сыворотки. Заражение мышшей осуществляли внутрибрюшинно через 24 ч смесью суточных культур бактерий *Moraxella bovis*, штаммов "Г97-ВНИВИ" и "ШЗ-01", содержащихся в количестве 1 млрд. м. к./см³, в дозе 0,5 см³ на животное.

Производственное испытание опытных серий "Ассоциированной вакцины против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота на основе антигенов бактерий *Moraxella bovis* и герпесвируса типа 1" проводили в неблагополучных хозяйствах по данному заболеванию в эпизоотологически контролируемых опытах на основании сравнения фактических данных по заболеваемости до и после применения биопрепарата.

Экономический эффект от применения "Ассоциированной вакцины против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота на основе антигенов бактерий *Moraxella bovis* и герпесвируса типа 1" определяли по официальной методике, утвержденной Департаментом ветеринарии МСХ

РФ 21 февраля 1997 г совместно с профессором кафедры организации и экономики ветеринарного дела КГАВМ А.И. Акмуллиним.

Статистическую обработку результатов исследований проводили методом вариационной статистики с применением критериев достоверности по Стьюденту с использованием программы "Microsoft Office Excel".

3 РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1 Клинико-эпизоотологическая характеристика и этиопатогенез ИКК крупного рогатого скота в хозяйствах Среднего Поволжья

Клинико-эпизоотологическим мониторингом ИКК в девяти хозяйствах трех районов Республики Татарстан (СХПК "им. Вахитова" Кукморского района; "Учхоз КГАВМ", А/Ф "Идель" Высокогорского района; СХПК "Девятовское", КХ "Каипское", ТНВ "Вафин и К", ОАО "Нарманка", КХ "Спектр", ООО "Идель" Лаишевского района) и в одном хозяйстве Чувашской Республики (СХПК "Звезда" Мариинско-Посадского района) показано, что заболеваемость телят до 6-мес возраста составляла 24-56%, молодняка от 6 до 12-мес возраста - 19-35% и молодняка старше года и взрослого поголовья - 8-22%.

При клиническом осмотре больных животных наблюдалась отечность век, конъюнктивит и слезотечение. Затем появлялось истечение серозного, серозно-слизистого, а несколько позже - гнойного экссудата. При пальпации обнаруживалась болезненность век, повышение местной температуры. На 3-5 день появлялась эрозия около 1 мм в диаметре, которая переходила в язву. При благоприятном течении язва постепенно очищалась, полость ее заполнялась грануляциями и через 1,5-3 декады у животных зрение восстанавливалось. Однако нередко случаи, когда помутнение роговицы и изъязвление распространялось до собственного вещества роговицы. В этом случае вся роговица перфорировалась и стекловидное тело с хрусталиком вытекало через это отверстие, наступала одно- или двусторонняя слепота.

Болезнь распространялась при непосредственном соприкосновении больных животных со здоровыми, а также через переносчиков - насекомых.

Результаты обследования неблагополучных по ИКК КРС хозяйств свидетельствовали о том, что в холодное время года, т. е. в стойловый период содержания животных, течение его в стаде продолжалось около месяца, заболеваемость ИКК составляла не более 10% и клинически инфекция протекала в легкой форме.

Вследствие высокой частоты проявления ИКК КРС наносил значительный экономический ущерб. При этом потери складывались из уменьшения скорости роста, снижения удоев, потери хозяйственной и племенной ценности животных, а также расходов на проведение дорогостоящего лечения.

Окончательный диагноз устанавливали по результатам бактериологических исследований патологического материала, полученного от животных в острой стадии заболевания. Диагноз на ИКК КРС считали подтвержденным, если: выделена чистая культура гладких колоний бактерий

Moraxella bovis с зоной β-гемолиза; определена родовая и видовая принадлежность их на основе результатов испытания морфологических, тинкториальных, культуральных и ферментативных свойств, которые являются основными критериями для идентификации выделенных культур бактерий *Moraxella bovis*; выявлено их антигенное родство относительно референтного штамма "АТСС 10900" бактерий *Moraxella bovis* в иммунологической реакции с позитивной сывороткой; подтверждена патогенность гемолитических форм бактерий *Moraxella bovis* на белых мышах.

В процессе изучения этиологических аспектов ИКК в неблагополучных хозяйствах провели бактериологическое исследование 58 конъюнктивальных смывов, полученных от больных телят в острой стадии болезни. В результате пассажа на кровяном агаре по S-форме колонии и по способности вызывать гемолиз эритроцитов в кровяной агаровой среде, характеризующей их вирулентность, было получено 5 культур микроорганизмов, которые по морфологическим и культуральным свойствам оказались сходными с возбудителем ИКК - бактериями *Moraxella bovis*.

Культуры микроорганизмов, выделенные от больных ИКК животных, представляли собой неподвижные, грамтрицательные, короткие (0,5-1,0 x 1,5-2,5 мкм) с закругленными концами палочки, чаще расположенные парами или короткими цепочками. Старые культуры становились полиморфными. Выделенные эпизоотические штаммы бактерий не ферментировали сахаров, не образовывали индола; в то же время разжижали желатину, т.е. обладали протеолитической активностью, проба на оксидазу оказалась положительной, пептонизировали лакмусовое молоко в течение 6-7 дней с образованием трех отчетливых зон, на кровяном мясо-пептонном агаре (МПА) наблюдали круглые гладкие колонии серо-белого цвета с шириной зоны гемолиза 0,5-1,0 мм.

Сравнительное изучение их основных биохимических свойств, антигенного родства с референтным штаммом "АТСС 10900" бактерий *Moraxella bovis*, полученного из Американской национальной коллекции микроорганизмов, позволили идентифицировать их как бактерии *Moraxella bovis*, относящиеся к семейству *Neisseriaceae*.

При ларвоскопии конъюнктивальных смывов от телят с острой формой кератоконъюнктивита личинок телязий не было обнаружено, что исключает наличие ИКК, вызванного гельминтами рода *Thelazia*.

Для изготовления "Ассоциированной вакцины против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота на основе антигенов бактерий *Moraxella bovis* и герпесвируса типа 1" использовали запатентованный штамм "Г97-ВНИВИ" бактерий *Moraxella bovis* (Патент РФ на изобретение № 2145353 с приоритетом от 15.09.1998 г.) и штамм бактерий *Moraxella bovis* - "Ш3-01", которые показали более четкие результаты, свидетельствующие об антигенном родстве при взаимодействии их антигенов с антисыворотками референтных штаммов бактерий *Moraxella bovis* (АТСС 10900, 17947, 17948). При этом оба штамма реагировали до 1/2-1 гомологичного титра, подтверждается результатами, полученными нами ранее (Валевная Л.В. с соавт., 2004).

Кроме того, установлено, что в патогенезе ИКК у молодняка крупного рогатого скота, наряду с бактериями *Moraxella bovis*, может принимать участие и герпесвирус типа 1, который обуславливает конъюнктивит (Штрауб О.Х., 1981; Abinanti F.R et al., 1961). Эти данные указывают на необходимость включения в состав средства специфической защиты животных от ИКК антигена инфекционного ринотрахеита. Для изготовления вакцины использовали производственный штамм "ТКА-ВИЭВ-В2" герпесвируса типа 1.

3.2 Разработка регламента изготовления ассоциированной вакцины против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота на основе антигенов бактерий *Moraxella bovis* и герпесвируса типа 1

Технология изготовления ассоциированной вакцины включает получение и инактивацию биомассы с максимально возможным сохранением антигенных, иммуногенных и протективных свойств отобранных штаммов, установление оптимального соотношения бактериальных компонентов в составе вакцины, связывание антигенов с адьювантом и определение оптимальной иммунизирующей дозы вакцины, исключающей ее реактогенность. Успех производства вакцин во многом обусловлен качеством исходных специфических антигенов, поэтому культивирование возбудителей болезни является одним из определяющих этапов в технологии изготовления вакцины. В связи с этим указанные этапы технологии изготовления биопрепарата проводились последовательно.

Для получения биомассы культур бактерий *Moraxella bovis* использовали МПА, содержащий 10% дефибринированной крови барана. При изготовлении вакцины использовали лиофилизированные культуры производственных штаммов бактерий *Moraxella bovis*: "Г97-ВНИВИ" и "ШЗ-01", которые растворяли в 0,5-2,0 см³ мясо-пептонного бульона (МПБ) и переносили в чашки Петри с 10%-ным кровяным МПА. Выращивание проводили в течение 24 ч при +37⁰ С. Затем культуры проверяли на соответствие морфологических и культуральных свойств. Если они соответствовали гемолитическим формам бактерий *Moraxella bovis*, то их использовали для получения бактериальной массы, необходимой для изготовления ассоциированной вакцины. Культуру смывали 0,85%-ным раствором хлорида натрия, устанавливали концентрацию 1 млрд. м.к./см³ и в дальнейшем использовали как маточную раскладку.

Биомассу бактерий *Moraxella bovis* получали в матровых колбах на указанной выше среде. На поверхность среды делали посев указанных штаммов бактерий путем внесения в каждый матрас по 2 см³ бактериальной суспензии, содержащей по 1 млрд. м.к./см³. Посевы выдерживали в термостате при температуре +37⁰ С 36-48 часов. После проверки "чистоты" роста в каждом матрасе выросшие колонии бактерий *Moraxella bovis* смывали 0,02%-ным раствором хлорида натрия, готовили суспензию с концентрацией 100-120 млрд. м.к./см³ по бактериальному или оптическому стандарту мутности ГИСК им. Л.А. Тарасевича. Инактивацию бактериальной взвеси осуществляли формалином из расчета 0,5 см³ на 100 см³ суспензии в течение 72 ч при +37⁰ С. Полноту инактивации проводили путем посева инактивированных микробных взвесей на

соответствующие питательные среды. В течение 10 сут культивирования среды оставались стерильными.

Герпесвирус типа 1, шт. "ТКА-ВИЭВ-В2", размножали в перевиваемой культуре клеток трахеи эмбриона коровы (линия TR), при $+37-38^{\circ}\text{C}$ в течение 3-4 суток. Сбор культуральной жидкости производили путем трехкратного замораживания и оттаивания в период выраженного цитопатического действия (ЦПД) - максимального накопления вируса. Полученные вирусные суспензии после освобождения от клеточного дебриса объединяли и с целью инактивации вируса добавляли формалин с содержанием активного формальдегида 37-38% из расчета $0,5 \text{ см}^3$ на 100 см^3 вирусной суспензии, перемешивали и оставляли на 24-36 ч при комнатной температуре, после чего проверяли на бактериальную и грибковую контаминацию. Для изготовления вакцины использовали вирусную суспензию без посторонней контаминации. Контроль полноты инактивации герпесвируса типа 1 КРС проводили путем трех последовательных пассажей пробы инаktivированной вирусной суспензии на перевиваемой культуре клеток TR с интервалом 5-6 суток. Вирусную суспензию считали инаktivированной, если в третьем пассаже не обнаруживалось ЦПД герпесвируса.

ID_{50} каждого бактериального компонента ассоциированной вакцины устанавливали путем подкожного введения моновакцин из штаммов бактерий *Moraxella bovis* белым мышам. Вакцинировали 5 групп животных по 6 мышей в каждой. Иммунизировали мышей следующими дозами: 0,5; 0,25; 0,125; 0,062 и $0,031 \text{ см}^3$, что соответственно составило 5; 2,5; 1,25 млрд., 620 и 310 млн. м. к. Контролем служила группа не вакцинированных животных. Через 14 сут после иммунизации, мышей заражали внутрибрюшинно 2LD_{50} . За состоянием животных вели наблюдение в течение 10 суток, отмечая количество живых мышей в каждой группе, расчет ID_{50} проводили по методу Кербера (Т.С. Костенко с соавт., 1989).

ID_{50} для моновакцины из штамма "Г97-ВНИВИ" бактерий *Moraxella bovis* составила 1,98-, из штамма "ШЗ-01"-1,76 млрд. микробных клеток. Следовательно, соотношение бактериальных клеток каждого штамма, входящего в состав ассоциированной вакцины, должно быть одинаковым.

Для изготовления 1 литра вакцины использовали $40-50 \text{ см}^3$ каждого штамма бактерий *Moraxella bovis* с концентрацией 100-120 млрд. м.к./ см^3 и $780-830 \text{ см}^3$ антигена герпесвируса типа 1 с первоначальным инфекционным титром $10^{7,0-7,5}$ ТЦД $_{50}$ / см^3 , дополняя 6%-ным гелем гидроокиси алюминия до литра. Все тщательно перемешивали, доводили рН вакцины до 7,2-7,4 и расфасовывали во флаконы, которые закрывали резиновыми пробками, обкатывали металлическими колпачками и этикетировали.

Определение стерильности вакцины проводили в соответствии с ГОСТом 28085-89 "Препараты биологические. Методы бактериологического контроля стерильности". Посевы производили на МПБ, МПА, МППБ под вазелиновым маслом и агар Сабуру в объеме $0,5 \text{ см}^3$ по две пробирки на каждый флакон. Посевы со средами инкубировали при $+37^{\circ}\text{C}$, а агар Сабуру

при +20-22⁶ С в течение 10 суток. Питательные среды с посевами оставались стерильными.

Определение безвредности препарата проводили по ГОСТу 9380067-00008064. Для этого использовали смесь вакцины из трех флаконов по 15 см³ из каждого, объединенную в стерильных условиях в отдельный флакон. Смесь вакцины тщательно перемешивали и вводили подкожно 10 белым мышам в дозе 0,5 см³ в область спины. За состоянием животных осуществляли ежедневное наблюдение: в течение 10 сут после введения вакцины белые мыши оставались живыми и клинически здоровыми, что свидетельствовало о безвредности вакцины.

Для определения остаточной вирулентности компонентов ассоциированной вакцины использовали смесь вакцины из трех флаконов. Вакцину считали авирулентной, если на поверхности кровяного МПА не обнаруживались характерные колонии бактерий *Moraxella bovis* и в перевиваемой культуре клеток TR на третьем пассаже не выявлялось ЦПД герпесвируса типа 1.

Проведенный контроль каждой серии вакцины показал, что биопрепарат соответствует требованиям, предъявляемым к инактивированным вакцинам.

Следующим важным этапом работы было определение оптимальной прививной дозы ассоциированной вакцины для разных возрастных групп крупного рогатого скота. Опыты проводили в условиях учебно-опытного хозяйства КГАВМ. Вакцинировали три возрастные группы животных: телят 1-6 мес, молодняк 6-12 мес, молодняк старше года и взрослое поголовье. Для каждой возрастной группы испытывали три соответствующие дозы вакцины. Каждую дозу препарата вводили 5 животным подкожно в среднюю треть шеи двукратно с интервалом 14 дней. Взятие крови осуществляли из яремной вены через 14 дней после второй вакцинации. Результаты исследования уровня специфических антител к антигенам бактерий *Moraxella bovis* и герпесвирусу типа 1 в сыворотке крови вакцинированного крупного рогатого скота представлены в таблице 1.

Сравнительный анализ результатов (табл. 1) испытания биопрепарата в соответствующих возрастных группах показал, что у животных вторых подгрупп каждой группы достигаются достоверно ($p < 0,05$) высокие титры антител по отношению к животным первых подгрупп. Разница между показателями титров антител у животных второй и третьей подгрупп в каждой группе статистически недостоверна ($p > 0,05$).

Таким образом, были определены оптимальные двукратные прививные дозы вакцины для крупного рогатого скота различных возрастных групп, которые составили: для телят 1-6 мес - 3 см³, молодняка 6-12 мес - 5 см³ и молодняка старше 12 мес и взрослого поголовья - 10 см³.

После двукратного применения вакцины у животных не наблюдалось ухудшения общего состояния и повышения температуры тела. На месте введения препарата наблюдалось незначительное повышение местной температуры и образование небольшой припухлости, которая исчезала в течение двух недель.

Таблица 1 – Уровень специфических антител в сыворотке крови вакцинированного крупного рогатого скота ($M \pm m$, $n=5$)

Группа животных	Доза, см ³	Титры антител в ИФА, log ₂		
		к <i>Moraxella bovis</i>		к герпесвирусу типа 1, шт. "ТКА-ВИЭВ-В2"
		шт. "Г97-ВНИВИ"	шт. "ШЗ-01"	
Телята 1-6 месяцев	1,5	10,84±0,41	10,84±0,22	7,12±0,41
	3,0	11,44±0,41	11,84±0,41	7,92±0,27
	4,5	11,64±0,35	12,04±0,27	8,12±0,22
Молодняк 6-12 месяцев	2,5	12,64±0,35	11,64±0,35	8,52±0,22
	5,0	13,04±0,27	12,64±0,35	9,52±0,42
	7,5	13,04±0,27	12,84±0,22	9,92±0,27
Молодняк старше года и взрослое поголовье	5,0	12,24±0,27	12,44±0,22	9,52±0,22
	10,0	12,64±0,35	12,84±0,22	9,72±0,27
	15,0	13,04±0,27	13,24±0,27	10,12±0,22

3.3 Оценка антигенной активности вакцины и показатели клеточного, гуморального иммунитета вакцинированных кроликов

Для изучения антигенной активности ассоциированную вакцину вводили подкожно 5 кроликам, двукратно с интервалом 14 дней. Разовая доза вакцины составляла 2 см³.

Таблица 2 – Содержание специфических антител в сыворотке крови вакцинированных кроликов к антигенам бактерий *Moraxella bovis* и герпесвируса типа 1 ($M \pm m$, $n=5$)

Сроки исследования	Титры антител в ИФА, log ₂		
	к <i>Moraxella bovis</i> ,		к герпесвирусу типа 1, шт. "ТКА-ВИЭВ-В2"
	шт. "Г97-ВНИВИ"	шт. "ШЗ-01"	
До вакцинации	-	-	-
Через 7 дней после первой вакцинации	7,04±0,27	8,04±0,57	6,12±0,22
Через 14 дней после первой вакцинации	7,84±0,54	10,04±0,57	7,32±0,00
Через 7 дней после второй вакцинации	9,84±0,22	13,64±0,00	9,72±0,27
Через 14 дней после второй вакцинации	11,04±0,57	12,24±0,44	8,92±0,44

Результаты серологических исследований сывороток крови вакцинированных кроликов (табл. 2) показали, что наивысший уровень специфических антител к *Moraxella bovis*, шт. "ШЗ-01" и к герпесвирусу типа 1, шт. "ТКА-ВИЭВ-В2", наблюдается на 7 день после второй вакцинации, к *Moraxella bovis*, шт. "Г97-ВНИВИ" на 14 день после второй вакцинации и составляет соответственно $13,64 \pm 0,00$ -, $9,72 \pm 0,27$ - ($p < 0,001$) и $11,04 \pm 0,57 \log_2$ ($p < 0,01$).

После иммунизации кроликов было установлено также достоверное увеличение относительного содержания в периферической крови Т- и В-лимфоцитов от $53,90 \pm 0,92$ до $59,20 \pm 0,67\%$ и от $16,82 \pm 0,42$ до $24,90 \pm 0,48\%$, соответственно ($p < 0,05$). Снижается оптическая плотность сыворотки крови от $60,98 \pm 1,01$ до $48,30 \pm 1,02$ % ($p < 0,05$), что указывает на повышение ее бактерицидной активности. Эти данные показывают, что при иммунизации кроликов активизируются клеточные и гуморальные факторы иммунитета.

Выживаемость мышей после иммунизации сывороткой крови однократно вакцинированных кроликов составила 70%, а после иммунизации сывороткой крови двукратно вакцинированных кроликов - 80%, в то время как у не иммунизированных и иммунизированных сывороткой до вакцинации составила 20%. Таким образом, превентивные свойства сыворотки крови у вакцинированных кроликов более выражены, чем у не вакцинированных.

В опытах на лабораторных животных установлено, что разработанная вакцина безвредна, стерильна, ареактогенна и безопасна в экологическом отношении, обладает выраженной антигенной активностью и индуцирует формирование гуморального иммунного ответа у кроликов к каждому из компонентов биопрепарата.

3.4 Оценка антигенной активности вакцины и показатели клеточного, гуморального иммунитета вакцинированных телят

Исходя из результатов предыдущих опытов по изучению антигенной активности на кроликах и определению прививной дозы для крупного рогатого скота, были проведены исследования по изучению антигенной активности вакцины на естественно-восприимчивых к этому заболеванию животных-телятах 6-8 мес возраста. Вакцину вводили подкожно в среднюю треть шеи двукратно с интервалом 14 дней в дозе 5 см^3 .

Данные, представленные в таблице 3, показывают, что максимальный уровень специфических антител в сыворотке крови вакцинированного молодняка крупного рогатого скота достигает на 7 день после второй вакцинации и составляет, в ИФА, к бактериям *Moraxella bovis*, шт. "Г97-ВНИВИ"- $13,44 \pm 0,22 \log_2$ и шт. "ШЗ-01"- $13,04 \pm 0,27 \log_2$ ($p < 0,01$), герпесвирусу типа 1- $10,32 \pm 0,00 \log_2$ ($p < 0,05$).

Таблица 3 – Содержание специфических антител в сыворотке крови вакцинированных телят к антигенам бактерий *Moraxella bovis* и герпесвируса типа 1 ($M \pm m$, $n=5$)

Сроки исследования	Титры антител в ИФА, \log_2		
	к <i>Moraxella bovis</i> ,		к герпесвирусу типа 1, шт. "ТКА-ВИЭВ-В2"
	шт. "Г97-ВНИВИ"	шт. "ШЗ-01"	
До вакцинации	-	-	4,79 \pm 2,19
Через 7 дней после первой вакцинации	8,64 \pm 0,35	8,84 \pm 0,41	7,72 \pm 0,44
Через 14 дней после первой вакцинации	12,04 \pm 0,67	12,64 \pm 0,00	9,72 \pm 0,27
Через 7 дней после второй вакцинации	13,44 \pm 0,22	13,04 \pm 0,27	10,32 \pm 0,00
Через 14 дней после второй вакцинации	13,24 \pm 0,27	12,84 \pm 0,41	9,72 \pm 0,44

После иммунизации у молодняка крупного рогатого скота наблюдается увеличение содержания в периферической крови Т- и В- лимфоцитов от 54,50 \pm 0,39 до 59,40 \pm 0,59 % и от 17,0 \pm 0,39 до 25,22 \pm 0,72%, соответственно ($p < 0,05$). Снижается оптическая плотность сыворотки крови от 63,96 \pm 2,56 до 45,71 \pm 3,19% ($p < 0,05$).

Изучением превентивных свойств установлено, что сыворотка крови телят, иммунизированных однократно, и сыворотка крови телят, иммунизированных двукратно, введенная белым мышам, предохраняет их от гибели после заражения смесью суточных культур бактерий *Moraxella bovis*, штаммов "Г97-ВНИВИ" и "ШЗ-01", соответственно в 60 и 100 % случаев, тогда как сыворотка крови интактных телят защищала только в 30% случаев.

3.5 Изучение эффективности ассоциированной вакцины в производственных условиях

Производственное испытание ассоциированной вакцины против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота проводили в девяти неблагополучных хозяйствах по данному заболеванию в эпизоотически контролируемых опытах. При исследовании 50 проб сывороток крови в ИФА, полученных от естественно больных и переболевших телят обнаруживали специфические антитела в титрах 7,32-11,32 \log_2 к антигену референтного штамма "АТСС 10900" бактерий *Moraxella bovis*. Кроме того, в трех хозяйствах в реакции нейтрализации выявлены специфические антитела к вирусу инфекционного ринотрахеита в титрах 2,0-3,0 \log_2 ("Учхоз КГАВМ", СХПК

"им. Вахитова", СХПК "Звезда"), что указывает на циркуляцию герпесвируса типа 1 среди поголовья крупного рогатого скота.

Вакцинировали весь нарождающийся молодняк в возрасте 30-35 дней независимо от времени года, а также все поголовье КРС перед выгоном на пастбище согласно инструкции по применению вакцины. Эффективность применения биопрепарата определялась на основании показателей заболеваемости до и после применения биопрепарата, а также по уровню специфических антител в сыворотке крови вакцинированных животных через три месяца после вакцинации в хозяйствах Лаишевского района РТ (табл. 4).

Таблица 4 – Содержание специфических антител в сыворотке крови вакцинированного крупного рогатого скота в хозяйствах Лаишевского района Республики Татарстан ($M \pm m, n=5$)

Название хозяйства	Титры антител в ИФА, \log_2		
	к <i>Moraxella bovis</i> ,		к герпесвирусу типа 1, шт. "ТКА-ВИЭВ-В2"
	шт. "Г97-ВНИВИ"	шт. "ШЗ-01"	
СХПК "Девятовское"	11,12±0,22	11,32±0,35	9,72±0,44
КХ "Каипское"	11,12±0,41	11,72±0,44	10,52±0,22
ТНВ "Вафин и К"	11,52±0,22	11,32±0,50	9,72±0,75
ОАО "Нарманка"	11,12±0,41	11,52±0,41	10,12±0,54
КХ "Спектр"	11,32±0,50	11,72±0,44	10,32±0,50
ООО "Идель"	11,12±0,41	11,12±0,54	9,72±0,57

Из данных таблицы 4 следует, что вакцина обладает достаточно высокой антигенной активностью, титры специфических антител в сыворотке крови животных через 3 мес после вакцинации составляли в ИФА к герпесвирусу типа 1, шт. "ТКА-ВИЭВ-В2", от 9,72±0,44 до 10,52±0,22 \log_2 ($p < 0,001$), к бактериям *Moraxella bovis*, шт. "Г97-ВНИВИ" - от 11,12±0,22 до 11,52±0,22 \log_2 ($p < 0,0001$), шт. "ШЗ-01" - от 11,12±0,54 до 11,72±0,44 \log_2 ($p < 0,0001$).

Применение ассоциированной вакцины в стационарно неблагополучных хозяйствах позволило сократить заболевание в одних хозяйствах до 2-4%, а в других полностью искоренить, тем самым снизить наносимый экономический ущерб.

Экономический эффект достигается за счет предотвращения потерь от снижения продуктивности животных в 10 раз превышающих затраты на проведение профилактической вакцинации. При затратах на вакцинацию одной головы крупного рогатого скота 17,77 руб, экономический эффект составляет 187,80 рублей.

Таким образом, применение ассоциированной вакцины обеспечивает надежную защиту скотоводства от опасной инфекционной болезни - инфекционного кератоконъюнктивита.

4 ВЫВОДЫ

1. Клинико-эпизоотологическим мониторингом инфекционного кератоконъюнктивита показано значительное распространение высококонтагиозной болезни в десяти хозяйствах Республики Татарстан и Чувашской Республики среди различных возрастных групп крупного рогатого скота, характеризующееся слезотечением, гиперемией сосудов конъюнктивы, светобоязнью, серозно-гнойным истечением, помутнением и изъязвлением роговицы, деформацией глазного яблока в виде кератоглобула или кератоконуса, частичной или полной потерей зрения пораженного глаза животного. Заболеваемость телят 1-6-мес возраста составляет 24-56%, молодняка от 6 до 12-мес возраста - 19-35%, молодняка старше года и взрослого поголовья - 8-22%. По результатам бактериологических исследований клинического патологического материала, полученного от животных в острой стадии болезни, в четырех хозяйствах выделен основной возбудитель ИКК - бактерии *Moraxella bovis*.

2. Разработана технология изготовления и контроля ассоциированной вакцины против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота на основе антигенов бактерий *Moraxella bovis* из штаммов "Г97-ВНИВИ", "ШЗ-01" и штамма "ТКА-ВИЭВ-В2" герпесвируса типа 1 (Патент РФ на изобретение № 2264227 от 24.02.2004).

3. В опытах на лабораторных животных установлено, что разработанная вакцина безвредна, ареактогенна и безопасна в экологическом отношении, обладает выраженной антигенной активностью и индуцирует формирование специфических антител у кроликов к антигенам бактерий *Moraxella bovis*, шт. "Г97-ВНИВИ", шт. "ШЗ-01" и шт. "ТКА-ВИЭВ-В2" герпесвируса типа 1, выявленных в ИФА, соответственно $11,04 \pm 0,57 \log_2$, $12,24 \pm 0,44 \log_2$ ($p < 0,01$) и $8,92 \pm 0,44 \log_2$ ($p < 0,001$).

4. Прививная доза вакцины, обеспечивающая высокую иммуногенную активность, для двукратного введения естественно-восприимчивым животным различных возрастных групп составляет: телятам 1-6 мес - 3 см^3 , молодняку 6-12 мес - 5 см^3 , молодняку старше 12 мес и взрослому поголовью - 10 см^3 . Уровень специфических антител в сыворотке крови вакцинированного молодняка крупного рогатого скота составляет к антигенам бактерий *Moraxella bovis*, шт. "Г97-ВНИВИ" - $13,24 \pm 0,27 \log_2$, шт. "ШЗ-01" - $12,84 \pm 0,41 \log_2$ ($p < 0,01$) и шт. "ТКА-ВИЭВ-В2" герпесвируса типа 1 - $9,72 \pm 0,44 \log_2$ ($p < 0,05$).

5. После двукратной вакцинации животных достоверно увеличивается относительное содержание в периферической крови Т- и В- лимфоцитов: у кроликов от $53,90 \pm 0,92$ до $59,20 \pm 0,67\%$ и от $16,82 \pm 0,42$ до $24,90 \pm 0,48\%$, соответственно; у молодняка крупного рогатого скота - от $54,50 \pm 0,39$ до $59,40 \pm 0,59\%$ и от $17,0 \pm 0,39$ до $25,22 \pm 0,72\%$, соответственно. Следовательно, иммунизация животных ассоциированной вакциной против ИКК крупного

рогатого скота вызывает определенную иммунобиологическую перестройку в их организме, активизируя гуморальные и клеточные факторы иммунитета.

6. Испытанием ассоциированной вакцины в широком производственном опыте установлена ее профилактическая эффективность, обеспечивающая снижение заболеваемости среди крупного рогатого скота различных возрастных групп в 4,5-16 раз. Эффективность особенно высока среди молодняка при систематической и массовой их иммунизации.

7. Экономическая эффективность от применения разработанной ассоциированной вакцины обеспечивается за счет предотвращения потерь от снижения продуктивности животных в 10 раз превышающих затраты на проведение вакцинации. При затратах на вакцинацию одной головы крупного рогатого скота в сумме 17,77 рублей, экономический эффект составляет 187,8 рублей.

8. Анализ зарубежных и отечественных литературных источников, а также собственных результатов исследований в неблагополучных хозяйствах по инфекционному кератоконъюнктивиту крупного рогатого скота, указывает на необходимость симптоматического лечения больных животных, осуществления комплекса организационно-хозяйственных, ветеринарно-санитарных и специфических мероприятий, направленных на предотвращение заражения животных, особенно молодняка, возбудителем болезни через объекты внешней среды.

5 ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

1. На основе проведенных исследований разработана и предложена для внедрения в ветеринарную практику "Ассоциированная вакцина против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота на основе антигенов бактерий *Moraxella bovis* и герпесвируса типа 1".

2. Результаты исследований вошли в следующие нормативные документы:

– Инструкцию по применению вакцины ассоциированной против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота на основе антигенов бактерий *Moraxella bovis* и герпесвируса типа 1, утвержденную Россельхознадзором 04.05.2008;

– Технические условия на ассоциированную вакцину против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота на основе антигенов бактерий *Moraxella bovis* и герпесвируса типа 1, утвержденные Россельхознадзором 12.05.2008.

3. На ассоциированную вакцину против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота на основе антигенов бактерий *Moraxella bovis* и герпесвируса типа 1 получено "Свидетельство о государственной регистрации лекарственного средства для животных " № ПВР-1-4.7/ 02047 от 4 мая 2008 года.

6 СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Валебная, Л.В. Иммунобиологические свойства возбудителя инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота / Л.В. Валебная, Х.З. Гаффаров, Г.Н. Спиридонов, Л.Ш. Дуплева, Р.А. Салахутдинов // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. - Казань. - 2004. - Т. 178. - С. 39-47;

2. Гаффаров, Х.З. Биологические свойства бактерий *Moraxella bovis* - возбудителя инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота / Х.З. Гаффаров, Г.Н. Спиридонов, Л.В. Валебная, Л.Ш. Дуплева // Матер. Международной научно-производственной конференции "Актуальные проблемы эпизоотологии на современном этапе. - С.-Петербург. - 2004. - С. 24-25;

3. Гаффаров, Х.З. Ассоциированная вакцина против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота / Х.З. Гаффаров, Л.Ш. Дуплева, Г.Н. Спиридонов и др. // Матер. Международной научно-производственной конф., посвящ. 80-летию ФГУП "Щелковский биокombинат". "Ветеринарная биотехнология: настоящее и будущее".- Щелково. - 2004. - С. 210-216;

4. Патент РФ № 2264227 Ассоциированная вакцина для специфической профилактики инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота на основе бактерий *Moraxella bovis* и герпесвируса типа 1 / Х.З. Гаффаров, Г.Н. Спиридонов, А.З. Равилов, Р.А. Салахутдинов, Л.Ш. Дуплева, М.А. Ефимова. - 24.02.2004;

5. Иванов, А.В. Этиология и патогенез инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота /А.В. Иванов, Х.З. Гаффаров, Г.Н. Спиридонов, Л.В. Валебная, Л.Ш. Дуплева // Ветеринарный врач. - Казань. - 2005. - № 4. - С. 22-27;

6. Гаффаров, Х.З. Инфекционный кератоконъюнктивит крупного рогатого скота / Х.З. Гаффаров, А.В. Иванов, Л.В. Валебная, Г.Н. Спиридонов, Л.Ш. Дуплева, М.А. Ефимова // Ветеринария. - 2007. - № 12. - С. 21-24;

7. Гаффаров, Х. З. Ассоциированная вакцина против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота / Х. З. Гаффаров, А. В. Иванов, Г.Н. Спиридонов, Л.Ш. Дуплева и др. // Ветеринария.- 2008. - № 5. - С. 18-21;

8. Дуплева, Л.Ш. Изучение антигенной и иммуногенной активности ассоциированной вакцины против инфекционного кератоконъюнктивита крупного рогатого скота на основе антигенов бактерий *Moraxella bovis* и герпесвируса типа 1 на телятах / Л. Ш. Дуплева // Матер. науч.- практ. конф. молодых ученых и специалистов "Достижения молодых ученых - в производство".- Казань - 2008.- С. 146-148.

Подписано в печать 17.08.2009. Заказ № 81
Гарнитура "Times New Roman". Печать офсетная.
Бумага офсетная. Объем 1,0 п.л.
Формат 60x84 1/16. Тираж 100 экз.
Отпечатано в типографии ФГУ "ФЦТРБ-ВНИВИ" (г. Казань)
Адрес: 420075, г. Казань, Научный городок-2